

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 28 septembre 2017
par

CAVAILLES Romain

né le 13 octobre 1989, à Castres

**Analyse de nouveaux marqueurs (CD180, CD200 et ROR1) dans le
diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs par
cytométrie en flux**

Examineurs de la thèse :

Madame le Professeur Sylvie Rogez
Monsieur le Professeur Loïc Ysebaert
Monsieur le Docteur François Vergez
Monsieur le Docteur Michaël Peres

Présidente
Juge
Juge
Juge





Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 29 septembre 2017
par

CAVAILLES Romain

né le 13/10/1989, à Castres

**Analyse de nouveaux marqueurs (CD180, CD200 et ROR1) dans le
diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs par
cytométrie en flux**

Examineurs de la thèse :

Madame le Professeur Sylvie Rogez
Monsieur le Professeur Loïc Ysebaert
Monsieur le Docteur François Vergez
Monsieur le Docteur Michaël Peres

Présidente
Juge
Juge
Juge





Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE
-------------------------	-------------

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin	(01.09.2016 au 31.08.2017) CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
--------------------	--

LAVERDET Betty

(1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PHAM Thanh Nhat

(1.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole

Remerciements

A ma présidente de jury

Madame le Professeur Sylvie ROGEZ,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
UFR des Sciences Pharmaceutiques de Limoges

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mon directeur de thèse

Monsieur le docteur François VERGEZ,
Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de médecine de Toulouse
Laboratoire d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopôle

Je te remercie de m'avoir guidé tout au long de ce travail mais aussi de m'avoir écouté et conseillé. Je te remercie pour ta grande disponibilité ainsi que pour ta bonne humeur à toute épreuve. Je souhaite te témoigner mon immense reconnaissance.

A mes juges,

Monsieur le Professeur Loïc YSEBAERT,
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Faculté de médecine de Toulouse
Service d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopôle
Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être membre de ce jury et d'y apporter votre regard de clinicien. Je vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

Monsieur le Docteur Michaël PERES,
Assistant Hospitalo-Universitaire
UFR de Pharmacie de Toulouse
Laboratoire d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopôle

Je te suis très reconnaissant de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ce travail. Je te remercie pour tes conseils, pour ta disponibilité, pour tout ce que tu m'as appris et pour ton extrême gentillesse.

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

A Madame l'ingénieur Marie-Laure Nicolau,
Plateau technique spécialisé de cytométrie en flux
Laboratoire d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopôle

Je te remercie pour ton aide et tes précieux conseils.

Aux techniciennes de laboratoire
Plateau technique spécialisé de cytométrie en flux
Laboratoire d'Hématologie de l'Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopôle

Merci d'avoir consacré de votre temps à cette étude. Merci pour votre implication et votre gentillesse.

Un grand merci

A tous les biologistes qui m'ont accueilli dans leur service au cours de ces quatre années d'internat que ce soit à Limoges, Toulouse, Bordeaux et Castres. Merci de m'avoir inculqué votre savoir.

Au Professeur Jean-François Moreau et au docteur Jean-Philippe Vial qui ont su me transmettre leur connaissance et leur passion dans leur discipline respective.

Aux nombreux techniciens que j'ai pu rencontrer et qui m'ont inculqué leur savoir. Merci pour votre accueil toujours chaleureux.

A Monsieur et Madame Chauvet qui m'ont accueilli dans leur pharmacie pour mes différents stages.

A Yannick Pages qui m'a fait confiance et m'a amicalement accueilli au sein de son officine.

A ma famille

A mes parents, sans eux rien n'aurait été possible. Merci à eux de m'avoir fait confiance et d'avoir toujours cru en moi. Merci à tous les niveaux pour votre immense soutien.

A mon frère, merci de m'avoir supporté dans les moments les plus durs.

A mes grands-parents, merci pour votre soutien hors pair. Je sais que vous êtes fiers de moi.

A mon parrain, merci pour ton soutien et tes nombreux conseils.

A Eugénie, même si tu m'as aujourd'hui quitté, merci d'avoir œuvré à ma réussite. Sans toi je n'aurais pu aller si loin, c'est une certitude. Merci pour ton soutien à toute épreuve, surtout dans les moments les plus difficiles.

A mes amis

A mes amis d'enfance, Steve et Camille. Merci d'avoir pardonné et compris mes nombreuses absences pour cause de révision.

A mes amis de lycée, Adeline, Jordan, Cyril et Aurélien. Merci pour ces merveilleuses années au lycée en votre compagnie, vous avez été fantastiques.

A mes amis de fac,

A Pierre. A notre binôme de choc. A nos nombreuses discussions visant à refaire le monde. A nos escapades sportives et champêtres. A nos nombreux fous-rires.

A Mathieu, à nos sorties vélo le long du canal du midi et à nos sessions révision.

A Thibaut, à nos sessions musique électronique et à nos nombreuses sessions révisions.

Aux deux Thomas. Merci pour votre extrême gentillesse et votre grand soutien.

A Marine, Grégoire, Morgan et Jonathan.

A notre Gillou parti beaucoup trop vite.

A mes nombreux co-internes

Un grand merci à la dream team de biochimie, Julien, Guillaume et Thierry. Merci pour votre joie de vivre. A notre quartier général limougeaud, chez Redon. Grâce à vous le début d'internat a juste été parfait !

A Thierry. C'est bien toi qui m'auras le plus supporté durant cet internat ! Merci pour tout. Je compte désormais un ami de plus dans mes rangs, et non des moindres !

Merci à Alexandre, Céline, Kavish et Xavier. A nos fous-rires interminables.

Merci à France, Jean-Baptiste, Claire et Batiste. Merci pour votre gentillesse et votre grand soutien durant ce stage difficile.

Merci à Sanaa, Julian, Tiphaine, Shérazade et Alice-Anne.

Merci à Anthony, Inès, Louis-Thomas, Laurie, Grégoire, Etienne, Agnès, Jean et Camille.

Merci à Jules, Thibault, Marion, Morgane et Stella.

Merci pour votre bonne humeur et votre entraide. Le temps est vite passé en votre compagnie. Pardon à ceux que j'aurais oublié.

Table des matières

Liste des enseignants	5
Remerciements.....	9
Table des matières	13
Liste des tableaux.....	14
Liste des figures.....	15
Liste des abréviations	17
Introduction	19
I. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B	20
I.1. Différenciation lymphocytaire B normale.....	20
I.1.1. Lymphopoïèse B : moelle osseuse.....	20
I.1.2. Différenciation B dépendante de l'antigène ou immunopoïèse	22
I.2. Origine cellulaire des lymphomes	24
I.3. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.....	26
I.4. Immunophénotypage des SLPC-B.....	33
I.4.1. La cytométrie en flux	33
I.4.2. Application en hématologie	38
I.4.3. Immunophénotypage des différents SLPC-B	42
II. Analyse de nouveaux marqueurs (CD180, CD200, et ROR1) dans le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs B par cytométrie en flux	51
II.1. Présentation des nouveaux marqueurs	51
II.1.1. CD180	51
II.1.2. CD200	52
II.1.3. ROR1.....	52
II.2. Etude de la répartition des marqueurs en fonction des SLPC-B.....	52
II.2.1. Objectif	52
II.2.2. Matériel et méthode.....	52
II.2.3. Résultats.....	59
II.2.4. Discussion	75
Conclusion	79
Références bibliographiques	80
Annexe 1 : Préparation des échantillons pour la cytométrie en flux.....	87
Annexe 2 : Exemples d'histogrammes biparamétriques obtenus.....	88
Serment de Galien.....	90

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de Binet.....	26
Tableau 2 : Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (40) (44).....	41
Tableau 3 : Approche diagnostique immunophénotypique dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.....	44
Tableau 4 : Score de Matutes.....	45
Tableau 5 : Score des marqueurs de la HCL (57).....	48
Tableau 6 : Caractéristiques phénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.....	50
Tableau 7 : Répartition des SLPC-B selon l'origine des échantillons de diagnostic.....	53
Tableau 8 : Classement des leucémies lymphoïdes chroniques atypiques à score de Matutes = 3.....	55
Tableau 9 : Classement des lymphomes à cellules du manteau.....	55
Tableau 10 : Classement des lymphomes lympho-plasmocytaires.....	56
Tableau 11 : Classement des lymphomes de la zone marginale.....	57
Tableau 12 : Classement des leucémies à tricholeucocytes.....	57
Tableau 13 : Tableau récapitulatif des valeurs retrouvées pour CD180. Pourcentage de cellules positives pour CD180 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD180 pour les cellules CD19 positives (B).....	61
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des valeurs retrouvées pour CD200. Pourcentage de cellules positives pour CD200 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD200 pour les cellules CD19 positives (B).....	63
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des valeurs retrouvées pour ROR1. Pourcentage de cellules positives pour ROR1 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de ROR1 pour les cellules CD19 positives (B).....	65

Liste des figures

Figure 1 : Lymphopoïèse B. Les différents stades en fonction du réarrangement des gènes et des marqueurs de différenciation (3)	21
Figure 2 : Activation B dans le centre germinatif (7)	23
Figure 3 : Ontogénie des lymphocytes B et hémopathies malignes lymphoïdes B (11).....	25
Figure 4 : Schéma général d'un cytomètre en flux	34
Figure 5 : Exemple de cytomètre Beckman Coulter ® au CHU de Toulouse. Modèle Navios ®	34
Figure 6 : Histogramme monoparamétrique représentant l'intensité d'expression pour un paramètre donné en fonction du nombre de cellules concernées. Sur ce graphe est représentée deux populations, l'une négative, l'autre positive. (33).....	35
Figure 7 : Histogramme biparamétrique représentant l'intensité du paramètre A en abscisse et l'intensité du paramètre B en ordonnée. Le graphe se présente sous forme de points ou « dots blots ». Le quadrant 1 représente les cellules positives pour le paramètre B et négatives pour le paramètre A. Le quadrant 4 représente les cellules positives pour le paramètre A et négatives pour le paramètre B. Le quadrant 2 correspond aux cellules doublement positives alors que le quadrant 3 correspond aux cellules doublement négatives. (33).....	36
Figure 8 : Informations morphologiques apportées par la CMF (A) (34). Ciblage de la population d'intérêt par CMF. Graphique représentant la taille (FAS ou FSC) en fonction de la granularité (RAS ou FSC) (B) (34).....	36
Figure 9 : Principe de la fluorescence dans la cytométrie en flux (34). Dans cet exemple est représenté un lymphocyte B exprimant les marqueurs CD19, CD20, CD5 et CD23. FITC : fluoro-isothiocyanate de fluorescéine. PE : phycoérythrine. PerCP : peridinine chlorophylle protéine	37
Figure 10 : Répartition des différents effectifs sous forme de diagramme circulaire	54
Figure 11 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de CD180 en fonction de chaque groupe de patients. Pourcentage de cellules positives pour CD180 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD180 pour les cellules CD19 positives (B)	60
Figure 12 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de CD200 en fonction de chaque groupe de patients. Pourcentage de cellules positives pour CD200 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD2000 pour les cellules CD19 positives (B)	62
Figure 13 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de ROR1 en fonction de chaque groupe de patients. Pourcentage de cellules positives pour ROR1 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de ROR1 pour les cellules CD19 positives (B)	64

Figure 14 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de ROR1 en fonction des SLPC-B CD10+ . Pourcentage de cellules positives pour ROR1 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de ROR1 pour les cellules CD19 positives (B)	66
Figure 15 : Courbes ROC afin de déterminer les valeurs prédictives des paramètres d'intérêt : pourcentage de CD23+ en haut à gauche, ratio de CD79b en haut à droite, MFI de CD200 en bas à gauche ; pour CLL versus non CLL dans les SLPC-B CD5+/CD10-. Courbe de ROC afin de déterminer la valeur prédictive du pourcentage de CD200 dans le MCL versus non MCL dans les SLPC-B CD5+/CD10- en bas à droite.....	68
Figure 16 : Représentations graphiques de la distribution des marqueurs ayant un intérêt diagnostique dans la différenciation des SLPC-B CD5+/CD10-. CD79b ratio (A) , pourcentage de positivité de CD23 (B) et pourcentage de positivité de CD200 (C) en fonction des SLPC-B CD5+/CD10-.....	69
Figure 17 : Tableau récapitulatif des performances diagnostiques de chaque marqueur. Pour chacun des 3 SLPC-B est représenté par un code couleur la valeur de l'AUC du marqueur permettant de distinguer le lymphome en question des autres SLPC-B CD5+/CD10-.....	69
Figure 18 : Représentation graphique des scores obtenus en fonction des différents SLPC-B CD5+/CD10- (A) . Représentation en diagramme circulaire de la répartition des SLPC-B CD5+/CD10- en fonction du score obtenu (B)	70
Figure 19 : Répartition des anomalies cytogénétiques des CLL selon le score	71
Figure 20 : Courbes ROC afin de déterminer la valeur prédictive du pourcentage de FMC7 dans les LPL versus les non LPL dans les SLPC-B CD5-/CD10- en haut à gauche. Courbes de ROC afin de déterminer les valeurs prédictives des paramètres d'intérêt : MFI de CD200 en haut à gauche ; MFI de CD180 en bas à gauche et pourcentage de ROR1 en bas à droite dans les HCL versus les non HCL dans les SLPC-B CD5-/CD10-.....	72
Figure 21 : Représentations graphiques de la distribution des marqueurs ayant un intérêt diagnostique dans la différenciation des SLPC-B CD5-/CD10-. Pourcentage de positivité de FMC7 (A) , pourcentage de positivité de CD180 (B) , MFI de CD200 (C) et pourcentage de positivité de ROR1 (D) en fonction des SLPC-B CD5-/CD10-.....	72
Figure 22 : Tableau récapitulatif des performances diagnostiques de chaque marqueur. Pour chacun des 3 SLPC-B est représenté par un code couleur la valeur de l'AUC du marqueur permettant de distinguer le lymphome en question des autres SLPC-B CD5-/CD10-.....	73
Figure 23 : Représentation graphique des scores obtenus en fonction des différents SLPC-B CD5-/CD10- (A) . Représentation en diagramme circulaire de la répartition des SLPC-B CD5-/CD10- en fonction du score obtenu (B)	74
Figure 24 : Exemples de résultats obtenus	89

Liste des abréviations

aCLL : leucémie lymphoïde chronique atypique
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
AUC : area under curve (aire sous la courbe)
BCR : B cell receptor
B-PPL : leucémie à prolymphocytes
CD : cluster differentiation
CG : centre germinatif
clg : immunoglobuline intra-cytoplasmique
CLL : leucémie lymphoïde chronique
CMF : cytométrie en flux
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique
FAS : forward angle scatter
FISH : fluorescence in situ hybridation
FITC : fluorescein isothiocyanate
FL : lymphome folliculaire
HCL : leucémie à tricholeucocytes
HIV : virus de l'immunodéficience humaine
HLA : human leucocyte antigen
Ig : immunoglobuline
IHC : immunohistochimie
MFI : intensité moyenne de fluorescence
LPL : lymphome lymphoplasmocytaire
LPS : lipopolysaccharide
MALT : mucosa-associated lymphoid tissue
MBL : lymphocytose B monoclonale
MCL : lymphome à cellules du manteau
MM : myélome multiple
MRD : maladie résiduelle
MZL : lymphome de la zone marginale
OMS : organisation mondiale de la santé
PBS : tampon phosphate buffer saline
PCR : polymerase chain reaction
PE : phycoerythrin
PerCP : peridinine chlorophylle protéine
PLP : progéniteur lymphoïde précoce
PMT : photomultiplicateur
RAG : recombination activating genes
RAS : right angle scatter
ROC : receiving operator characteristic

ROR1: receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
SDRPL : lymphome splénique diffus de la pulpe rouge
slg : immunoglobuline de surface
SLC : surrogate light chain
SLL : lymphome lymphocytaire
SLPC-B : syndromes lymphoprolifératifs chroniques B
SLVL : lymphome splénique à lymphocytes villeux
SMZL : lymphome de la zone marginale splénique
TCR : T cell receptor
TLR : Toll like receptor
vHCL : leucémie à tricholeucocytes variante

Introduction

Les proliférations lymphomateuses regroupent l'ensemble de la pathologie tumorale développée aux dépens des cellules du tissu lymphoïde ganglionnaire mais parfois aussi extra-ganglionnaire. La tumeur est la plupart du temps cantonnée au système lymphatique et ne diffuse pas au niveau sanguin ou médullaire. Dans certains cas, les cellules lymphomateuses vont passer dans le sang périphérique et on parlera alors de phase leucémique de la maladie lymphoproliférative. C'est dans ce cas-là que l'immunophénotypage lymphocytaire se révèle être l'outil diagnostique de première intention le plus adapté permettant de caractériser le syndrome lymphoprolifératif chronique B (SLPC-B).

Même si la classification précise et définitive reste anatomo-pathologique, l'examen des cellules circulantes en cytologie et en cytométrie en flux (CMF) reste fondamental car il permet de donner une orientation diagnostique. La cytométrie en flux présente elle comme avantage d'être rapide, de pouvoir utiliser un large panel d'anticorps permettant de déterminer à la fois une intensité d'expression d'un marqueur et un pourcentage de cellules concernées.

Même si la CMF a connu un essor considérable au cours de la dernière décennie, l'absence de marqueur cytométrique totalement spécifique réduit la précision diagnostique et pose un problème de prise en charge adaptée au patient.

Hormis l'existence du score de Matutes/Moreau (1) qui permet de poser le diagnostic de leucémie lymphoïde chronique dans 98% du temps lorsqu'il est supérieur ou égal à 3, il n'existe pas de recommandation internationale de grande ampleur sur la stratégie diagnostique à adopter pour les autres SLPC-B.

L'étude que nous présentons avait pour but d'apprécier les valeurs d'intensité de fluorescence et de pourcentage de positivité des différents marqueurs utilisés en routine dans les panels d'anticorps utilisés au CHU de Toulouse ainsi que la distribution de ces marqueurs en fonction des différents SLPC-B. Ces données représentent une aide précieuse pour le biologiste médical lors de l'interprétation quotidienne des immunophénotypes lymphocytaires.

Mon travail a consisté à analyser plus particulièrement l'utilisation de trois nouveaux marqueurs (CD180, CD200 et ROR1) à visée diagnostique.

I. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

Les lymphocytes T et B sont des cellules du système immunitaire capables de réarranger leur ADN au cours de leur fabrication. Ce réarrangement génique est nécessaire pour générer un répertoire de cellules spécifiques et aptes à répondre à n'importe quel antigène. Après leur sortie du thymus, les lymphocytes T ne subissent plus de réarrangement de leur ADN. En revanche, les lymphocytes B conservent cette capacité à modifier leur ADN lors de stimulation antigénique survenant dans une phase de prolifération cellulaire intense. Ce phénomène de réarrangement étant fréquent, les chances de « dérapage » de ce processus physiologique vers un processus oncogénique sont grandes. Ceci explique en partie l'incidence plus importante de lymphoproliférations B par rapport aux pathologies d'origine T.

Dans un premier temps nous allons nous intéresser à la physiologie du lymphocyte B en partant de sa production à partir d'une cellule souche hématopoïétique dans la moelle osseuse jusqu'à sa différenciation dans les organes lymphoïdes secondaires. Puis, nous nous focaliserons sur l'origine cellulaire des lymphomes. Enfin, nous nous concentrerons sur l'immunophénotypage des SLPC-B.

I.1. Différenciation lymphocytaire B normale

I.1.1. Lymphopoïèse B : moelle osseuse

La lymphopoïèse B s'effectue dans la moelle osseuse, l'organe lymphoïde primaire de la différenciation lymphoïde B et elle fait appel à des mécanismes génétiques et épigénétiques. Le microenvironnement médullaire participe au développement des lymphocytes B par l'apport de facteurs de croissance et de cytokines mais aussi par des interactions cellulaires. Ces interactions déclenchent l'expression de facteurs de transcription qui guident le développement et la différenciation lymphocytaire à chacune de ses étapes (2).

I.1.1.1 Cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes perdent leur capacité d'auto-renouvellement et se différencient lorsqu'elles cessent leur contact avec les ostéoblastes de la travée osseuse en se dirigeant vers les sinus veineux médullaires pour rejoindre ensuite la circulation sanguine. La lymphopoïèse correspond à un processus graduel de perte des différentes options de différenciation de la cellule souche initiale, à laquelle se joignent de nouvelles propriétés plus spécifiques.

I.1.1.2 Progéniteur multipotent

Le passage du stade le plus indifférencié au stade de progéniteur multipotent se matérialise au niveau moléculaire par l'apparition de l'expression du récepteur Flt3. Le progéniteur multipotent progresse ensuite vers la voie lymphoïde en se différenciant en progéniteur lymphoïde très précoce (ou PLP) en exprimant les enzymes RAG1 et RAG2 responsables du réarrangement des différents segments des gènes codant pour les chaînes d'immunoglobulines. L'initiation du réarrangement des segments D et J du gène de la chaîne lourde (H : heavy) par la recombinaison permet d'aboutir à la création d'un progéniteur T

précoce qui rejoindra le thymus, soit d'un progéniteur lymphoïde commun encore capable de différenciation en lymphocytes T, B, NK ou en cellule dendritique.

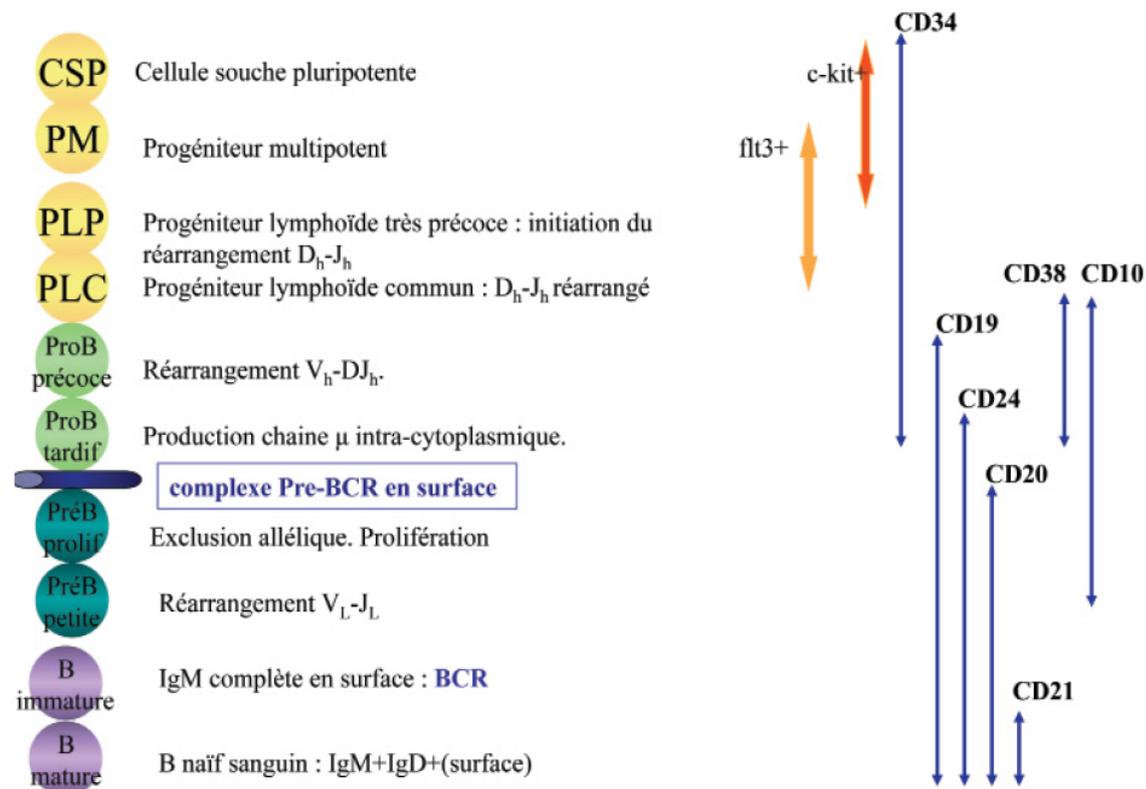


Figure 1 : Lymphopoïèse B. Les différents stades en fonction du réarrangement des gènes et des marqueurs de différenciation (3)

I.1.1.3 Stade pro-B

Au stade suivant de cellule pro-B précoce, le marqueur CD19 s'exprime et les segments $VH-DJH$ se réarrangent. Lorsque que le réarrangement est productif, la chaîne lourde complète μ peut être synthétisée dans la cellule pro-B tardive. Le passage au stade suivant de pré-B est déterminé par la présence du complexe pré-BCR à la surface du lymphocyte. Ce complexe pré-BCR correspond à l'association de la chaîne lourde μ à une protéine remplaçant la chaîne légère, la « Surrogate Light Chain » (SLC) (4).

I.1.1.4 Stade pré-B

Au stade pré-B précoce l'exclusion allélique se met en place, c'est-à-dire qu'un seul locus réarrangé sera exprimé dans une cellule et sa descendance. L'étape suivante se matérialise par le réarrangement des segments des gènes codants pour la chaîne légère. Si le réarrangement est productif, le lymphocyte exprime une immunoglobuline de surface M complète, chaîne lourde et légère, et devient un lymphocyte B immature.

I.1.1.5 Lymphocyte B immature

Ces lymphocytes B immatures, qui expriment un récepteur des cellules B (BCR) complet subissent à présent le processus de sélection négative qui vise à éradiquer les lymphocytes auto-réactifs. Les lymphocytes survivants correspondent aux lymphocytes B naïfs. Ils co-expriment à présent des IgM et des IgD de surface par épissage alternatif du gène codant pour la partie constante de la chaîne lourde H.

I.1.2. Différenciation B dépendante de l'antigène ou immunopoïèse

I.1.2.1 Circulation des lymphocytes B à la recherche de l'antigène complémentaire

Les lymphocytes de l'organisme circulent dans les tissus, le sang, les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, plaques de Peyer de l'iléon, anneau de Waldeyer du pharynx), la lymphe puis transitent par le canal thoracique pour rejoindre à nouveau le sang. Le but de cette circulation étant la rencontre avec l'antigène afin de l'éliminer. La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte B est assurée par le BCR.

La rencontre de l'antigène par le lymphocyte B se fait soit dans le tissu, soit dans l'organe lymphoïde secondaire, l'antigène étant dans ce cas apporté par un macrophage (cellule présentatrice de l'antigène). La fixation de l'antigène sur son BCR entraîne son endocytose lui permettant par la suite d'être « digéré » pour ensuite être couplé aux molécules HLA de classe II (CMH-II) à la surface du lymphocyte (phénomène d'apprêtement antigénique).

Dans le cadre de la mise en place d'une réponse humorale dépendante du lymphocyte T (thymo-dépendante), l'antigène est ensuite présenté au TCR du lymphocyte T dans une zone riche en lymphocyte T helper du ganglion grâce au CMH-II contenant l'antigène apprêté. Des contacts CD40-CD40L et CD80/86-CD28 (signaux de co-stimulation) se produisent pour permettre la synthèse et la sécrétion de cytokines. La prolifération clonale s'effectue en suivant dans la zone sombre (Figure 2).

I.1.2.2 Induction de la réponse immune spécifique d'un antigène

Une fois la rencontre lymphocyte B – lymphocyte T achevée, certains lymphocytes B vont sécréter une IgM (réponse immune primaire) tandis que d'autres vont migrer vers une zone spécialisée du ganglion dénommée follicule primaire. Si la stimulation se poursuit, le follicule primaire se transforme en follicule secondaire avec un centre germinatif (CG). Les lymphocytes du CG vont ensuite subir plusieurs modifications dont :

- le processus d'hypermutation somatique visant à modifier les régions variables des deux chaînes d'immunoglobuline (avec le danger de remaniements du matériel génétique au moment d'une prolifération intense, ceci pour chaque stimulation antigénique au cours de la vie) et

- la commutation de classe ou « switch » isotypique permettant de remplacer le gène codant pour le fragment Fc de l'IgM par un gène codant une autre région Fc (G, A ou E).

Ces deux types d'évènements moléculaires sont permis par les interactions avec les lymphocytes T helper et les cellules folliculaires dendritiques de la zone claire (figure 2). Les lymphocytes B subissent également une sélection d'affinité visant à éliminer par apoptose les lymphocytes dont le BCR est peu réactif pour conserver les lymphocytes au BCR d'affinité plus élevée. Ces dernières cellules vont se remettre à proliférer pour augmenter leur nombre puis vont quitter le centre germinatif pour terminer leur différenciation en

lymphocyte B mémoire ou en plasmocytes. Les cellules mémoires circulent ou résident dans les organes lymphoïdes secondaires, tandis que les cellules spécialisées dans la production d'anticorps (les plasmocytes) vont rejoindre la moelle osseuse (Figure 2).

I.1.2.3 Zone marginale

D'autres types de lymphocytes B interviennent dans la réponse humorale, il s'agit des lymphocytes B de la zone marginale de la rate. Leur action est capitale puisqu'ils interviennent dans la défense anti-infectieuse vis-à-vis des antigènes polysaccharidiques des capsules bactériennes (méningocoque, pneumocoque) en déclenchant une réponse thymo-indépendante et la production d'IgM spécifiques (5). Ils contribuent à une éradication rapide et urgente d'une bactériémie. Les lymphocytes B de la zone marginale seraient considérés comme les premiers producteurs d'IgM de l'organisme.

Certaines de ces IgM sont auto-réactives et des arguments expérimentaux suggèrent que la différenciation en lymphocyte B de la zone marginale est une voie alternative pour sauver de l'apoptose des lymphocytes B faiblement auto-réactifs qui ne seraient pas autorisés dans la voie de différenciation naturelle passant par les centres germinatifs (6).

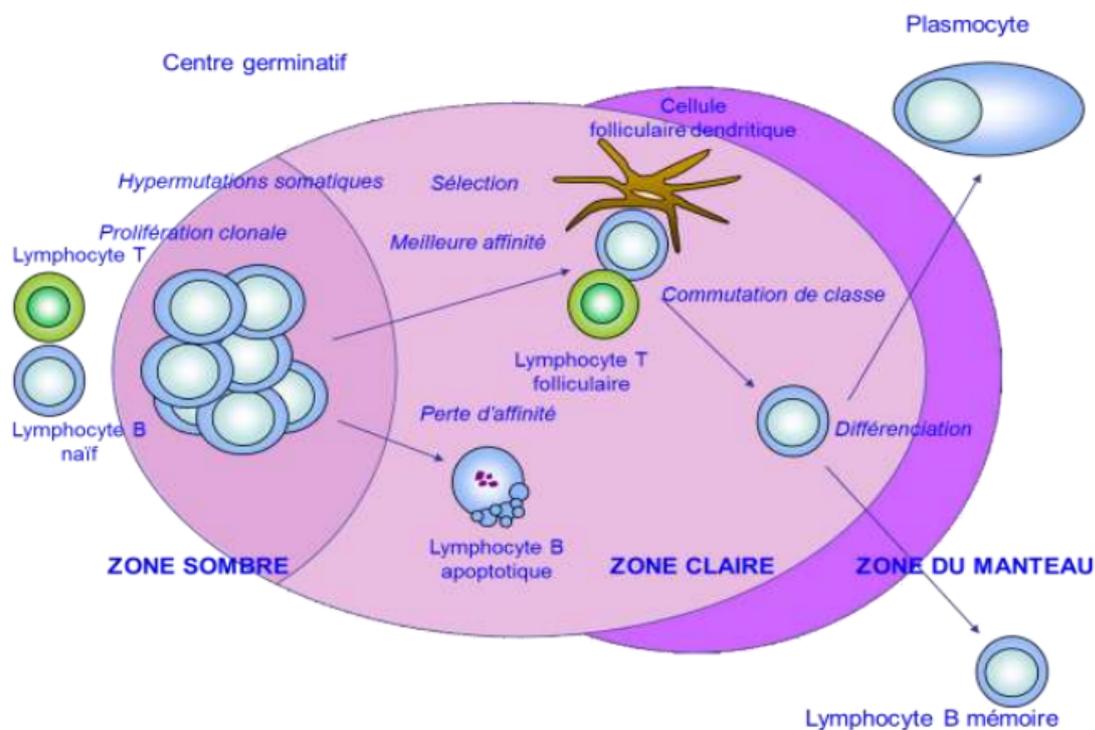


Figure 2 : Activation B dans le centre germinatif (7)

I.2. Origine cellulaire des lymphomes

Chaque étape de la différenciation lymphocytaire B peut être émaillée d'accidents oncogéniques. Lorsque les précurseurs médullaires sont affectés, il s'agit des leucémies aiguës lymphoblastiques. Lorsque ce sont les cellules B périphériques qui sont touchées on parlera de lymphome ou de leucémie.

Nous nous intéresserons ici uniquement aux proliférations B matures (d'origine périphérique) dont la présentation tumorale est ganglionnaire ou extra-ganglionnaire avec présentation leucémique potentielle.

La classification actuelle des lymphomes définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) consiste en un recensement d'entités qui doivent faire référence à la contrepartie normale chaque fois que cela est possible.

Le statut mutationnel des gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines permet de préciser le stade de différenciation de la cellule d'origine pour la plupart de ces leucémies ou lymphomes B (8) (9) . En conséquence, sont considérés comme :

- **pré-CG**, 50% des leucémies lymphoïdes chroniques et le lymphome à cellule du manteau. Les gènes des immunoglobulines sont réarrangés mais non mutés ;

- **CG**, le lymphome folliculaire, le lymphome lympho-plasmocytaire, les lymphomes B diffus à grande cellule, le lymphome de Burkitt. Les gènes des immunoglobulines sont réarrangés, mutés ou en cours de mutation et

- **post-CG**, 50% des leucémies lymphoïdes chroniques, les lymphomes de la zone marginale et la leucémie à tricholeucocytes.

Les SLPC-B sont fréquemment caractérisés par l'existence de translocations réciproques impliquant un gène des immunoglobulines et un pro-oncogène. Ce dernier se positionne au niveau du contrôle du locus de l'immunoglobuline entraînant une dérégulation de son expression. Le micro-environnement ganglionnaire joue également un rôle important puisqu'il contribue à la prolifération et à la survie des cellules lymphomateuses via l'activation de leur BCR par la présentation de l'antigène (10).

A titre d'exemple, les translocations t(11 ;14) (retrouvées dans les lymphomes du manteau) et t(14 ;18) (retrouvées dans les lymphomes folliculaires et les lymphomes B diffus à grande cellule) s'effectuent lors de la recombinaison des gènes VDJ. La t(11 ;14) juxtapose le gène *CCND1* au locus *IgH* et aboutit à une surexpression de la cycline D1, protéine qui participe au cycle cellulaire.

La Figure 3 permet de schématiser l'origine des différents lymphomes B.

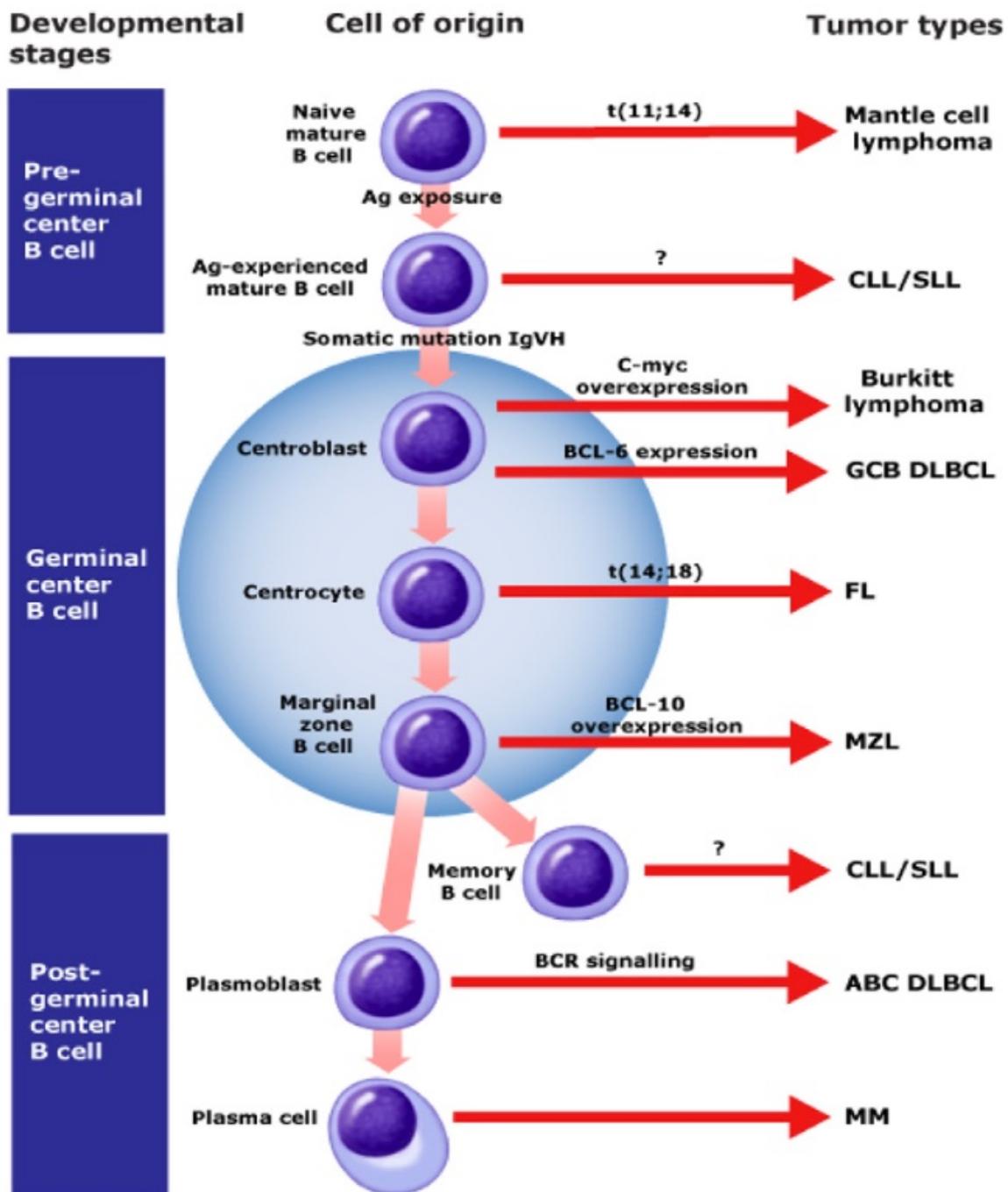


Figure 3 : Ontogénie des lymphocytes B et hémopathies malignes lymphoïdes B (11)

I.3. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

Dans un but de clarté, nous utiliserons les abréviations anglo-saxonnes validées par l'OMS.

a) La leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (CLL) représente 1% des cancers et 12.5% des hémopathies malignes en Europe. En France, le nombre de cas annuels de CLL est estimé en 2011 à 3798 cas incidents. La CLL touche plus fréquemment les hommes (56.5%) que les femmes (43.5%). L'incidence augmente avec l'âge, 45% des cas sont observés chez de sujets de plus de 75 ans. La survie globale est de 6.4 ans après l'âge de 75 ans.

La CLL correspond à une prolifération monoclonale de petits lymphocytes matures dans le sang, la moelle osseuse et les ganglions. On ne parle de CLL que lorsque le nombre de lymphocytes B clonaux est supérieur à 5 G/L depuis plus de 3 mois avec un score de Matutes supérieur ou égal à 4 (12). En deçà, il convient de parler de lymphocytose B monoclonale (MBL). La classification OMS 2016 des hémopathies lymphoïdes distingue la MBL de haut compte (0.5 G/L < valeur absolue des lymphocytes B clonaux < 5 G/L) et de bas compte (valeur absolue des lymphocytes B clonaux < 0.5 G/L) (13).

Le diagnostic de CLL est porté, dans plus de 80% des cas, lorsque le patient est asymptomatique devant une hyperlymphocytose de découverte fortuite. Certains patients peuvent présenter une splénomégalie, des adénopathies périphériques, une anémie ou une thrombopénie. La présence d'adénopathies et/ou de cytopénies est à la base d'une classification clinique en trois stades, établie par JL Binet en 1981 et sur laquelle repose aujourd'hui encore les décisions thérapeutiques.

Stade	Aires lymphoïdes palpables	Hémoglobine < 10g/dl ou Plaquettes < 100 G/L
A (80% au diagnostic)	<3	Non
B (15% au diagnostic)	≥ 3	Non
C (5% au diagnostic)	Quel que soit le nombre d'aires palpables	Oui

Tableau 1 : Classification de Binet

Suspecté devant l'hémogramme, le diagnostic de CLL est confirmé par l'étude des marqueurs de membrane par CMF dans le sang. Dans la forme typique, la plus fréquente, les lymphocytes sont de petite taille, avec un noyau entouré d'un anneau cytoplasmique peu étendu. La chromatine est mature, densifiée en 3 ou 4 blocs, sans nucléole. Le cytoplasme bleuté est dépourvu de granulations. Le frottis sanguin met en général en évidence des

cellules lysées appelées ombres de Gumprecht. Ce phénomène est lié à l'éclatement des lymphocytes lors de la réalisation du frottis sanguin.

Certaines CLL sont cytologiquement atypiques car moins monomorphes. Elles peuvent présenter des cellules d'allure lymphoplasmocytaire (> 15%) ou des cellules d'allure pro-lymphocytaire (> à 10% mais < à 55% des cellules lymphoïdes). Les ombres de Gumprecht peuvent être moins nombreuses ou absentes ce qui peut poser, en plus de ces formes atypiques sur le plan morphologique, un problème diagnostique. Le recours à l'immunophénotypage par CMF et à l'analyse cytogénétique est alors indispensable pour établir le diagnostic final (14).

Des anomalies cytogénétiques récurrentes ont été mises en évidence dans plus de 80% des cas. Il existe quatre altérations récurrentes : la délétion 11q, 13q et 17p et la trisomie 12. Leur recherche doit s'effectuer par technique FISH car elle est plus sensible et permet d'apprécier la taille du clone. Les délétions 17p et 11q ont un impact pronostique majeur (15). La délétion 17p entraîne une perte mono-allélique du locus *TP53*. *TP53* code pour un gène suppresseur de tumeur dont l'altération est retrouvée dans de nombreux cancers. La mutation de l'autre allèle entraîne son inactivation, ce qui induit une résistance aux analogues des purines. La délétion 13q qui est l'anomalie la plus fréquemment retrouvée est associée à un bon pronostic quand elle est isolée. La trisomie 12 est associée à une morphologie atypique des lymphocytes, à un score de Matutes égal à 3, à un pronostic plus réservé.

La recherche des mutations de TP53 et du statut mutationnel de la partie variable des immunoglobulines a été harmonisée (16) (17). La recherche du statut mutationnel pour *IGVH* permet de définir deux groupes de patients. Si la modification génétique du progéniteur B clonal intervient : à un stade de lymphocyte B naïf non muté pré-germinatif la maladie est plus agressive ; à un stade muté de lymphocyte B mémoire post-germinatif la maladie est peu évolutive (18).

b) Le lymphome de la zone marginale

Le terme de lymphome de la zone marginale (MZL) comprend 3 catégories se différenciant par le site d'envahissement :

- le lymphome du MALT (*mucosae associated lymphoid tissue*) ;
- le lymphome de la zone marginale splénique (SMZL) caractérisé par la présence ou non de lymphocytes villos circulants ou SLVL (*splenic lymphoma with villous lymphocytes*) et
- le lymphome de la zone marginale ganglionnaire.

Ils ont une origine commune et des similarités concernant une stimulation antigénique chronique possible, par des pathogènes microbiens ou par des autoantigènes. Leur symptomatologie respective reste différente.

Les MZL représentent entre 5 et 17% des SLPC-B chez l'adulte (19). Les lymphomes du MALT sont les plus fréquents (de 50 à 70% des MZL) suivis des SMZL (environ 20%) et des

MZL ganglionnaires (environ 10%). Ces entités touchent essentiellement les sujets âgés de plus de 60 ans.

- Lymphome du MALT :

La présentation clinique est variable et dépend du site d'envahissement du lymphome. Les patients présentent en général une maladie indolente avec un bon état général et l'absence de symptômes B. La maladie peut néanmoins disséminer dans d'autres sites muqueux ou non muqueux (moelle osseuse envahie dans 20% des cas).

Sur le plan cytogénétique, les altérations possibles sont multiples mais toutes affectent la voie NF-κB. Les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont les trisomies 3 et 18, ainsi que les translocations t(11 ;18), t(1 ;14), t(14 ;18) et t(3 ;14).

- Lymphome de la zone marginale splénique :

Cliniquement, les patients se plaignent d'une douleur de l'hypochondre gauche avec plus ou moins une asthénie. Parfois, il s'agit d'une découverte fortuite sur les seuls résultats de l'hémogramme. Il est alors mis en évidence une anémie et/ou une thrombopénie, résultant plus d'une séquestration splénique que d'une insuffisance médullaire. L'examen clinique met en évidence une splénomégalie. Les adénopathies périphériques sont rares tout comme les signes généraux.

L'atteinte sanguine et médullaire est présente dans 90% des cas (20). Un tiers des patients ont une lymphocytose supérieure à 9 G/L. Des manifestations auto-immunes sont retrouvées dans 10 à 15% des cas.

Le diagnostic repose sur l'examen histologique de la rate après splénectomie ou sur l'analyse de la lymphocytose sanguine.

Au niveau morphologique, les lymphocytes ont un aspect pléomorphe. Les cellules ont un aspect lymphoplasmocytaire (noyau excentré à chromatine compacte avec cytoplasme plus ou moins basophile), voire plasmocytaire ou plus rarement un aspect « monocytoïde ». Malheureusement, les cellules ont le plus souvent un aspect non caractéristique de lymphocytes matures.

La présence dans le sang de lymphocytes villeux à un taux supérieur à 20% des lymphocytes B circulants définit le lymphome splénique avec lymphocytes villeux. Il s'agit d'une phase leucémique du SMZL.

Aucune anomalie cytogénétique n'est strictement pathognomonique de la maladie. Cependant, elles peuvent être utiles au diagnostic. L'anomalie cytogénétique la plus fréquente est la trisomie 3 (85% des cas) (21). L'anomalie la plus spécifique du SMZL est représentée par la délétion ou la translocation du chromosome 7 (40% des cas) (22). D'autres anomalies comme la trisomie 18, la trisomie 12, l'isochromosome 17q, la délétion 13q et des anomalies de structure du chromosome 1 ont été décrites.

- Lymphome de la zone marginale ganglionnaire :

La majorité des patients présentent une maladie disséminée avec une atteinte ganglionnaire périphérique et profonde, un envahissement viscéral ou médullaire. Les cytopénies sont rares. Le diagnostic est anatomopathologique.

c) Le lymphome du manteau

Le lymphome du manteau (MCL) est défini par la présence de cellules de petite à moyenne taille présentant un noyau à contour irrégulier. Dans la majorité des cas, on retrouve la translocation t(11 ;14) responsable de l'hyperexpression de la cycline D1.

Le MCL est une hémopathie maligne rare (il représente seulement 6% de tous les lymphomes). Il survient chez des sujets âgés (médiane de 60 ans) avec nette prédominance masculine (sex ratio H/F=2/1) (14).

Au niveau de la présentation clinique, ce lymphome est dans la plupart des cas d'emblée généralisé, avec des adénopathies disséminées, une splénomégalie fréquente et des signes généraux. L'atteinte médullaire est habituelle (80 % des cas) et la diffusion sanguine fréquente (50 à 80 %), mais très variable en nombre. Réfractaire aux traitements, cette entité présente un pronostic particulièrement mauvais (médiane de survie de 3 ans), avec des rechutes successives sans véritable transformation ; il existe néanmoins un petit nombre de survivants à long terme.

Une hyperlymphocytose existe chez seulement 30 à 50 % des patients. Au niveau morphologique, plusieurs variants sont décrits ce qui peut poser un problème de diagnostic différentiel avec d'autres syndromes lymphoprolifératifs (14) :

- le variant à petite cellule évoquant des lymphocytes matures ;
- la forme classique avec des cellules de taille petite à moyenne avec noyau à contour irrégulier et une chromatine discrètement immature et
- la forme blastoïde dont les cellules sont de taille moyenne à grande avec une chromatine immature plus ou moins nucléolée pouvant faire penser à des cellules blastiques.

La quasi-totalité des cas de MCL présente la translocation t(11 ;14). Cette translocation engendre la juxtaposition du gène codant pour la cycline D1 (*CCDN1*) avec le gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*). Cela induit une surexpression de la *CCDN1* aboutissant à une dérégulation du cycle cellulaire. La recherche de cette anomalie s'effectue par des techniques de cytogénétique conventionnelle et/ou de FISH ou bien par des techniques d'immunohistochimie ou de RT-PCR.

Cependant, cette anomalie n'est pas systématiquement retrouvée suggérant l'implication d'autres cyclines (D2 ou D3) (23). L'absence de la t(11 ;14) ou de son équivalent moléculaire ne permet pas non plus d'exclure un LCM. La présence de cette anomalie n'est pas exclusive du MCL car elle peut être retrouvée dans d'autres hémopathies (14).

d) Le lymphome folliculaire

Le lymphome folliculaire (FL) est un lymphome qui dérive des cellules B du centre germinatif du ganglion.

Ce lymphome est fréquent puisqu'il représente 20 à 25% de tous les lymphomes et 70% des lymphomes indolents (24). Il touche essentiellement les adultes (âge médian de 59 ans) avec une prépondérance féminine (sex ratio H/F = 1/1,7).

Cliniquement, il se présente sous la forme d'un syndrome tumoral (polyadénopathies superficielles et profondes) avec atteinte médullaire fréquente. L'envahissement sanguin est rare au diagnostic puisqu'il ne dépasse pas 10% des cas. Le diagnostic positif repose dans tous les cas sur une biopsie ganglionnaire ou sur une biopsie d'organe.

En ce qui concerne l'aspect cytologique dans le sang périphérique, les cellules lymphomateuses se présentent sous la forme d'un lymphocyte légèrement plus grand qu'un lymphocyte normal avec une encoche étroite (caractéristique du FL), une chromatine compacte non mottée et sans nucléole. Le cytoplasme est quasi-inexistant. Cet aspect correspond aux centrocytes.

Au niveau chromosomique, on retrouve la translocation t(14;18) qui engendre le réarrangement du gène *BCL2* (antiapoptotique) avec le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines *IGH*. La t(14;18) est présente dans plus de 90% des cas de grade 1-2 (classification de Ann-Arbor). De rares cas peuvent présenter une translocation t(2;18) ou t(18;22). Cette anomalie peut être recherchée par des techniques de cytogénétique conventionnelle et/ou de FISH ou bien par des techniques d'immunohistochimie ou de PCR dans le but de mettre en évidence un réarrangement clonal du gène de fusion *IGH/BCL2*.

e) La leucémie à tricholeucocytes

La leucémie à tricholeucocytes (HCL) est une entité rare car elle représente environ 2% des leucémies (25). Elle est observée dans huit cas sur dix chez l'homme.

Cliniquement, elle se caractérise dans trois cas sur quatre par la présence d'une splénomégalie sans adénopathies associées. C'est souvent à l'occasion de la prescription d'un hémogramme pour asthénie que l'on découvre une neutropénie, une anémie, une thrombopénie et/ou une monocytopenie.

Au niveau morphologique, l'examen du frottis sanguin révèle la présence de grandes cellules avec un cytoplasme étendu faiblement basophile présentant de fines projections. Le rapport nucléocytoplasmique est bas avec un noyau excentré de forme ovale. La chromatine est finement dispersée avec un nucléole unique de petite taille peu ou pas visible. Ces cellules dont l'aspect est caractéristique sont appelées tricholeucocytes.

La CMF permet d'identifier les tricholeucocytes de façon aisée.

En ce qui concerne les anomalies chromosomiques, il n'existe pas d'anomalie récurrente. La réalisation du caryotype est donc inutile à des fins diagnostiques.

La mutation *BRAFV600E* est le marqueur de la HCL. Cette mutation a été retrouvée dans tous les cas de HCL étudiés tout en étant absente dans les autres SLPC-B (26).

f) Le lymphome lympho-plasmocytaire ou maladie de Waldenström

Le lymphome lympho-plasmocytaire (LPL) est caractérisé par une infiltration médullaire de lymphocytes, lymphoplasmocytes, plasmocytes sécréteurs d'une IgM monoclonale (27).

Le LPL représente 1 à 2 % des hémopathies malignes et 6 % des SLPC-B. Son incidence est deux fois plus élevée chez l'homme que chez la femme (28).

Les manifestations cliniques sont liées soit à l'infiltration médullaire soit aux propriétés de la paraprotéine. L'infiltrat tumoral se matérialise par la présence de cytopénies. Environ 20% des patients ont un syndrome tumoral avec adénopathies et/ou splénomégalie. Une atteinte d'autres organes est rare mais possible.

L'immunoglobuline monoclonale peut engendrer, par ses propriétés physico-chimiques, un syndrome d'hyperviscosité, une cryoglobuline de type I, une maladie de Willebrand acquis ou encore une amylose AL. Par ses propriétés antigéniques, l'IgM peut reconnaître des déterminants antigéniques des nerfs périphériques et engendrer une neuropathie périphérique. Lorsqu'elle cible des immunoglobulines elle entraînera une cryoglobuline de type II puis lorsqu'elle est dirigée contre les globules rouges elle donnera une agglutinine froide.

Au niveau cytologique, l'infiltrat médullaire est caractérisé par une population lymphoïde polymorphe constituée de lymphocytes, lymphoplasmocytes et de plasmocytes. Les mastocytes peuvent être augmentés (29). Les cellules lymphoplasmocytaires peuvent se retrouver de façon inconstante dans le sang périphérique, mais il est fréquent de retrouver la présence d'hématies en rouleaux au frottis sanguin.

En ce qui concerne les anomalies cytogénétiques, la délétion du bras court du chromosome 6 est la plus retrouvée suivie par la trisomie 18, la délétion 13q14 et la trisomie 4. D'autres anomalies existent dans des proportions plus faibles mais ne présentent pas d'intérêt diagnostique. Seule la trisomie 4 est spécifique du LPL (29).

La mutation *MYD88 L265P* représente un marqueur spécifique du LPL. Elle est exprimée dans 91% des LPL et dans seulement 6.5% des MZL (29).

g) Les lymphomes B diffus à grande cellule

Les lymphomes B diffus à grande cellule (DLBCL) représentent l'entité la plus fréquente des lymphomes non hodgkiniens, devant la CLL. Ils correspondent à 30% de l'ensemble des lymphomes (30).

Cliniquement, la majorité de ces lymphomes se présente par une localisation ganglionnaire. L'existence de symptômes B est très évocatrice. On recherche la présence de fièvre supérieure à 38°C sans cause apparente pendant plus d'une semaine, des sueurs nocturnes et une perte de poids de 10% ou plus dans les 6 derniers mois. Les masses ganglionnaires profondes peuvent être révélatrices des symptômes de compression qu'elles engendrent.

Le diagnostic repose sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie. Une analyse histologique et immunohistochimique sera pratiquée. Celle-ci sera éventuellement complétée par un immunophénotypage, une analyse cytogénétique ainsi que par de la biologie moléculaire.

Les DLBCL correspondent à une expansion clonale de grandes cellules, soit des centroblastes, soit des immunoblastes, soit un mélange des deux. Les DLBCL ne disséminent pas dans le sang au diagnostic. En revanche, certains patients qui rechutent vont présenter une phase leucémique et une infiltration médullaire. La cytologie sanguine des rechutes est non spécifique et peut être en faveur de la présence de blastes. Le cytologiste doit penser au DLBCL car le contexte clinique est différent d'une leucémie aigüe, le nombre de cellules est peu important, leur taille est moyenne à grande voire immense et elles ressemblent parfois à des lymphoblastes ou à des lymphocytes activés avec un ou plusieurs nucléoles.

De nombreuses anomalies cytogénétiques récurrentes ont été mises en évidence dans le DLBCL. Aucune n'est strictement spécifique. Toutes contribuent à l'apparition de ce lymphome, selon la théorie de l'accumulation des anomalies des anomalies génétiques. L'anomalie de la région 3q27 impliquant l'oncogène *BCL6* est la plus fréquente (20 à 40% des cas). Cette anomalie n'a pas de caractère pronostique. Des anomalies de l'oncogène *BCL2* sont aussi possibles (dans 20% des cas) et parfois observées dans des LF transformés. Cette anomalie serait associée à un pronostic défavorable. D'autres anomalies ont été décrites, notamment celles impliquant l'oncogène C-Myc (30).

Les profils d'expression génique analysés par la méthode des micro-arrays identifient deux signatures différentes : l'une de type « centre germinatif », l'autre de type « lymphocyte activé ».

h) Leucémie pro-lymphocytaire B

La leucémie pro-lymphocytaire B (B-PLL) est une hémopathie rare car elle représente moins d'1% des SLPC-B.

Cette entité est définie par la présence de prolymphocytes B dans le sang, la moelle osseuse et la rate. Ces cellules doivent représenter au moins 55% des cellules lymphoïdes dans le sang selon l'OMS (31).

Les patients présentent classiquement une splénomégalie palpable, avec peu ou pas d'adénopathies. L'hyperlymphocytose est importante (autour des 100 G/L). Il s'agit d'une hémopathie en général agressive. La B-PLL peut survenir de novo, ou bien apparaître au décours d'une CLL.

Les cellules prolymphocytaires sont de grande taille avec un noyau présentant une chromatine relativement mottée, un volumineux nucléole avec un rapport nucléocytoplasmique bas.

Il n'existe pas d'anomalie spécifique de la B-PLL. Les caryotypes sont souvent complexes ; plusieurs anomalies récurrentes ont été rapportées, comme les translocations t(11 ;14) et

t(6 ;12), les trisomies 3 et 12. Des anomalies impliquant le gène C-Myc ont été observées (32).

Le diagnostic basé sur la morphologie et l'immunophénotype ne nécessite pas d'étude du réarrangement clonal du gène des immunoglobulines.

I.4. Immunophénotypage des SLPC-B

I.4.1. La cytométrie en flux

I.4.1.1 Principe et composition d'un système de cytométrie en flux

Née du besoin de compter de façon automatisée les éléments figurés du sang, la cytométrie en flux (CMF) est une technique analytique rapide et très sensible qui permet une évaluation précise des sous-populations cellulaires dans des prélèvements sanguins, médullaires ou des liquides de ponction.

La CMF est la mesure (-métrie) des propriétés des éléments cellulaires (-cyto) se déplaçant en suspension dans une gaine (flux). La CMF regroupe à elle seule plusieurs technologies (Figure 4) :

- La fluidique
- L'optique
- L'électronique et l'informatique

Les cellules sont incubées au préalable avec des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Les mesures sont effectuées lorsque les cellules défilent dans un flux liquidien devant une ou plusieurs sources lumineuses excitatrices (laser).

Les signaux de fluorescence sont ensuite captés en temps réel par des détecteurs (photomultiplicateurs) qui amplifient et transforment ces signaux en signaux électroniques, eux-mêmes convertis en évènements par le système informatique.

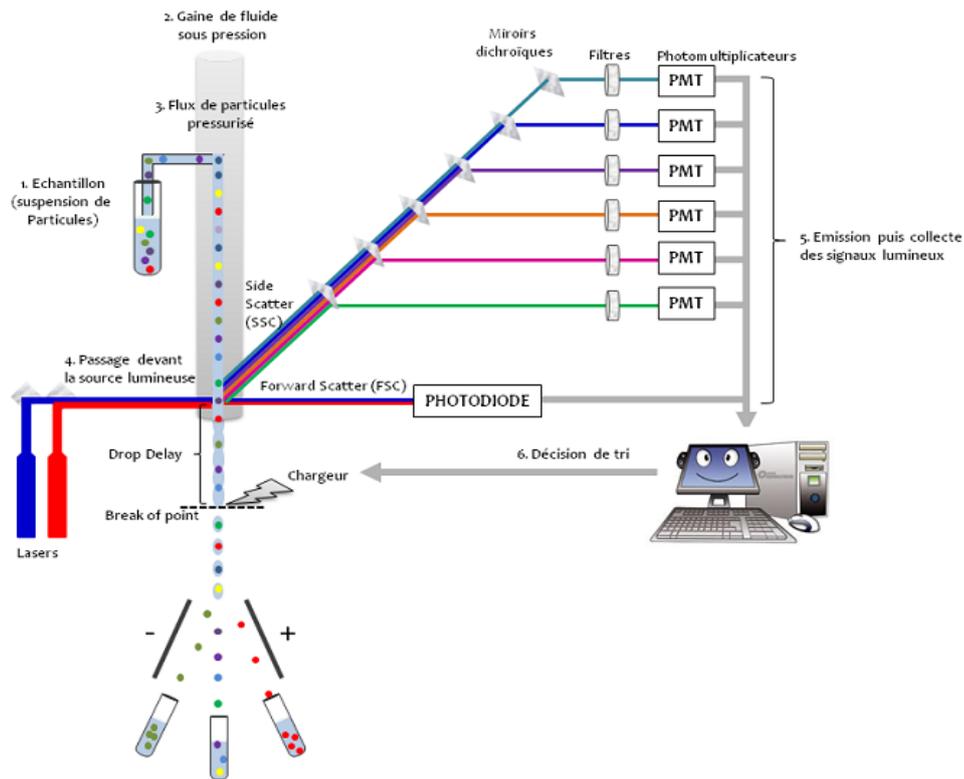


Figure 4 : Schéma général d'un cytomètre en flux

<http://www.bfa.univ-paris-diderot.fr/spip.php?rubrique99>

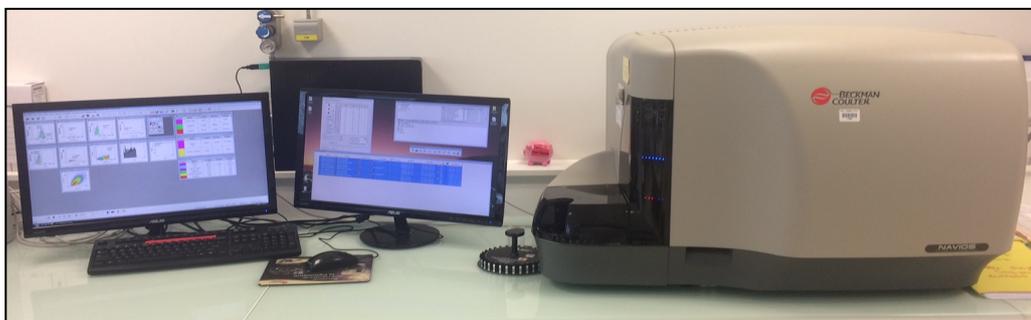


Figure 5 : Exemple de cytomètre Beckman Coulter ® au CHU de Toulouse. Modèle Navios ®

I.4.1.2 Le système fluide

La suspension cellulaire à analyser est injectée sous pression au centre du liquide de gaine de façon à focaliser hydrodynamiquement les cellules qui passeront une à une devant le faisceau laser.

Le débit d'échantillon cellulaire doit être maîtrisé et inférieur à celui du liquide de gaine pour garantir aux cellules un bon centrage garant de la précision des résultats.

I.4.1.3 Le système optique

La source d'excitation lumineuse (laser) permet l'excitation du fluorochrome à une longueur d'onde proche de son maximum d'absorption. Le laser présente comme avantage de pouvoir focaliser son faisceau sur une seule cellule à la fois.

L'excitation du fluorochrome engendre l'émission d'un signal lumineux de longueur d'onde plus importante appelé photon. Ce photon est capté par le photomultiplicateur grâce à des miroirs dichroïques et des filtres.

Les miroirs dichroïques ont la capacité de transmettre les longueurs d'ondes non réfléchies.

Les filtres ont une bande passante définie et une capacité de transmission maximale. Le choix d'un filtre s'effectue selon leur capacité à sélectionner le maximum de lumière émise pour chaque fluorochrome utilisé.

I.4.1.4 L'électronique

L'énergie lumineuse (fluorescence) recueillie par le photomultiplicateur est ensuite convertie en signal électrique. Ce signal électrique est ensuite amplifié et retraité par l'ordinateur grâce à un convertisseur analogique-digital.

Le traitement du signal électronique ne peut se faire que si l'opérateur a défini au préalable un seuil de discrimination, c'est-à-dire une valeur seuil au-delà de laquelle les signaux seront analysés, ainsi que le ou les paramètres déclencheurs.

I.4.1.5 L'informatique, le calcul et la représentation des résultats

Le logiciel informatique représente les résultats sous différentes formes :

- Histogramme monoparamétrique, où l'abscisse représente l'intensité du signal (en unité arbitraire) et l'ordonnée le nombre d'évènement par canal. (Figure 6)
- Histogramme biparamétrique : corrélation entre deux paramètres mesurés (Figure 7)

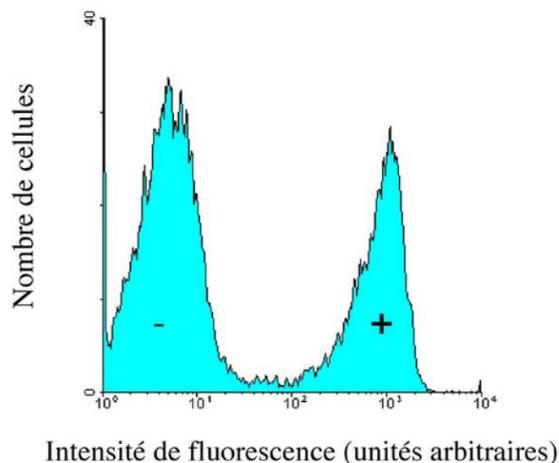


Figure 6 : Histogramme monoparamétrique représentant l'intensité d'expression pour un paramètre donné en fonction du nombre de cellules concernées. Sur ce graphe est représentée deux populations, l'une négative, l'autre positive. (33)

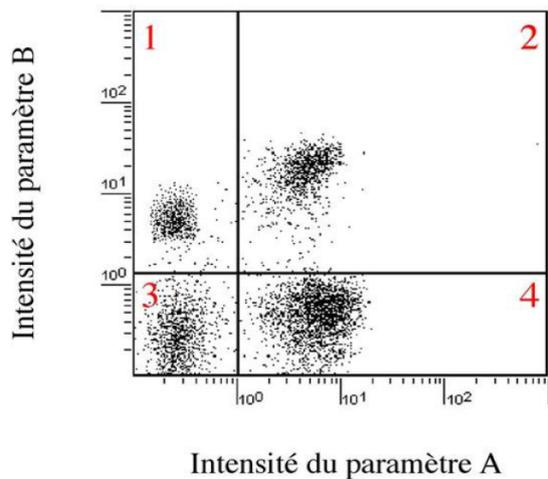


Figure 7 : Histogramme biparamétrique représentant l'intensité du paramètre A en abscisse et l'intensité du paramètre B en ordonnée. Le graphe se présente sous forme de points ou « dots blots ». Le quadrant 1 représente les cellules positives pour le paramètre B et négatives pour le paramètre A. Le quadrant 4 représente les cellules positives pour le paramètre A et négatives pour le paramètre B. Le quadrant 2 correspond aux cellules doublement positives alors que le quadrant 3 correspond aux cellules doublement négatives. (33)

I.4.1.6 Les paramètres analysables

La CMF permet d'analyser deux autres paramètres essentiels et indépendants des anticorps monoclonaux. Il s'agit du forward angle scatter (FAS ou FS) renseignant sur la taille de la cellule et du right angle scatter (RAS ou SSC) renseignant sur la granularité de la cellule ou sa complexité. Le FAS correspond à la mesure de la lumière dans l'axe de la cellule alors que le RAS correspond à la mesure la lumière déviée à 90° de l'axe de la cellule (Figure 8).

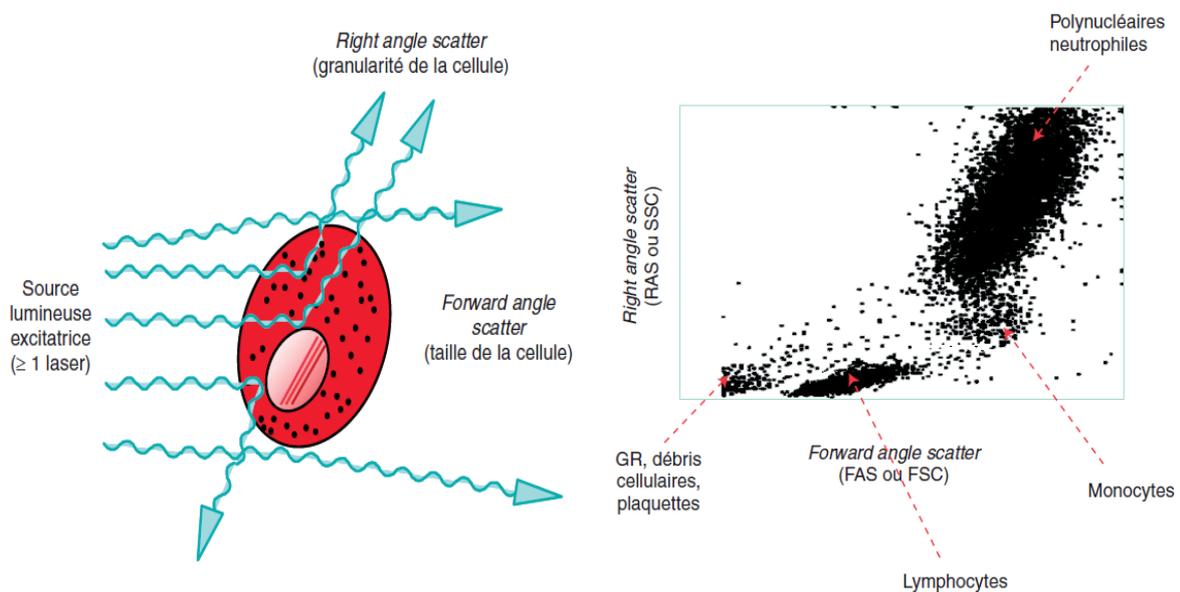


Figure 8 : Informations morphologiques apportées par la CMF (A) (34). Ciblage de la population d'intérêt par CMF. Graphique représentant la taille (FAS ou FSC) en fonction de la granularité (RAS ou SSC) (B) (34)

Le fenêtrage de la population leucocytaire d'intérêt est réalisé sur ce graphe en représentation biparamétrique avec la taille en fonction de la granularité (Figure 8).

Une fois la population d'intérêt ciblée, les paramètres de fluorescence de chaque fluorochrome couplé aux anticorps monoclonaux sont étudiés. Les fluorochromes absorbent l'énergie du laser et la restituent ce qui permet de quantifier un antigène à la surface, ou dans le cytoplasme, de la cellule (Figure 8). L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'expression du marqueur cellulaire, sous réserve de travailler en condition saturante d'anticorps monoclonaux, ce qui est la règle usuelle.

I.4.1.7 Les fluorochromes

Chaque fluorochrome est une molécule qui doit être excitable par l'émission d'un laser (spectre d'excitation) et émettre une lumière distincte de celle produite par les autres fluorochromes, mesurable par le système optique du cytomètre (spectre d'émission) (35) (Figure 9).

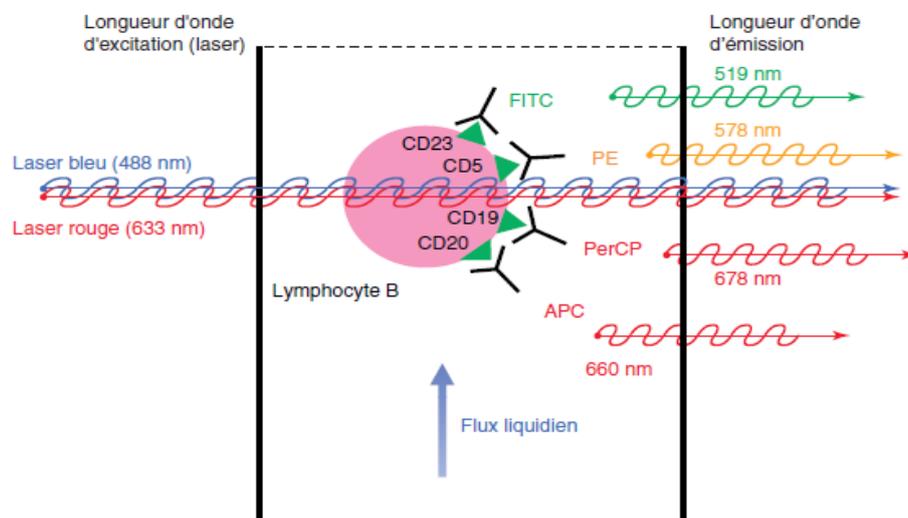


Figure 9 : Principe de la fluorescence dans la cytométrie en flux (34). Dans cet exemple est représenté un lymphocyte B exprimant les marqueurs CD19, CD20, CD5 et CD23. FITC : fluoroisothiocyanate de fluorescéine. PE : phycoérythrine. PerCP : peridinine chlorophylle protéine

I.4.1.8 Préparation et analyse des échantillons

Le respect de l'étape pré-analytique est crucial pour assurer un résultat de qualité optimale. Les marquages sont effectués sur des cellules vivantes en suspension, c'est pourquoi les échantillons sanguins et médullaires nécessitent d'être anticoagulés. L'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) ou l'héparinate de lithium sont classiquement utilisés. L'analyse est également possible sur un liquide de ponction mais nécessite une prise en charge rapide car les cellules ne se trouvent pas dans des conditions favorables à leur survie.

Quel que soit la nature de l'échantillon, la conservation des cellules pour analyse en CMF se fait à température ambiante, entre 10 et 25°C. Les prélèvements ne doivent pas être stockés dans le froid car celui-ci fragilise les cellules. Le traitement du prélèvement doit se faire le plus rapidement possible, idéalement dans les 24 heures.

La lyse des globules rouges, en très grande quantité par rapport aux leucocytes, permet de limiter les interférences lors de l'enregistrement des informations par le cytomètre. La concentration des leucocytes peut être ajustée par dilution en fonction de la richesse du prélèvement.

Avant le marquage par les anticorps monoclonaux, il est préconisé de laver les échantillons par une solution tampon isotonique de type PBS (phosphate buffered saline) pour éliminer les immunoglobulines circulantes qui peuvent interférer avec les marquages, notamment ceux des chaînes légères (kappa et lambda) ou lourdes des immunoglobulines.

L'étape finale consiste à ajouter les anticorps monoclonaux pour les laisser incuber avec les cellules pendant 15 à 30 minutes, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Les anticorps non fixés sont éliminés par un nouveau lavage.

Il est également possible de marquer les cellules en intra-cytoplasmique ou en intra-nucléaire par une étape supplémentaire de perméabilisation.

I.4.2. Application en hématologie

Historiquement, la classification des lymphomes reposait fortement sur des critères cytomorphologiques propres à chaque entité. Le développement de nouvelles techniques d'analyse et l'évolution des connaissances a permis de définir de nouvelles approches diagnostiques. La classification s'est aujourd'hui transformée en un processus multiparamétrique qui combine des données morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques, anatomopathologiques, de biologie moléculaire ainsi que des informations sur la présentation clinique de la maladie (36).

I.4.2.1 Objectifs de la CMF dans les SLPC-B

Lors de la suspicion d'un SLPC-B devant la persistance d'une hyperlymphocytose (supérieure à trois mois) ou sur des critères cliniques, la réalisation d'un frottis sanguin à la recherche de lymphocytes atypiques combinée à la réalisation d'un immunophénotypage lymphocytaire permet de détecter, facilement et rapidement (en quelques heures), le caractère pathologique de la population.

La CMF occupe une place décisive dans le diagnostic des SLPC-B comme le montre la classification OMS de 2008 sur les hémopathies. La classification OMS de 2016 qui vient de paraître prend en compte les données moléculaires obtenues grâce aux techniques de séquençage et les modifications concernant les caractéristiques immunophénotypiques sont mineures.

I.4.2.2 Panels d'identification dans le SLPC-B

La mise au point de panel d'identification constitue une étape clé dans le diagnostic et le suivi de la plupart des hémopathies malignes, en particulier dans les SLPC-B. Ces panels d'anticorps doivent permettre de desceller de manière fiable et rapide la présence d'une monotypie, l'existence d'un trou phénotypique, la perte ou le gain d'un marqueur en particulier. Ils concourent également à la classification de l'hémopathie, à l'évaluation du pronostic et à la détection de la maladie résiduelle (MRD).

L'analyse des lymphocytes B par CMF est réalisée de façon séquentielle afin d'obtenir une démarche pertinente d'analyse et afin de limiter les coûts.

Après avoir identifié l'appartenance de la cellule à la lignée B, la nature tumorale de la prolifération est confirmée par la mise en évidence d'une monotypie se définissant par une restriction isotypique (kappa ou lambda). Cette monotypie constitue un critère majeur pour le

diagnostic de SLPC-B. L'utilisation de marqueurs particuliers d'expression aberrante permet ensuite l'orientation vers un sous-groupe de lymphome.

Les lymphocytes expriment des clusters de différenciation (CD) qui sont des antigènes de surface. Ces CD définissent un type cellulaire et éventuellement leur fonction.

Devant l'existence d'un grand nombre d'antigènes cellulaires, une classification internationale a été créée. Ce répertoire existe depuis 1982 et liste les CD (37). Cette liste est régulièrement mise à jour ; la dernière date de janvier 2016 et référence 371 CD (www.hcdm.org).

- Identification de la population lymphocytaire B (assignation de lignage) :

Le premier antigène d'origine B décrit fut le CD20. Depuis, beaucoup d'antigènes spécifiques à la lignée B (antigènes pan-B) ont été identifiés : le CD19, le CD22, le CD79a et le CD79b (36).

Le marqueur le plus communément utilisé pour identifier l'ensemble de la population lymphocytaire B est le CD19. Ce marqueur est présent à tous les stades de maturation, du lymphoblaste B en passant par le lymphocyte B puis au plasmocyte.

Certains SLPC-B présentent une sous-expression du CD19, ce qui peut représenter une difficulté de détection de certaines sous-populations particulières parmi les lymphocytes B normaux. Les faibles niveaux d'expression de CD19 se manifestent le plus souvent dans les lymphomes folliculaires mais peuvent se rencontrer de façon occasionnelle dans d'autres SLPC-B. Inversement, le CD20 est faiblement exprimé dans la CLL.

Pour surmonter le problème causé par une expression diminuée du CD19, il est conseillé de l'utiliser en combinaison avec le CD20 (36)(38).

- Stade de maturation du lymphocyte B :

Il est possible d'obtenir des informations sur le stade de développement cellulaire du clone lymphocytaire B en étudiant l'expression du CD10. Le CD10 est exprimé par les cellules B immatures et les cellules B de la zone folliculaire du centre germinatif des ganglions, d'où l'expression forte dans les FL. Les cellules B matures ont une expression faible en CD10 (36)(38).

- Clonalité de la population B :

Dans la plupart des cas, le niveau de représentation de la population clonale parmi la population saine est important. La population clonale exprime une seule chaîne légère kappa ou lambda. Une fois l'immunoglobuline libre éliminée par lavage, il est facile de déterminer l'expression de la chaîne légère en utilisant la CMF. Le rapport kappa sur lambda est déséquilibré en faveur de l'une des deux chaînes (normalement de 2/3 pour kappa et 1/3 pour lambda).

En cas de faible clone circulant, il est judicieux de combiner le caractère de restriction isotypique avec l'expression d'un marqueur aberrant de la lignée lymphoïde B comme le CD5. La population clonale se détachant de la population normale.

La restriction isotypique n'est toutefois pas complètement synonyme de clonalité. En effet, il existe des exemples dans la littérature pour lesquels une restriction isotypique est retrouvée sans caractère clonal. Citons l'exemple de l'infection par le HIV (39).

C'est pourquoi les résultats de l'immunophénotypage lymphocytaires doivent être confrontés absolument à l'ensemble des données cliniques, cytologiques et génotypiques disponibles.

- Marqueurs aberrants de la population clonale :

Une fois le fenêtrage de la population d'intérêt terminé, il est possible d'examiner l'immunophénotype de ces cellules en détail. Chaque sous-population de cellules normales exprime un immunophénotype spécifique et les phénotypes anormaux permettent de s'orienter vers une entité en particulier de la classification des hémopathies lymphoïdes.

Si un phénotype spécifique d'une maladie a été identifié, il est possible de distinguer ces cellules néoplasiques de toutes les autres populations en fonction des différences d'expression de l'antigène. Le clone pourra se distinguer de la cellule normale par l'apparition d'un marqueur aberrant (exemple du CD5 dans la CLL, ou du CD10 dans le FL) ou au contraire par la disparition d'un marqueur physiologique. Pour d'autres marqueurs, c'est l'intensité d'expression qui est modifiée par rapport aux lymphocytes normaux.

L'immunophénotypage permet aussi de rechercher l'expression de marqueurs ayant un impact pronostique, comme le CD38 dans la CLL. Il influencera également l'initiation de certaines immunothérapies comme le Rituximab ® (anti-CD20) ou l'Alemtuzumab ® (anti-CD52).

L'élaboration d'un panel d'anticorps d'exploration des SLPC-B est délicate. La plupart du temps, les laboratoires utilisent en première intention un mélange d'anticorps permettant le dépistage de la population clonale. Si la recherche est positive, un panel d'exploration complémentaire est lancé permettant de caractériser plus précisément la population clonale en question.

L'analyse cytologique est indispensable et doit être réalisée en parallèle de l'analyse par CMF. Cette analyse morphologique peut dans certains cas orienter directement le panel d'anticorps à tester en raison de la présence de celles caractéristiques sur le frottis sanguin ou médullaire (exemple de la leucémie à tricholeucocytes).

En conclusion, les données de l'immunophénotypage lymphocytaire doivent impérativement être intégrées à l'ensemble des données disponibles. La confrontation aux données morphologiques, cytogénétiques, histologiques et cliniques est essentielle pour assurer la classification correcte des SLPC-B (40) (41) (42) (43).

I.4.2.3 Marqueurs d'intérêt dans l'évaluation des différents SLPCB

Marqueur	Distribution normale	Intérêt clinique
CD5	Lymphocytes T et minorité de Lymphocytes B	CLL, MCL
CD10	Lymphocytes T et B immatures, neutrophiles et minorité de Lymphocytes T et B	FL
CD11c	Quelques lymphocytes T et B	HCL. Parfois faible expression dans CLL, LPL, MZL, SLVL

CD19	Tous les lymphocytes B en incluant les lymphoblastes B, les lymphocytes B matures. Parfois les plasmocytes	Assignation à la lignée B. Intensité d'expression anormale dans les SLPCB
CD20	Acquis durant la maturation des précurseurs B (hématogones). Lymphocytes B matures	Assignation à la lignée B. Intensité d'expression diminuée dans la CLL, augmentée dans le FL.
Chaînes légères Kappa ou Lambda de surface	Lymphocytes B matures	Marqueur de restriction isotypique
Chaînes Kappa ou Lambda cytoplasmiques	Plasmocytes et Lymphocytes B	Marqueur de restriction isotypique
CD22	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible expression dans la CLL
CD23	Intensité d'expression faible sur les Lymphocytes B non activés. Intensité d'expression augmentée avec l'activation	Diagnostic différentiel entre la CLL et les autres syndromes lymphoprolifératifs CD5+
CD25	Lymphocytes B et T activés	Leucémie à tricholeucocytes
CD38	Cellules centro-folliculaires, Lymphocytes T immatures, plasmocyte.	Différenciation plasmocytaire. Marqueur pronostique dans la CLL
CD43	Lymphocytes T et une minorité de Lymphocytes B	Expression aberrante dans la CLL, rares MCL et MZL
CD45	Tous les lymphocytes B et T avec une intensité d'expression supérieure aux précurseurs.	Utilisé pour distinguer les néoplasies lymphoïdes matures (intensité forte) des néoplasies immatures (intensité faible à négative)
CD79b	Lymphocytes B immatures. Expression variable dans le Lymphocyte B mature	Assignation à la lignée B. Faible intensité d'expression dans la CLL.
CD103	Minorité de Lymphocytes B. Lymphocyte T des muqueuses	HCL. Certains MZL
CD160	Lymphocytes NK et T CD8	HCL. LLC ?
CD200	Macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, polynucléaires, Lymphocytes B, Lymphocytes T activés.	Diagnostic différentiel CLL/MCL
FMC7	Lymphocytes B	Diagnostic différentiel des CLL (négatives) des autres SLPC-B CD5+ souvent positifs.
bcl-2	Lymphocytes T, minorité de Lymphocytes B	FL
Zap-70	Lymphocytes NK et T. Précurseurs des lymphocytes B	Marqueur pronostique dans la CLL

Tableau 2 : Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (40) (44)

I.4.3. Immunophénotypage des différents SLPC-B

Dans l'évaluation et l'interprétation des SLPC-B par cytométrie en flux, il est pratique de distinguer quatre profils d'expression phénotypique différents. Ces quatre groupes sont définis par leur niveau d'expression en CD5 et CD10 :

- CD5+ / CD10 - : CLL et MCL essentiellement ;
- CD5- / CD10 + : FL le plus fréquemment ;
- CD5- / CD10 - : MZL et HCL majoritairement ;
- CD5+ / CD10+ : co-expression rare.

Pour chaque groupe, la combinaison des données cytométriques et morphologiques peut permettre d'orienter le type d'examen complémentaire à réaliser (40).

Entités maladies	Caractéristiques phénotypiques discriminantes	Informations diagnostiques supplémentaires
CD5+ / CD10-		
CLL	<u>Phénotype typique :</u> CD20 (d), CD22 (d), slg (d), CD23+, FMC7-	Caractéristiques morphologiques
MCL	<u>Phénotype variable, non typique de CLL :</u> Souvent CD20 (i), slg (i), CD23 +/-, FMC7 +/-	Cycline-D1 IHC / réarrangement t(11 ;14) cycline D1/ <i>CCND</i>
B-PLL	<u>Phénotype variable pouvant se chevaucher entre la CLL et le MCL :</u> CD20 (+i), slg (i+), FMC7 +/-, CD5 +/-	Cellules proéminentes nucléolées
MZL	<u>Phénotype variable, non typique de CLL :</u> CD23-, souvent CD11c +/-, CD103 +/- (non typique de HCL), parfois et seulement clg	Développement dans les follicules, possibilité de différenciation lymphoplasmocytaire, réarrangement t(11 ;18), t(1 ;14), t(14 ;18)/ <i>MALT1</i>
LPL	<u>Phénotypique non typique de CLL :</u> Souvent CD23 (-/d), souvent slg- mais clg+	Petites cellules avec une partie de différenciation lymphoplasmocytaire. Principalement dans le sang périphérique et la moelle

		osseuse.
DLBCL	<u>Phénotype variable</u>	Grandes cellules. Considéré comme une transformation de Richter de la CLL et du MCL.
CD5- / CD10 +		
FL	Habituellement bcl-2+, CD43-	Quelques développements folliculaires. Réarrangement t(14 ;18)/ <i>BCL2</i>
HCL	<u>Phénotypique typique :</u> CD20 (f), CD22 (f), CD11c (f), CD25+, CD103+, slg (i), CD123+	Morphologie caractéristique. Annexine-A1 +
DLBCL	<u>Phénotype variable</u>	Grandes cellules. Considéré comme une transformation de Richter de la CLL et du MCL.
CD5- / CD10 -		
HCL	<u>Phénotypique typique :</u> CD20 (f), CD22 (f), CD11c (f), CD25+, CD103+, slg (i), CD123+	Morphologie caractéristique. Annexine-A1 +
MZL	<u>Phénotype variable, non typique de CLL :</u> CD23-, souvent CD11c +/-, CD103 +/- (non typique de HCL), parfois et seulement clg	Développement dans les follicules, possibilité de différenciation lymphoplasmocytaire, réarrangement t(11 ;18), t(1 ;14), t(14 ;18)/ <i>MALT1</i>
LPL	<u>Phénotypique non typique de CLL :</u> Souvent CD23 (-/d), souvent slg- mais clg+	Petites cellules avec une partie de différenciation lymphoplasmocytaire. Principalement dans le sang périphérique et la moelle osseuse.
FL CD10-	<u>Phénotype variable</u>	Quelques développements folliculaires. Réarrangement t(14 ;18)/ <i>BCL2</i>
MCL CD5-	<u>Phénotype variable</u>	Cycline-D1 IHC / réarrangement t(11 ;14)

		cycline D1/ <i>CCND</i>
DLBCL	<u>Phénotype variable</u>	Grandes cellules. Considéré comme une transformation de Richter de la CLL et du MCL.
CD5+ / CD10 +		
FL	Habituellement bcl-2+, CD43-	Quelques développements folliculaires. Réarrangement t(14 ;18)/ <i>BCL2</i>
MCL	<u>Phénotype variable, non typique de CLL :</u> Souvent CD20 (i), slg (i), CD23 +/-, FMC7 +/-	Cycline-D1 IHC / réarrangement t(11 ;14) cycline D1/ <i>CCND</i>
DLBCL	<u>Phénotype variable</u>	Grandes cellules. Considéré comme une transformation de Richter de la CLL et du MCL.

Tableau 3 : Approche diagnostique immunophénotypique dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

I.4.3.1 Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B CD5+/CD10-

Les SLPC-B CD5+/CD10+ sont classiquement représentés par la CLL et le MCL. Dans une proportion beaucoup plus faible, certains MZL, B-PLL ou LPL peuvent exprimer le CD5. Il est important de rappeler que le CD5 est exprimé de manière physiologique sur le lymphocyte B et ne peut donc pas être utilisé comme marqueur de clonalité (45).

a) La leucémie lymphoïde chronique

La CLL fait partie des lymphoproliférations chroniques B les mieux définies sur le plan phénotypique. Après avoir déterminé son appartenance à la lignée B grâce au CD19, la détection d'une chaîne légère kappa ou lambda permet d'affirmer la monotypie et la diminution de la densité antigénique du récepteur B à l'antigène (BCR) par rapport aux cellules B normales, ce qui est caractéristique de la maladie. Le CD23 et le CD5 sont retrouvés de façon constante à la surface des cellules.

Ces caractéristiques immunophénotypiques ont permis de définir un score décrit par Matutes en 1994 (46) puis réévalué par Moreau en 1997 (1). Ce score attribue une valeur de 1 à chacun des éléments suivants : positivité du CD5 et du CD23, négativité ou faible expression du FMC7, faible expression du CD79b ou du CD22, et faible intensité d'expression de la chaîne légère kappa ou lambda. La CLL est définie par un score de Matutes à 4 ou 5 (Tableau 4).

Marqueurs	Points	
	0	1
Intensité des Ig de surface	Modérée / Forte	Faible
CD5	-	+
CD23	-	+
FMC7	+	Faible / -
CD22 ou CD79b	+	Faible / -

Tableau 4 : Score de Matutes

Un score strictement inférieur à 3 exclu une CLL. Un score à 3 évoque une LLC dont le profil phénotypique est atypique ou un autre SLPC-B. D'autres marqueurs sont utilisés tels que le CD43 et le CD200 (47).

Cependant, ce phénotype n'est pas entièrement spécifique et doit être confronté au résultat de la cytologie pour confirmer une CLL et exclure une B-PLL ou un DLBCL (40).

b) Le lymphome à cellule du manteau

Les cellules du MCL expriment des marqueurs pan-B, CD19 et CD20, une Ig de surface de type IgM souvent associée à une IgD. Le MCL est caractérisé, comme la CLL, par une expression quasi constante du CD5 mais s'en différencie par la négativité du CD23 (48) et un score de Matutes inférieur à 3 avec une expression de FMC7, de CD20 et de CD79b forte.

Cependant, l'immunophénotype du MCL est beaucoup plus variable que celui de la CLL et se chevauche avec celui d'autres SLPC-B, ce qui pose des difficultés diagnostiques (49) (50). Des variants immunophénotypiques CD5- (12%), CD10+ (8%), CD23+ (21%), FMC7- (11%) ont été décrits (48).

C'est pourquoi, des examens complémentaires à visée diagnostique sont nécessaires telles que la recherche de la translocation t(11 ;14)(q13 ;q32) par technique de cytogénétique conventionnelle ou bien la recherche du réarrangement du gène codant pour la cycline-D1 avec le gène codant pour *IgH* par technique FISH.

Plusieurs équipes ont tenté de développer une technique permettant la détection de la cycline-D1 par CMF. Cette méthode qui nécessite une étape d'amplification enzymatique au préalable semble manquer de spécificité dans la distinction CLL/MCL (51).

c) La leucémie pro-lymphocytaire B

La B-PLL reste une entité au profil immunologique mal défini, il n'existe pas de profil spécifique. Elle peut survenir *de novo* ou au décours d'une CLL. Elle se caractérise par la

présence d'une hyperlymphocytose franche constituée d'au moins 55% de prolymphocytes (31).

La distinction, sur le plan morphologique, entre une CLL d'allure prolymphocytaire, un MZL ou un MCL variant blastique reste délicate (38).

Le prolymphocyte serait issu d'une cellule B mémoire après passage dans le centre germinatif, mais sa contrepartie normale n'est pas connue.

L'immunophénotype est celui d'une cellule B mature, CD22/CD79b+, CD23-, CD10- et exprimant fortement les chaînes légères des Ig.

La plupart des patients sont CD5- mais certains peuvent être CD5+, de 30 à 65% selon les études (32). La transformation d'une CLL en B-PLL semble être associée à une diminution d'expression du CD5, une augmentation de l'intensité d'expression de CD20, des Ig de surface et l'acquisition du FMC7. Cependant, une attention particulière doit être apportée au fait que certaines B-PLL secondaires à une CLL conservent le même profil phénotypique que la CLL précédemment décrite et ne peuvent être reconnues que par étude cytologique (52).

d) Le lymphome de la zone marginale

Habituellement CD5-, le LZM est positif pour le CD5 dans 5 à 20% des cas (suivant les sources). Ce profil immunophénotypique semble être plus souvent associé à une hyperlymphocytose et à une infiltration médullaire (53) (14).

Ce profil plus atypique pose le problème de diagnostic différentiel avec la CLL et les autres SLPC-B CD5+. Néanmoins, le MZL est généralement CD23- et une proportion significative de patients présente une différenciation plasmocytaire (co-expression de CD38 et CD138).

e) Le lymphome lympho-plasmocytaire

Approximativement 5% des LPL sont CD5+ (54). Le CD23 est habituellement négatif et quand il est positif son expression est faible.

f) Le lymphome B diffus à grande cellules

Certains DLBCL peuvent être CD5+. La distinction avec les autres SLPC-B se base sur la taille des cellules importante en cyto-morphologie en cytométrie (forward scatter élevé). Il est nécessaire d'exclure un MCL variant blastoïde en recherchant la translocation t(11;14) ou le réarrangement de la *CCND1*.

Le DLBCL peut être la résultante d'une transformation d'un lymphome CD5+ de bas grade tel que la CLL ou bien apparaître *de novo*.

I.4.3.2 Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B CD5-/CD10+

Les SLPC-B CD5-/CD10+ sont très majoritairement représentés par le FL. 10% seulement des HCL sont CD10+. Ces derniers ne présentent pas de particularité sur le plan clinique ou morphologique par rapport aux HCL CD10- (55).

a) Le Lymphome folliculaire

L'immunophénotype se caractérise par la présence du CD10, physiologiquement exprimé sur les cellules du centre germinatif, et dans la majorité des cas par l'absence du CD5 et de CD23 qui permettent le diagnostic différentiel avec la CLL.

A noter que le fluorochrome couplé à l'anticorps anti-CD10 doit être fortement fluorescent sous peine d'un manque de sensibilité dans la détection. Toutefois, il existe de rares cas de LF CD10- ce qui peut entraîner un diagnostic erroné. Il convient donc de se baser sur les résultats d'examen complémentaires (14).

La protéine anti-apoptotique *BCL2* peut aussi être recherchée par des méthodes de marquage intra-cytoplasmique (56).

b) Le Lymphome B diffus à grande cellule

Les DLBCL CD10+ représentent environ 20 à 40% des tous les DLBCL. Il s'agit dans ce cas de phénotype de type centre germinatif. La distinction avec les lymphomes de Burkitt et les FL à grandes cellules est difficile c'est pourquoi le recours à la cytologie et/ou à l'histologie est indispensable pour pouvoir trancher. De plus, la translocation t(14 ;18) présente dans 70 à 95% des FL est aussi présente dans 20% des DLBCL.

I.4.3.3 Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B CD5-/CD10 -

a) La leucémie à tricholeucocytes

Les tricholeucocytes ont profil immunophénotypique spécifique ce qui permet une identification aisée par CMF. Leurs paramètres taille et structure les rapprochent du monocyte.

Ce sont classiquement des cellules B matures dont le score de Matutes est presque toujours < 2. L'équivalent normal serait une cellule B mémoire activée à un stade tardif de maturation.

Les tricholeucocytes expriment de façon constante 4 marqueurs :

- Le CD11c : intégrine retrouvée dans des sous-populations de lymphocytes B et T ;
- Le CD25 : chaîne alpha du récepteur à l'interleukine-2 ;
- Le CD103 : intégrine presque spécifique de ce type de lymphome ;
- Le CD123 : chaîne alpha du récepteur à l'interleukine-3

Ces 4 marqueurs permettent de distinguer la HCL des autres cellules chevelues ou villeuses comme le SRPL, la vHCL, ou le SLVL et permettent de définir un score (57). La mise en évidence de ce profil est plus sensible et spécifique que la recherche de la protéine TRAP (58).

Marqueur	1 point	0 point
CD11c	Positif	Négatif
CD25	Positif	Négatif
CD103	Positif	Négatif
CD123	Positif	Négatif

Tableau 5 : Score des marqueurs de la HCL (57)

Les scores supérieurs ou égaux à 3 définissent une HCL. Pour des scores inférieurs ou égaux à 2 il faudra évoquer un autre diagnostic.

Il peut exister des variations d'expression phénotypique de ces 4 marqueurs sans que l'on ne parle de vHCL (59). Dans ce cas, et en cas de doute, il convient de rechercher la mutation *BRAFV600E* (60).

b) Le lymphome de la zone marginale

Le terme de lymphome de la zone marginale comprend 3 catégories :

- le lymphome du MALT (*mucosae associated lymphoid tissue*) ;
- le lymphome de la zone marginale splénique (LZMS) caractérisé par la présence ou non de lymphocytes villeux circulants ou SLVL (*splenic lymphoma with villous lymphocytes*) ;
- le lymphome de la zone marginale ganglionnaire.

Ces 3 entités, bien que distinctes, ont des caractéristiques phénotypiques communes mais sont dépourvues de marqueur spécifique et correspondent à un diagnostic d'élimination du point de vue immunophénotypique.

Nous nous intéresserons ici aux MZL dont la dissémination sanguine est plus fréquente, ce qui correspond aux SMZL se divisant en lymphome de la zone marginale classique ou en lymphome splénique diffus de la pulpe rouge avec lymphocytes villeux (SDRPL). Ce dernier comprenant la vHCL.

Le SMZL et le SDRPL sont généralement CD5- (80%) et CD10- ce qui les distinguent des CLL, MCL et FL (40).

- SMZL « classique » :

Quelques cas sont CD23+ (30%) et faiblement CD43+ (10 à 15%). Le CD11c est faible quand il est exprimé. Le CD103 et le CD123 sont négatifs (14). En immunohistochimie, le CD76 est en général négatif.

- SDRPL :

Les cellules sont en général CD23-, CD43- et diffèrent du LZMS « classique » par l'expression plus forte de CD11c, CD20 et CD22, ainsi que par une forte expression de CD76 en immunohistochimie. Le CD103 est positif dans 20 à 30% des cas. Les CD123, CD25, CD38, CD24 et CD27 sont habituellement négatifs (14).

- vHCL :

Le profil ressemble à celui du SDRPL 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 vHCL sont CD25 positif) (61).

c) Le lymphome lympho-plasmocytaire ou maladie de Waldenström

L'immunophénotype du LPL met en évidence une expression modérée des Ig de surface ainsi que des marqueurs pan-B. Le score de Matutes est en général inférieur à 3. Le CD5, le CD23 et le CD10 sont négatifs dans 60 à 80% des cas, contrairement aux CD25, CD22 et CD38 (62). Ce dernier est faiblement exprimé dans un tiers à deux tiers des cas reflétant probablement la nature lymphoplasmocytaire du clone. Malgré l'expression du CD38, les cellules plasmocytaires contrairement aux plasmocytes du myélome n'expriment pas le CD138 et le CD56 (63).

La distinction avec le MZL n'est pas aisée car tous deux peuvent exprimer le CD5 et peuvent présenter une différenciation plasmocytaire.

Le CD25 positif ne pose pas de problème de diagnostic différentiel avec la HCL en raison du caractère négatif du CD103 (54)(64).

I.4.3.4 Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B CD5+/CD10+

Les néoplasies lymphoïdes B matures exprimant à la fois le CD5 et le CD10 ne sont pas banales. Par ordre d'incidence, nous retrouvons le FL, le MCL et la CLL. L'évaluation de l'expression de CD43 peut aider à distinguer le FL (CD43-) de la CLL et du MCL (CD43+).

En cas de doute diagnostique, il convient de se référer aux données morphologiques, anatomopathologiques, cytogénétiques et génétiques.

I.4.3.5 Récapitulatif des différentes caractéristiques phénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques

Le tableau ci-après (Tableau 6) reprend de façon synthétique les différentes caractéristiques immunologiques des SLPC-B. Il représente une aide quotidienne à l'interprétation des immunophénotypes, cependant, il doit tenir compte des valeurs de référence propres à chaque laboratoire ainsi que des valeurs d'intensité moyenne de fluorescence en cas d'interprétation délicate.

	CLL	B-PLL	MCL	FL	MZL	HCL	SLVL	LPL
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	-	+	-	- / +	-	- / +	-
CD23	+	-	--	- / +	-	-	- / +	-
Immunoglobuline de surface (kappa ou lambda)	Faible ou -	++	++	++	++	+++	+++	Faible à moyenne
FMC7	Faible ou -	+	+	+	++	++	+++	+ / -
CD22	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	+
CD79b	Faible ou -	+	+	+	+	+	++	+
CD10	-	- / +	-	+ / -	-	- / +	-	-
CD103	-	-	-	-	- / +	+	-	-
CD11c	- / +	-	-	-	+ / -	+	+	-
CD25	- / +	-	-	-	+ / -	+	-	+
CD43	++	-	- / +	-	-	- / +	-	-
CD20	Faiblement +	+	+	+	+	++	++	+

Tableau 6 : Caractéristiques phénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

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

II. Analyse de nouveaux marqueurs (CD180, CD200, et ROR1) dans le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs B par cytométrie en flux

II.1. Présentation des nouveaux marqueurs

Parmi les SLPC-B, la plus fréquente et la mieux caractérisée reste à ce jour la CLL dont le diagnostic est porté par l'évaluation du score de Matutes/Moreau (1)

Les panels d'exploration mis au point depuis une vingtaine d'années permettent l'établissement de ce score. Ces panels ont beaucoup évolué depuis et intègrent d'autres marqueurs dont la spécificité variable permet d'évoquer d'autres lymphoproliférations B.

Cependant, dans certaines formes atypiques de CLL, des problèmes de diagnostic différentiel persistent. Le but de notre étude était d'évaluer l'expression de trois nouveaux marqueurs par les cellules lymphomateuses afin d'aider à l'identification des différents SLPC-B, notamment dans les cas où le score de Matutes/Moreau n'était pas informatif.

Ces trois marqueurs particulièrement étudiés au cours de nos travaux sont présentés ci-dessous.

II.1.1. CD180

Le CD180 est une protéine transmembranaire qui appartient à la famille des « Toll-like receptor » (TLR). Elle est normalement exprimée sur les cellules présentatrices d'antigène : lymphocytes B, monocytes, macrophages et certaines cellules dendritiques (65).

Les TLR jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée de l'hôte contre les infections. Ils reconnaissent un ensemble de molécules spécifiques aux bactéries appelées lipo-polysaccharide (LPS). Ils assurent également une communication avec le système immunitaire adaptatif (66).

Même si les avis divergent sur la fonction de CD180, il a été démontré que son activation induisait une prolifération significative des lymphocytes B et une production d'immunoglobulines, aussi bien chez l'homme que chez la souris (67)(68).

Le CD180 a été identifié comme un marqueur du MZL en utilisant une analyse protéomique innovatrice de microparticules de membrane plasmique dérivées de cellules tumorales de lymphome B mature (69). Le CD180 est absent ou sous-estimé dans les lymphomes B, excepté dans le MZL et pourrait donc être considéré comme un marqueur positif, robuste et discriminant dans cette hémopathie lui permettant d'être inclus dans les panels d'identification des SLPC-B par cytométrie en flux (70).

II.1.2. CD200

Le CD200 (anciennement Ox-2) est un récepteur membranaire de nature glycoprotéique appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé par les lymphocytes B et T, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules endothéliales et les neurones (71)(72).

L'interaction du CD200 avec son récepteur conduit à une suppression de la réponse immunitaire à médiation cellulaire (73) et joue donc un rôle dans l'évasion du système immunitaire à la réponse anti-tumorale.

Le CD200 est constamment exprimé dans de nombreux cancers humains, notamment dans la CLL (74) et dans d'autres lymphomes B, excepté dans le MCL où son expression apparaît négative ou concerne une petite minorité de cellules néoplasiques (47).

II.1.3. ROR1

ROR1 appartient à la famille des récepteurs orphelins à activité tyrosine kinase de type I. Il intervient dans l'organogenèse du cerveau, du poumon et du squelette (75)(76).

Le rôle de ROR1 dans la signalisation cellulaire est à peine compris à ce jour mais il présenterait une fonction anti-apoptotique comme ont pu le démontrer des expériences d'ARN interférence sur des cellules Hela (76). Plusieurs études suggèrent aussi le rôle de ROR1 dans la transformation néoplasique.

Initialement mis en évidence comme marqueur dominant de la CLL (24)(78), d'autres travaux ont montré que son expression était possible dans d'autres lymphomes non Hodgkiniens et notamment dans le MCL (expression intense) et le MZL (expression modérée) suggérant un rôle général de ROR1 dans la lymphomagenèse (79).

II.2. Etude de la répartition des marqueurs en fonction des SLPC-B

II.2.1. Objectif

L'objectif principal est d'étudier les niveaux d'expression par les cellules lymphomateuses (pourcentage et MFI) pour chacun de ces 3 marqueurs afin de déterminer leur utilité en tant que nouveaux biomarqueurs dans le diagnostic différentiel des SLPC-B.

La connaissance précise des valeurs de MFI et de pourcentage de positivité pour chaque entité est une aide précieuse pour l'interprétation quotidienne des immunophénotypages lymphocytaires par le biologiste. Le but étant de formuler une orientation diagnostique au clinicien en charge du patient. Cette proposition diagnostique immunophénotypique se base sur le pouvoir discriminant de chaque marqueur.

II.2.2. Matériel et méthode

A. Sélection des échantillons

Nous avons réalisé une étude rétrospective chez les patients pour lesquels un immunophénotypage à la recherche de SLPC-B avait été prescrit entre mars 2016 et mai 2017. Trois types de matrice ont été analysés, à savoir, le sang périphérique, la moelle osseuse et les liquides d'épanchement des séreuses. La date de mars 2016 correspond au souhait de définir un nouveau panel d'exploration complémentaire des différents SLPC-B.

En fonction des conclusions de l'immunophénotypage, des résultats de la cytologie, de la cytogénétique, de la biologie moléculaire, de l'anatomopathologie, des données cliniques et en accord avec la classification OMS des hémopathies lymphoïdes, nous avons pu vérifier la classification initialement proposée et éventuellement reclasser a posteriori les différents SLPC-B.

Un total de 180 prélèvements (123 de sang périphérique, 53 de moelle osseuse et 4 de liquide d'épanchement) a été analysé, correspondant au diagnostic de 140 SLPC-B et au typage de 40 sujets sains (d'âge moyen 67,6 ans). Les patients présentant 2 clones différents simultanément ont été exclus de l'étude. Les 2 catégories de patients présentant plus de prélèvements de moelle osseuse que de sang pour établir le diagnostic sont les LPL et les HCL. En effet, l'infiltration médullaire est caractéristique de chacune de ces deux entités. La répartition des différents patients inclus dans l'étude est représentée ci-dessous dans le Tableau 7 et en Figure 10.

Catégorie	Nombre de sujets	Echantillons de sang	Echantillons de moelle osseuse	Echantillons de liquide
Healthy donors	40	31	9	0
CLL	35	31	4	0
aCLL	19	16	3	0
MZL	28	18	8	2
MCL	13	11	2	0
LPL	18	6	12	0
HCL	16	4	12	0
vHCL	2	1	1	0
FL	4	3	1	0
DLBCL	5	2	1	2

Tableau 7 : Répartition des SLPC-B selon l'origine des échantillons de diagnostic

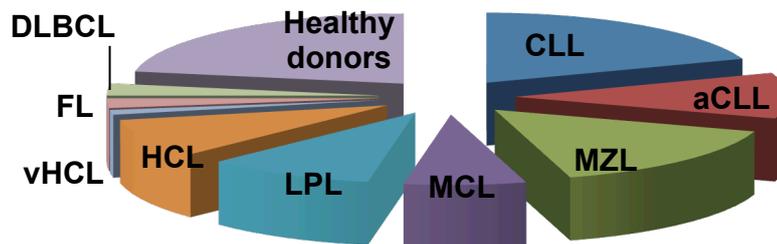


Figure 10 : Répartition des différents effectifs sous forme de diagramme circulaire

Le diagnostic de CLL a été retenu avec un score de Matutes \geq à 4. Les SLPC-B présentant un score de Matutes égal à 3 ont été classés en CLL atypiques sur la positivité du CD5, du CD23 et du CD43 ainsi qu'en utilisant des données cytologiques, cytogénétiques et cliniques

Les diagnostics de MCL ont été confirmés par la présence de la translocation t(11 ;14) mise en évidence par des techniques de cytogénétique conventionnelle et/ou de FISH, ou bien par surexpression de la *CCDN1* par des techniques de RT-PCR ou d'immunohistochimie sur biopsie.

Le diagnostic de LPL a été porté grâce à la présence d'une immunoglobuline monoclonale de type IgM combinée à un infiltrat médullaire lympho-plasmocytaire. Des arguments cytogénétiques et moléculaires (80) viennent assoir le diagnostic. Il est important de souligner que la trisomie 4 n'a pas été rapportée à ce jour dans d'autres hémopathies lymphoïdes matures B (81).

Le classement des MZL a été permis par la combinaison des données anatomopathologiques, cytologiques, cytogénétiques et cliniques.

Le diagnostic d'HCL a été retenu grâce au score immunophénotypique des tricholeucocytes, à la cytologie fortement évocatrice et à la présence de la mutation *BRAFV600E*.

Tous les cas de FL et de DLBCL ont été diagnostiqués grâce à l'étude anatomopathologique sur biopsie tissulaire.

Nombre de patients	Arguments cytologiques	Cytogénétique		Autres données
		Présence d'au moins une des anomalies suivantes au caryotype Trisomie 12 ; del 13q ; del 11q ; del 17p ; t(14 ;18)* ; t(2 ;18)* ; t(18 ;22)* *translocations associées à une trisomie 12 chez 3 des patients		
13	X	X		
6	X			Caryotype normal. CD5+ / CD23+ / CD43+ fort .Clinique en faveur.
Total = 19				

Tableau 8 : Classement des leucémies lymphoïdes chroniques atypiques à score de Matutes = 3

Nombre de patients	Argument cytologique	Argument histologique	Argument cytogénétique	Argument moléculaire	Argument clinique
	Forme classique* ou forme blastoïde**	Histologie en faveur avec réarrangement CCDN1/IGH positif	Présence de la t(11 ;14) ou l'un de ses variants au caryotype	Présence de la t(11 ;14) en technique FISH	ADP, SMG, signes d'atteinte généralisée
2	X	X			X
1	X	X	X		X
1	X	X	X	X	X
4	X		X		X
2	X		X	X	X
1	X		X		
1			X	X	
1	X			X	X
Total = 13					

Tableau 9 : Classement des lymphomes à cellules du manteau

Légende : - **Forme classique *** : Cellules de taille petite ou moyenne, avec rapport N/C proche de 1, dont le noyau a un contour irrégulier et une chromatine discrètement immature - **Forme blastoïde**** : Une partie au moins des cellules est de taille moyenne ou plus élevée, avec rapport N/C proche de 1, avec chromatine immature avec ou sans nucléole visible.

Nombre de patients	Présence d'une immunoglobuline monoclonale de type IgM	Infiltrat médullaire	Cytogénétique	Biologie Moléculaire
	Electrophorèse des protéines sériques ou immunofixation	Lympho-plasmocytes infiltrant la moelle osseuse	Présence d'une trisomie 4	Présence de la mutation MYD88 exon 5
10	X	X		
2	X	X		X
1	X	X	X	X
3	X	X	X	
1	X			X
Total = 17				

Tableau 10 : Classement des lymphomes lympho-plasmocytaires

Nombre de patients	Argument cytologique	Argument histologique	Argument cytogénétique	Argument clinique
	Cellules d'aspect monocytoïde avec excès de cytoplasme		Présence d'au moins une de ces anomalies : Trisomie 3 totale ou partielle (3q) ; gain du 12p ; trisomie 18 ; délétion ou translocation impliquant le 7q32	SMG pour les formes spléniques. ADP pour les formes ganglionnaires.
2	X	X		X
2	X	X	X	X
6	X		X	
2	X			X
5	X		X	X

3				X
1		X	X	
2			X	X
5			X	
Total = 28				

Tableau 11 : Classement des lymphomes de la zone marginale

Nombre de patients	Arguments cytologiques sur la moelle osseuse ou le sang périphérique	Score des tricholeucocytes par CMF	Biologie Moléculaire
	Tricholeucocytes : Cellules de 12 – 25 µm de diamètre; rapport N/C = 0,5 – 0,7. Noyau arrondi ou ovalaire, parfois encoché ou réniforme, avec chromatine plus fine que celle d'un lymphocyte, sans nucléole évident. Cytoplasme faiblement basophile (gris-bleu), avec membrane externe hérissée de fins prolongements (aspect chevelu) ; absence de granulations	Score supérieur ou égal à 3	Présence de la mutation BRAFV600E
6	X	X	
4	X	X	X
7		X	
1		X	X
Total = 18			

Tableau 12 : Classement des leucémies à tricholeucocytes

B. Appareil d'analyse

La préparation des prélèvements a été effectuée selon le protocole décrit en Annexe 1.

Les évènements cellulaires ont été acquis sur un cytomètre Navios®, de Beckman Coulter, 10 couleurs, capable d'analyser jusqu'à 12 paramètres simultanément. L'analyse des fichiers de données .FCS a été ensuite réalisée sur le logiciel Kaluza®.

C. Marquage des sous-populations lymphocytaires

Le marquage des sous populations lymphocytaires a été réalisé avec le panel d'anticorps monoclonaux suivant :

- marqueur pan-leucocytaire : CD45 ;
- marqueurs des lymphocytes T : CD3, CD4 et CD8 ;
- marqueurs des lymphocytes NK : CD16 et CD56 ;
- marqueur des lymphocytes B : CD19.

La population lymphocytaire a été ciblée sur l'histogramme CD45/SSC et parmi celle-ci la population de lymphocytes B sur l'histogramme CD19/SSC.

D. Marquage des lymphocytes B

Le marquage des lymphocytes B a été réalisé avec le panel d'anticorps monoclonaux suivant :

- en systématique : CD5, CD19, CD23, CD45, CD79b, FMC7, Kappa et Lambda ;
- en cas de score de Matutes ≤ 3 : CD10, CD19, CD20, CD22, CD43, CD45 et CD25 jusqu'en décembre 2015. Après Décembre 2015 les 3 marqueurs suivant sont venus compléter ce panel : CD180, CD200 et ROR1.
- en cas de suspicion d'une leucémie à tricholeucocytes : CD11c, CD19, CD25, CD45, CD103 et CD123.

Les résultats pour chaque antigène sont exprimés en pourcentage de cellules positives à l'intérieur de la population cible. Un marqueur membranaire est considéré positif s'il est exprimé par 30% ou plus des cellules analysées. Pour les marqueurs CD79b, Kappa et Lambda l'intensité du marquage est définie par rapport à la population négative pour ce marqueur : l'intensité sera considérée comme faible si le rapport de la médiane de la population étudiée sur la médiane de la population négative pour ce marqueur est inférieur à 10, et modérée/forte si le rapport est supérieur à 10.

E. Marquage par le CD180, CD200 et ROR1

L'anticorps anti-CD180 (clone MHR73) utilisé est commercialisé par Miltenyi Biotec (Auburn, CA). L'anticorps anti-CD200 (clone MRC OX-104) et anti-ROR1 (clone 4A5) sont distribués par BD Biosciences (San Jose, CA).

Les valeurs de MFI étudiées pour chacun des trois marqueurs correspondent aux MFI de l'ensemble de la population lymphocytaire B (CD19+). La définition du seuil de pourcentage de positivité a été déterminée en fonction du profil d'expression de la population saine.

F. Analyse statistique

Le test de comparaison multiple de Dunn a été utilisé pour comparer les pourcentages de positivité et les valeurs de MFI pour CD180, CD200 et ROR1 entre les sujets sains et chaque groupe de patients. Un *P* value inférieur à 0,05 est considéré comme statistiquement significatif.

La courbe de ROC (Receiver Operating Characteristic) et l'aire sous la courbe de ROC, c'est à dire l'AUC (Area Under the Curve), ont été établis pour évaluer la valeur diagnostique de chaque marqueur dans la différenciation des SLPC-B.

II.2.3. Résultats

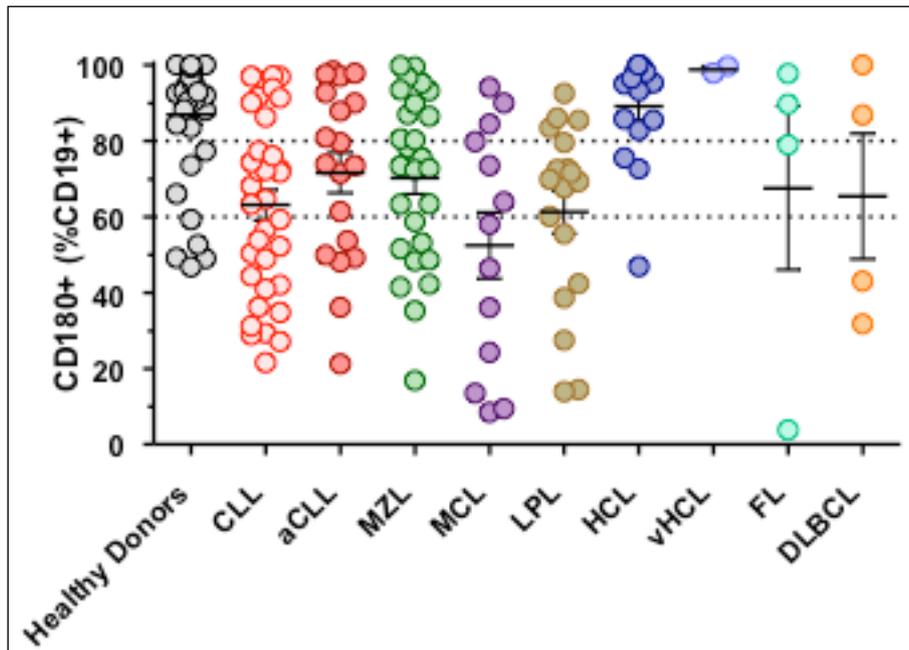
II.2.3.1 Répartition des marqueurs en fonction de chaque SLPC-B

Les résultats sont présentés sous la forme de diagrammes ce qui permet de montrer plus aisément la dispersion des différents marqueurs en fonction du SLPC-B. Ce type de représentation permet, dans une certaine mesure, de mettre en évidence la capacité discriminative de chaque marqueur. Une série d'exemples d'histogrammes biparamétriques de résultats obtenus est présentée en Annexe 2.

En ce qui concerne les tableaux ci-après (Tableaux 13 ; 14 et 15), « ns » est indiqué lorsque la différence est non significative et les étoiles correspondent aux valeurs du *P* value :

- *** pour $P < 0.0001$
- ** pour $0.01 < P < 0.001$
- * pour $0.05 < P < 0.01$

(A)



(B)

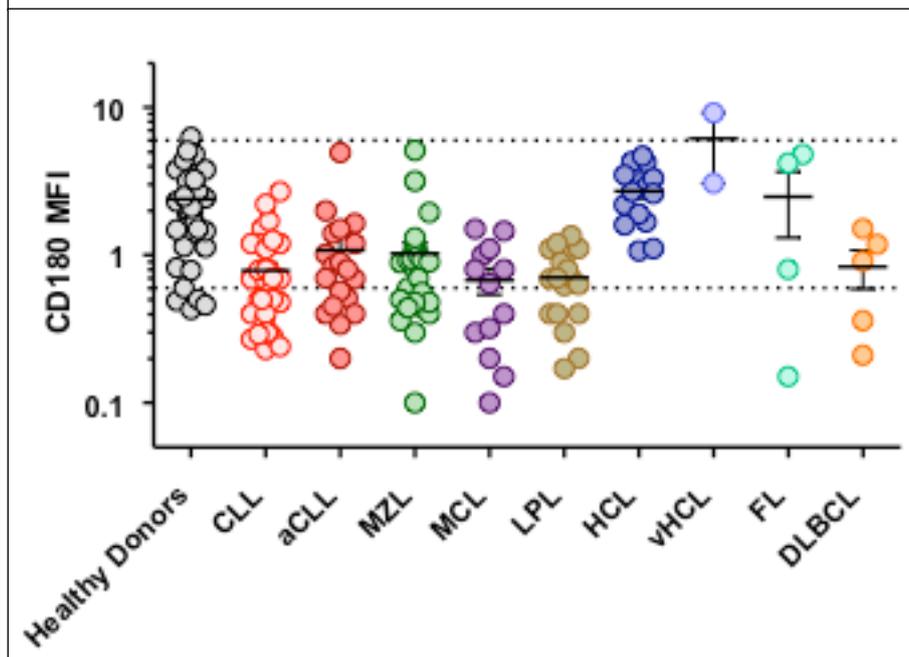


Figure 11 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de CD180 en fonction de chaque groupe de patients. Pourcentage de cellules positives pour CD180 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD180 pour les cellules CD19 positives (B)

(A)

CD180+ (%CD19+)	Nombre de sujets	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	p
Healthy donors	40	87,04	16,01	46,82	100,00	-
CLL	35	63,16	23,62	21,56	97,10	***
aCLL	19	71,61	23,19	21,27	98,46	ns
MZL	28	70,28	22,26	16,84	99,81	**
MCL	13	52,48	31,53	8,50	94,17	**
LPL	18	61,29	24,28	13,94	92,52	ns
HCL	16	89,18	14,41	46,96	46,96	ns
vHCL	2	98,79	1,29	97,87	99,70	ns
FL	4	67,58	43,20	3,82	97,79	ns
DLBCL	5	66,77	35,05	31,76	100,00	ns

(B)

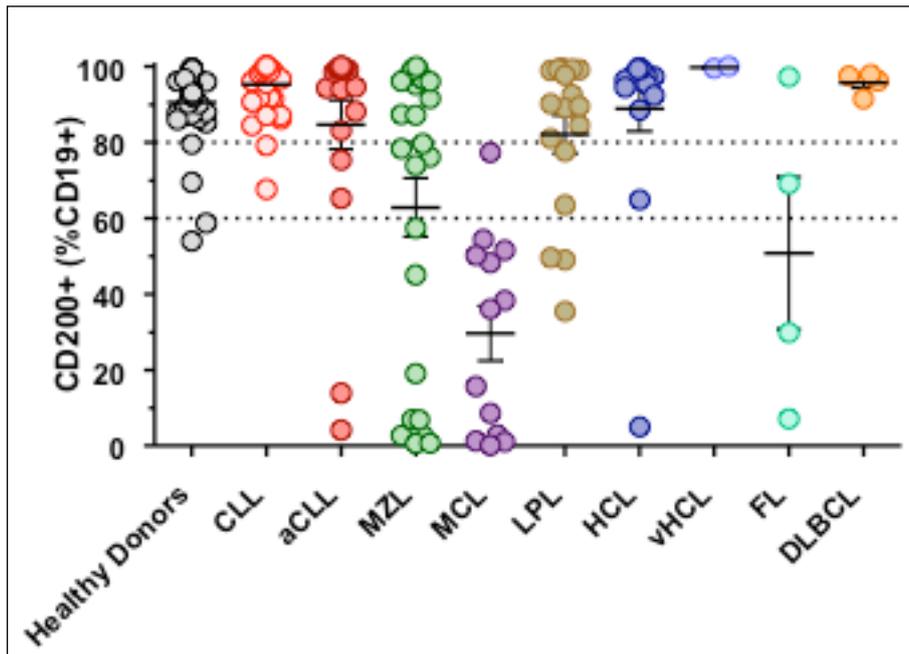
CD180 MFI	Nombre de sujets	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	p
Healthy donors	40	2,39	1,41	0,43	6,30	-
CLL	35	0,79	0,57	0,23	2,69	***
aCLL	19	1,08	1,06	0,20	4,96	*
MZL	28	1,02	1,02	0,10	5,12	**
MCL	13	0,69	0,52	0,10	1,50	***
LPL	18	0,69	0,34	0,17	1,35	***
HCL	16	2,73	1,15	1,07	4,69	ns
vHCL	2	6,13	4,34	3,06	9,20	ns
FL	4	2,49	2,35	0,15	4,80	ns
DLBCL	5	0,83	0,55	0,21	1,51	ns

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des valeurs retrouvées pour CD180. Pourcentage de cellules positives pour CD180 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD180 pour les cellules CD19 positives (B)

Les sujets sains présentent une forte intensité d'expression de CD180. En termes de pourcentage de cellules positives pour CD180, les sujets sains présentent une différence significative avec les CLL, les MCL et les LPL. Il n'existe pas de différence significative entre les sujets sains et les HCL et les vHCL.

En ce qui concerne les valeurs de MFI de CD180, il existe une différence significative entre les sujets sains et les CLL, aCLL, MZL, MCL et LPL. Les valeurs de MFI pour les CLL, aCLL, MZL, MCL, LPL et DLBCL présentent des valeurs homogènes et comprises en moyenne entre 0,69 et 1,08. Les HCL et vHCL présentent les valeurs de MFI les plus élevées de l'étude. Elles sont respectivement de 2,73 et 6,13 en moyenne.

(A)



(B)

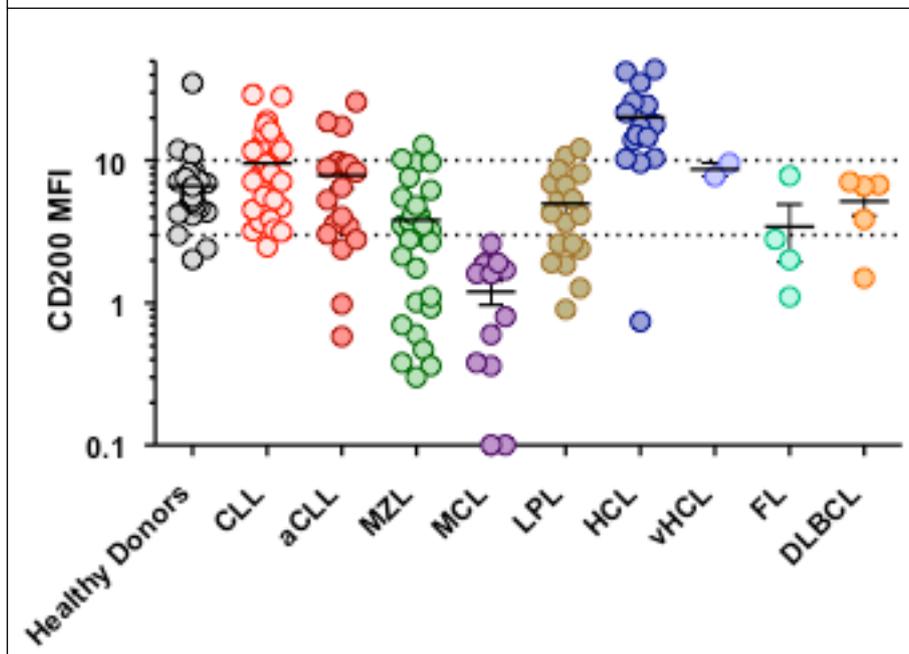


Figure 12 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de CD200 en fonction de chaque groupe de patients. Pourcentage de cellules positives pour CD200 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de CD200 pour les cellules CD19 positives (B)

(A)

CD200+ (%CD19+)	Nombre de sujets	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	p
Healthy donors	40	90,48	10,22	53,99	99,58	-
CLL	35	95,27	7,33	67,62	100,00	ns
aCLL	19	84,70	28,38	4,18	99,99	ns
MZL	28	62,87	40,22	0,64	99,91	ns
MCL	13	29,68	25,98	0,11	77,30	**
LPL	18	82,10	20,44	35,47	99,62	ns
HCL	16	88,84	23,88	5,04	99,66	ns
vHCL	2	99,76	0,34	99,52	100,00	ns
FL	4	50,83	40,15	7,14	97,23	ns
DLBCL	5	95,75	2,97	91,42	97,84	ns

(B)

CD200+ MFI	Nombre de sujets	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	p
Healthy donors	40	6,62	4,96	2,02	34,86	ns
CLL	35	9,55	6,48	2,48	29,17	ns
aCLL	19	7,88	6,61	0,58	25,90	ns
MZL	28	3,82	3,43	0,30	12,87	ns
MCL	13	1,20	0,83	0,10	2,60	***
LPL	18	4,98	3,29	0,90	12,10	ns
HCL	16	20,18	12,25	0,74	43,57	**
vHCL	2	8,66	1,33	7,72	9,60	ns
FL	4	3,43	2,99	1,10	7,79	ns
DLBCL	5	5,16	2,42	1,50	7,08	ns

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des valeurs retrouvées pour CD200. Pourcentage de cellules positives pour CD200 parmi les cellules CD19 positives **(A)** et MFI de CD200 pour les cellules CD19 positives **(B)**

En ce qui concerne les valeurs de pourcentage de positivité de CD200, les sujets sains ne présentent pas de différence significative avec tous les SLPC-B sauf avec les MCL. Tous les SLPC-B, hormis les LF et les MCL, présentent une proportion de cellules positives supérieure à 60%, en moyenne.

Pour ce qui est des valeurs de MFI, les sujets sains ne présentent pas de différence significative avec tous les SLPC-B sauf avec les MCL et les HCL. Les MCL présentant une expression faible (la plus faible de tous les SLPC-B) alors que les HCL étant caractérisées par une expression forte en CD200 (la plus forte de tous les SLPC-B).

Toutes les cellules néoplasiques B des CLL et aCLL (sauf 2/54 patients) présentent une des niveaux d'expression élevés et homogènes en CD200.

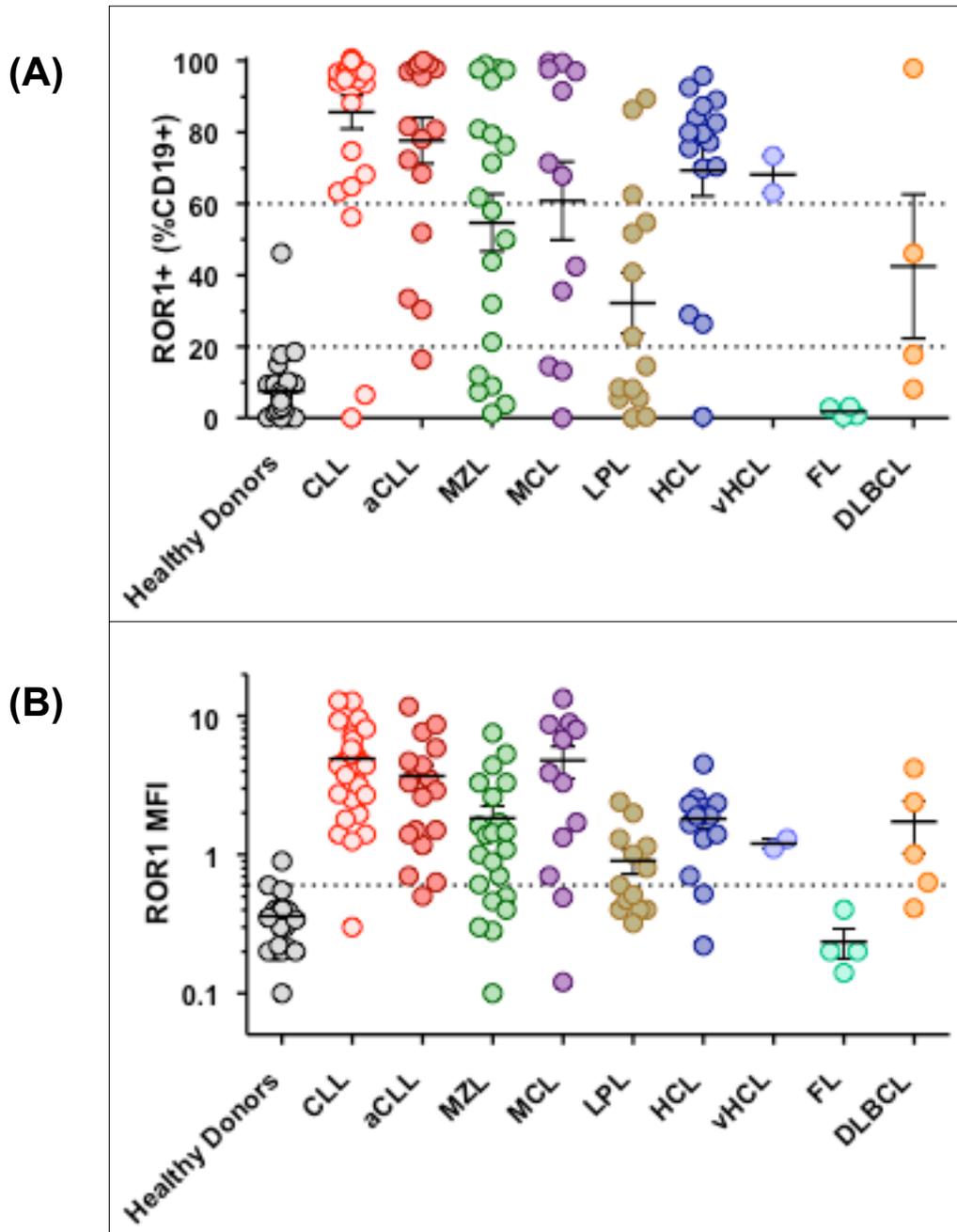


Figure 13 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de ROR1 en fonction de chaque groupe de patients. Pourcentage de cellules positives pour ROR1 parmi les cellules CD19 positives **(A)** et MFI de ROR1 pour les cellules CD19 positives **(B)**

(A)

ROR1+ (%CD19+)	Nombre de sujets	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	p
Healthy donors	40	7,52	9,24	0,01	46,19	-
CLL	35	85,60	25,63	0,02	100,00	***
aCLL	19	77,63	27,22	16,34	99,96	***
MZL	28	54,71	35,93	1,32	98,83	**
MCL	13	58,48	40,00	0,00	99,54	**
LPL	18	32,19	31,73	0,00	89,38	ns
HCL	16	69,30	27,89	0,41	95,77	**
vHCL	2	68,16	7,30	63,00	73,32	ns
FL	4	1,79	1,46	0,35	3,18	ns
DLBCL	5	42,43	40,31	8,12	97,85	ns

(B)

ROR1 MFI	Nombre de sujets	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum	p
Healthy donors	40	0,36	0,16	0,10	0,90	-
CLL	35	4,93	3,20	0,30	12,83	***
aCLL	19	3,70	3,10	0,50	11,70	***
MZL	28	1,83	1,89	0,10	7,53	*
MCL	13	4,78	4,29	0,12	13,40	***
LPL	18	0,90	0,66	0,32	2,40	ns
HCL	16	1,82	1,05	0,22	4,50	**
vHCL	2	1,20	0,14	1,10	1,30	ns
FL	4	0,24	0,11	0,14	0,40	ns
DLBCL	5	1,73	1,59	0,41	4,21	ns

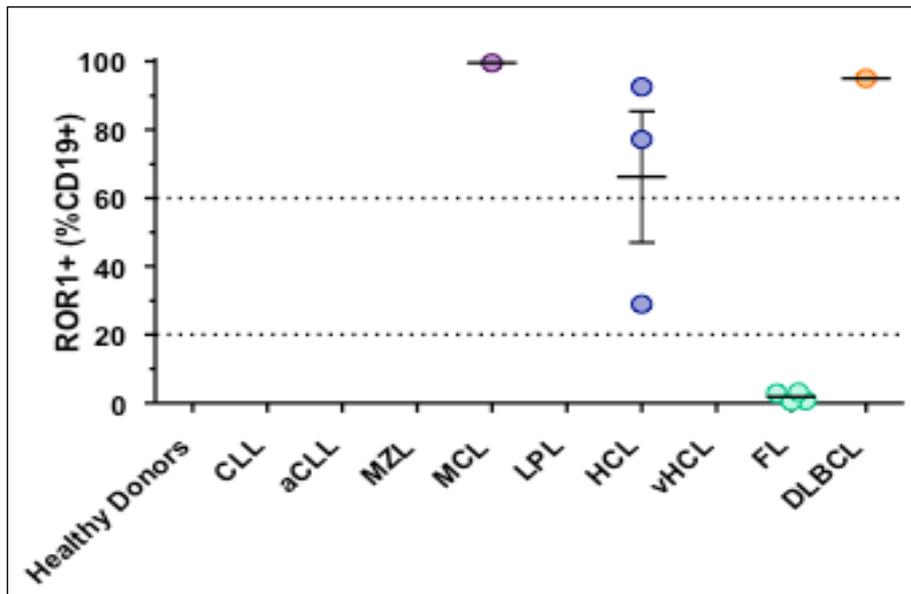
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des valeurs retrouvées pour ROR1. Pourcentage de cellules positives pour ROR1 parmi les cellules CD19 positives **(A)** et MFI de ROR1 pour les cellules CD19 positives **(B)**

La proportion de cellules positives pour ROR1 était généralement très faible voire négative chez les sujets sains comparée aux différents SLPC-B. De même, les valeurs de MFI correspondent aux valeurs les plus faibles retrouvées. Une exception avec le LF qui présente des pourcentages de positivité et des valeurs de MFI en deçà des sujets sains.

L'expression de ROR1 (en pourcentage de positivité et en MFI) est significativement plus élevée dans tous les SLPC-B étudiés comparé aux sujets sains, sauf pour les LPL, les vHCL, les LF et les DLBCL.

L'expression de ROR1 est la plus élevée dans les CLL, les aCLL, suivi par les MCL, les HCL puis les MZL.

(A)



(B)

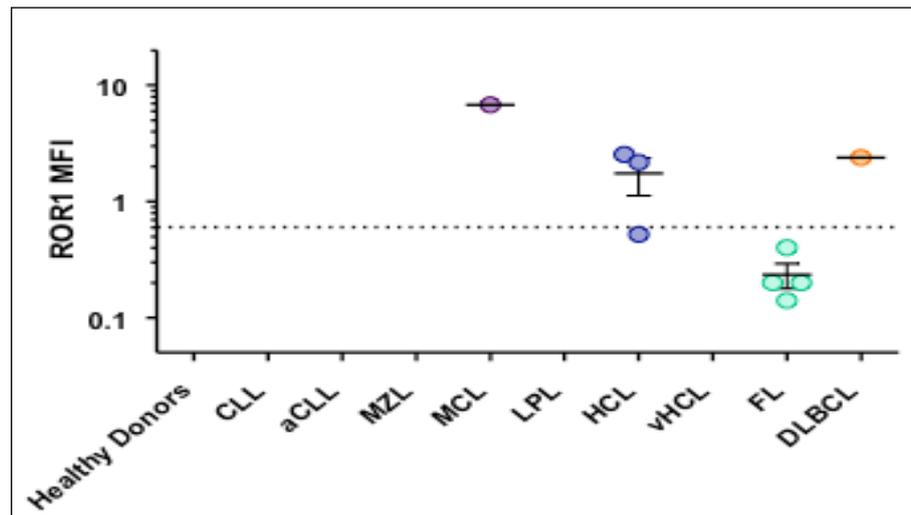


Figure 14 : Représentation graphique de la distribution des valeurs de ROR1 en fonction des **SLPC-B CD10+**. Pourcentage de cellules positives pour ROR1 parmi les cellules CD19 positives (A) et MFI de ROR1 pour les cellules CD19 positives (B)

Le FL étant l'entité pour laquelle l'expression de ROR1 est la plus faible, nous avons trouvé judicieux d'étudier la répartition de ROR1 dans les SLPC-B CD10+.

Bien que nous ayons eu peu de cas de SLPC-B CD10+ dans notre étude (n=9), nous avons constaté que l'expression de ROR1 était plus forte dans les SLPC-B non FL, aussi bien en terme de pourcentage de positivité qu'en valeur de MFI.

II.2.3.2 Etude du pouvoir discriminant de chaque marqueur et établissement de scores à visée diagnostique

Afin d'étudier avec précision le pouvoir discriminant de chaque marqueur entre une population d'intérêt et les autres SLPC-B, nous avons établi des courbes de ROC. Pour un test qui discriminerait parfaitement chaque entité, il est possible de trouver une valeur seuil ayant une sensibilité et une spécificité de 100%, qui correspond au coin supérieur gauche de la courbe de ROC. De plus, le calcul de l'aire sous la courbe (= AUC pour Area Under the Curve) de ROC nous permet de quantifier la performance diagnostique d'un marqueur d'intérêt. Pour un test parfait, l'aire sous la courbe vaut 1. Pour un test sans valeur discriminante, l'aire sous la courbe vaut 0,5.

Les valeurs de l'AUC de chaque marqueur pour un lymphome donné envers le reste des SLPC-B sont représentées dans un diagramme et matérialisées par un code couleur. Les valeurs d'AUC se rapprochant de la valeur 1 sont jaunes alors que les valeurs d'AUC se rapprochant de la valeur 0,5 sont bleues. La zone frontière est symbolisée par la couleur blanche et correspond à des valeurs d'AUC voisines de 0,75.

Après étude des valeurs d'AUC, nous avons pu établir des scores à visée diagnostique.

La création de scores permet d'optimiser l'interprétation des nouveaux marqueurs dans la pratique quotidienne. Nous avons tenu également à intégrer à ces scores les données des marqueurs « historiques », c'est à dire ceux correspondant au score de Matutes et Moreau, et les données des marqueurs de notre panel d'exploration complémentaire. Le but étant d'augmenter la puissance de notre score mais aussi d'avoir un regard critique au niveau local sur nos marqueurs utilisés de façon quotidienne.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux SLPC-B CD5+/CD10- (essentiellement CLL, MCL et MZL), puis dans un deuxième temps aux SLPC-B CD5-/CD10- (essentiellement MZL, LPL et HCL).

II.2.3.2.1. SLPC-B CD5+/CD10-

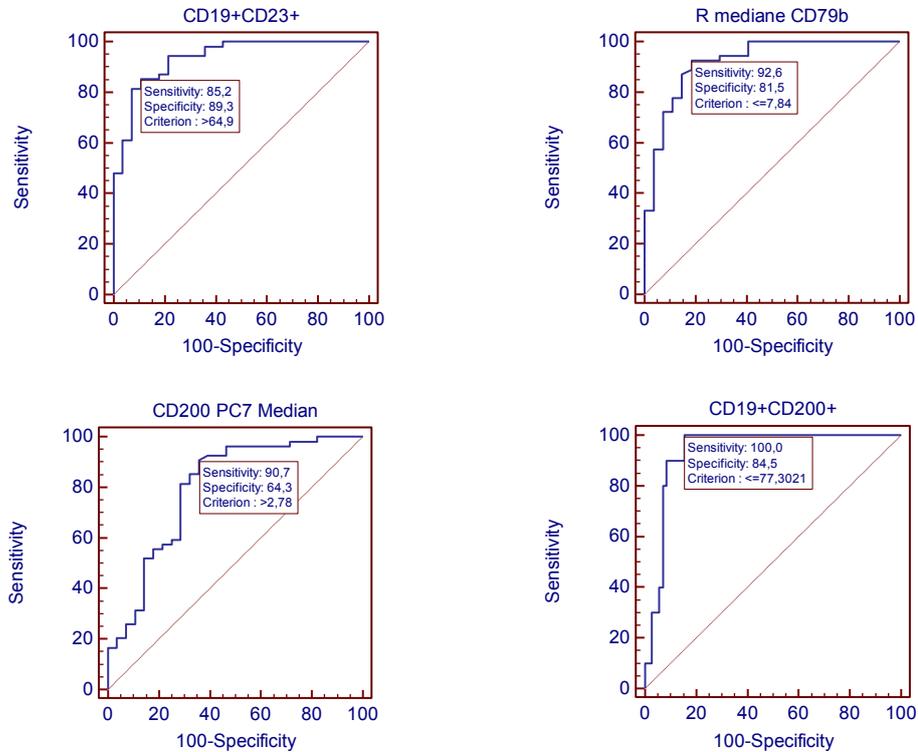


Figure 15 : Courbes ROC afin de déterminer les valeurs prédictives des paramètres d'intérêt : pourcentage de CD23+ en haut à gauche, ratio de CD79b en haut à droite, MFI de CD200 en bas à gauche ; pour CLL versus non CLL dans les SLPC-B CD5+/CD10-. Courbe de ROC afin de déterminer la valeur prédictive du pourcentage de CD200 dans le MCL versus non MCL dans les SLPC-B CD5+/CD10- en bas à droite.

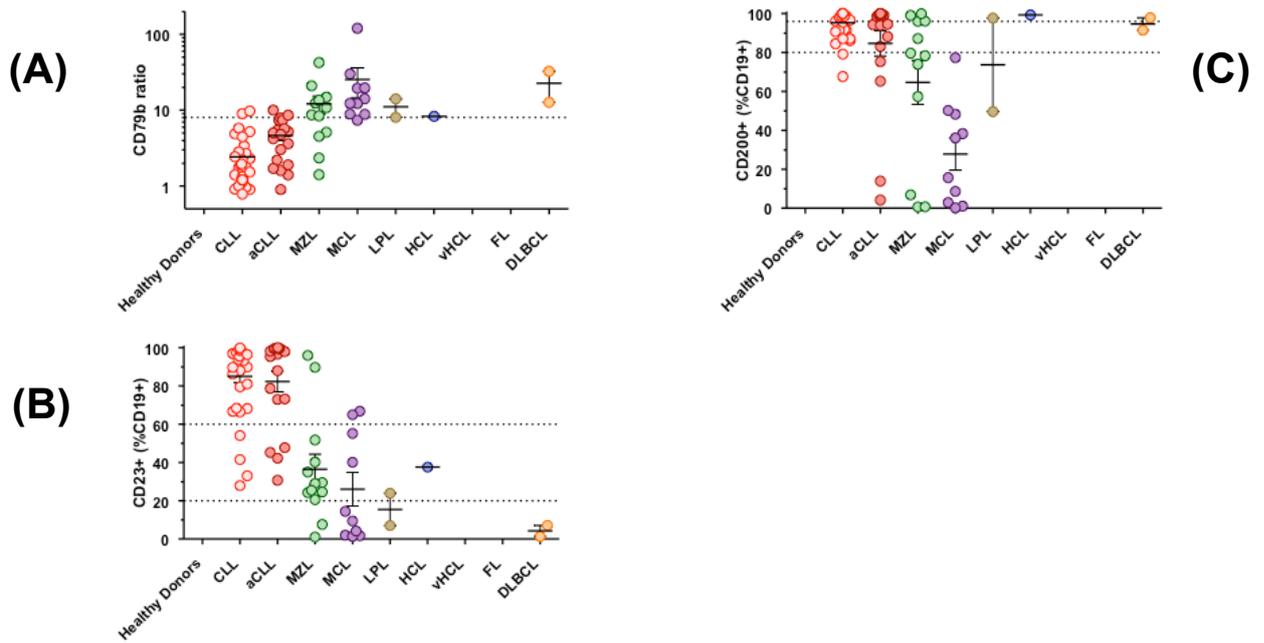


Figure 16 : Représentations graphiques de la distribution des marqueurs ayant un intérêt diagnostique dans la différenciation des SLPC-B CD5+/CD10-. CD79b ratio **(A)**, pourcentage de positivité de CD23 **(B)** et pourcentage de positivité de CD200 **(C)** en fonction des SLPC-B CD5+/CD10-.

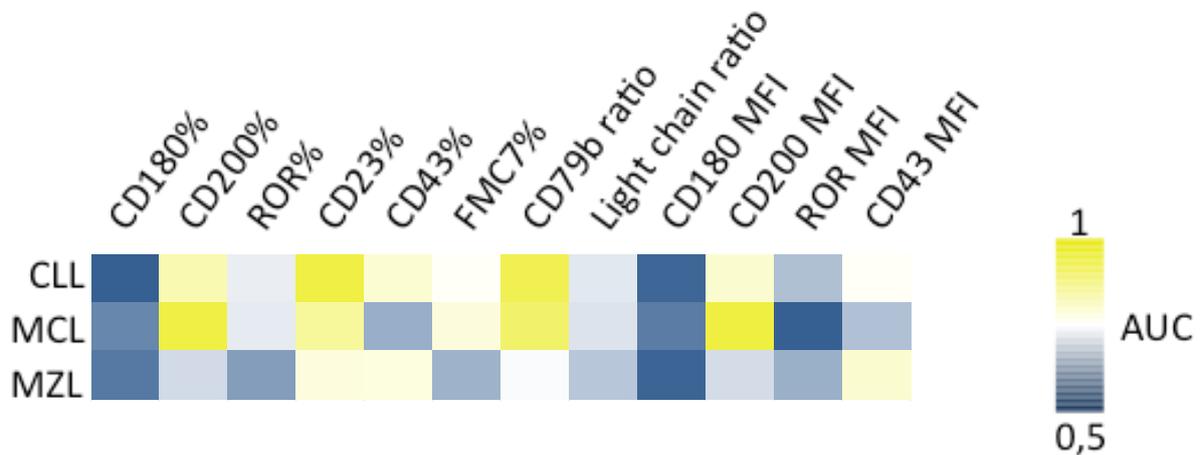


Figure 17 : Tableau récapitulatif des performances diagnostiques de chaque marqueur. Pour chacun des 3 SLPC-B est représenté par un code couleur la valeur de l'AUC du marqueur permettant de distinguer le lymphome en question des autres SLPC-B CD5+/CD10-

Les marqueurs présentant un intérêt à visée diagnostique car ayant un pouvoir discriminant des SLPC-B CD5+/CD10- sont représentés en Figures 15 et 16.

En ce qui concerne la CLL :

- un pourcentage de positivité de CD23 supérieur à 64.9% permet d'évoquer une CLL avec une sensibilité de 85.2% et une spécificité de 89.3% (effectif positif = 54 ; effectif négatif = 28 ; AUC = 0.937 ; IC à 95% [0.860 : 0.978] ; P<0.0001) ;
- une valeur de CD79b ratio inférieure ou égale à 7.84 permet d'évoquer une CLL avec une sensibilité de 92.6% et une spécificité de 81.5% (effectif positif = 54 ; effectif négatif = 28 ; AUC = 0.922 ; IC à 95% [0.841 : 0.970] ; P<0.0001) et
- une valeur de MFI de CD200 supérieure à 2.78 permet d'évoquer une CLL avec une sensibilité de 90.7% et une spécificité de 64.3% (effectif positif = 54 ; effectif négatif = 28 ; AUC = 0.797 ; IC à 95% [0.693 : 0.878] ; P<0.0001).

Pour le MCL, un pourcentage de positivité de CD200 inférieur à 77.3% permet d'affirmer le diagnostic avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 84.5% (effectif positif = 11 ; effectif négatif = 71 ; AUC = 0.937 ; IC à 95% [0.860 : 0.979] ; P<0.0001).

La Figure 17 récapitule les valeurs diagnostiques de chaque marqueur par leur valeur d'AUC représentée par un code couleur. Les marqueurs les plus discriminants dans la CLL sont le CD23% et le CD79b ratio. Pour le MCL, les marqueurs les plus discriminants sont le CD200%, CD200 MFI et CD79b ratio. Dans le MZL, aucun marqueur ne présente un intérêt. D'après les résultats obtenus, nous avons au mis au point un score à visée diagnostique. Les critères retenus pour établir ce score sont les suivants :

- CD200%: $\geq 80\%$ = +1 $\geq 96\%$ = +2
- CD23%: $\geq 20\%$ = +1 $\geq 60\%$ = +2
- CD79b ratio: ≤ 8 = +2

Un score élevé est en faveur d'une CLL alors que score faible est en faveur d'un MCL.

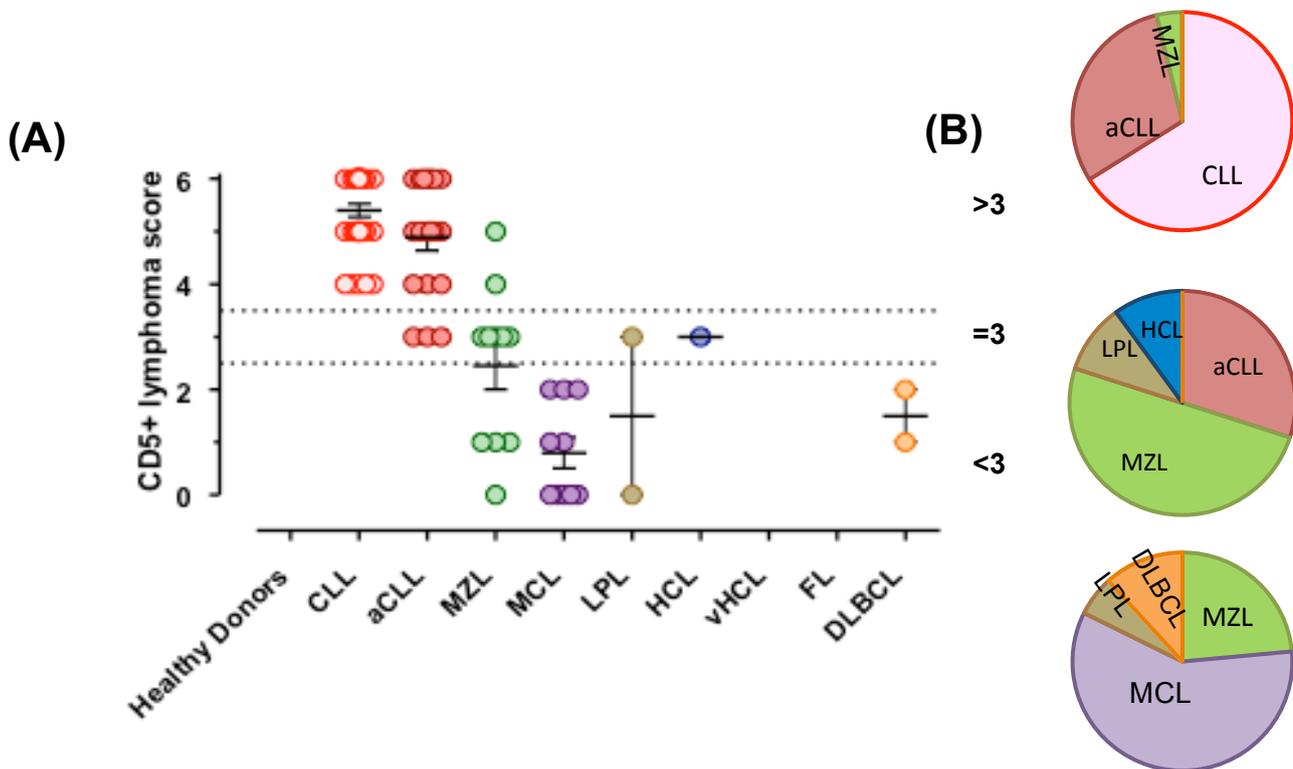


Figure 18 : Représentation graphique des scores obtenus en fonction des différents SLPC-B CD5+/CD10- (A). Représentation en diagramme circulaire de la répartition des SLPC-B CD5+/CD10- en fonction du score obtenu (B).

La Figure 18 reprend les scores obtenus en fonction des différents SLPC-B CD5+/CD10-. Toutes les CLL ont un score supérieur ou égal à 4 ainsi que la majorité des aCLL (sauf 3/19 patients qui ont un score égal à 3) alors que tous les MCL ont un score inférieur ou égal à 2.

Parmi les scores les plus élevés, c'est-à-dire supérieur ou égal à 4, 96% sont des CLL (dont 30% sont des aCLL de score de Matutes à 3) et 4% sont des MZL. Pour les scores intermédiaires, c'est-à-dire égal à 3, 50% sont des MZL ; 30% sont des aCLL ; 10% sont des LPL et 10% sont des HCL. En ce qui concerne les scores les plus bas, c'est-à-dire inférieur ou égal à 2, 59% sont des MCL ; 24% sont des MZL ; 12% sont des DLBCL et 6% sont des LPL.

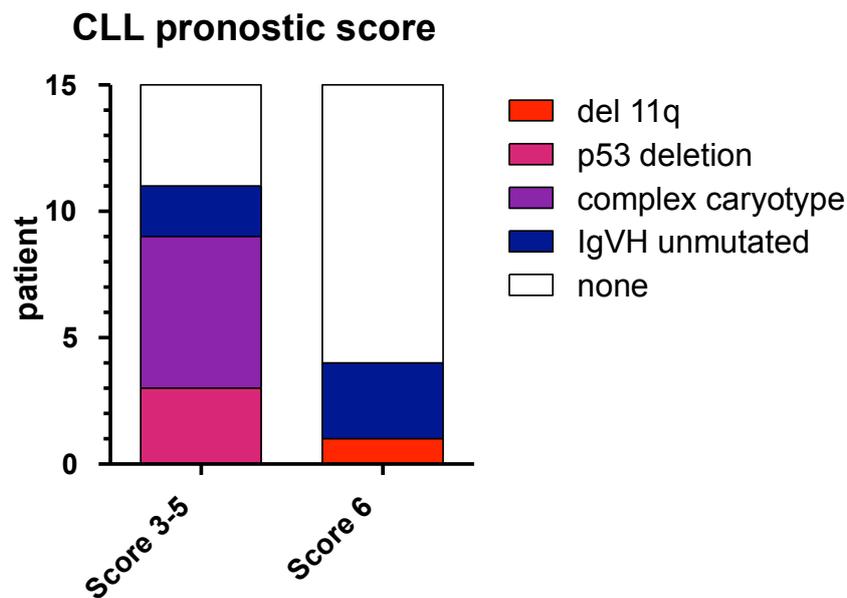


Figure 19 : Répartition des anomalies cytogénétiques des CLL selon le score

De façon intéressante, et ce malgré l'effectif réduit de CLL (n=30), nous constatons que les CLL qui atteignent le score maximal de 6 présentent moins d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic que les CLL de score 3,4 et 5 (26% contre 73%, p=0.04).

II.2.3.2.2. SLPC-B CD5-/CD10-

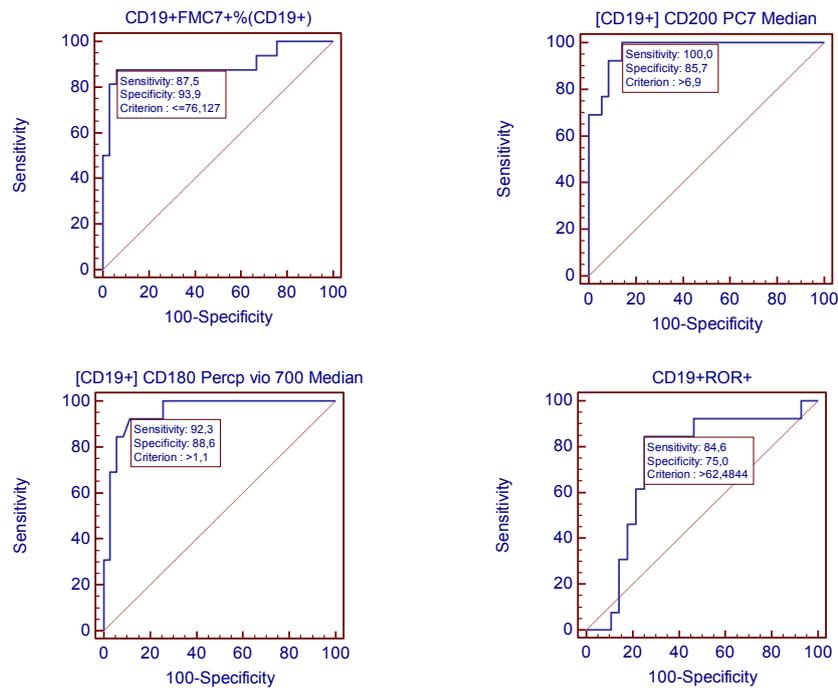


Figure 20 : Courbes ROC afin de déterminer la valeur prédictive du pourcentage de FMC7 dans les LPL versus les non LPL dans les SLPC-B CD5-/CD10- en haut à gauche. Courbes de ROC afin de déterminer les valeurs prédictives des paramètres d'intérêt : MFI de CD200 en haut à gauche ; MFI de CD180 en bas à gauche et pourcentage de ROR1 en bas à droite dans les HCL versus les non HCL dans les SLPC-B CD5-/CD10-

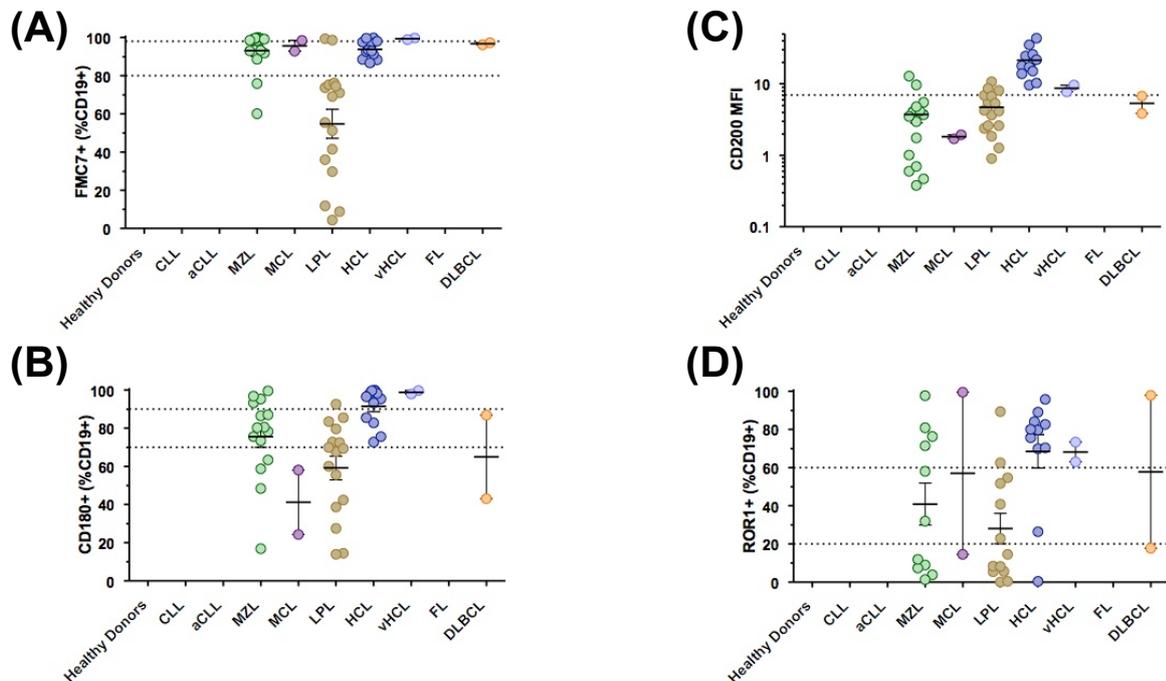


Figure 21 : Représentations graphiques de la distribution des marqueurs ayant un intérêt diagnostique dans la différenciation des SLPC-B CD5-/CD10-. Pourcentage de positivité de FMC7 (A), pourcentage de positivité de CD180 (B), MFI de CD200 (C) et pourcentage de positivité de ROR1 (D) en fonction72 des SLPC-B CD5-/CD10-.

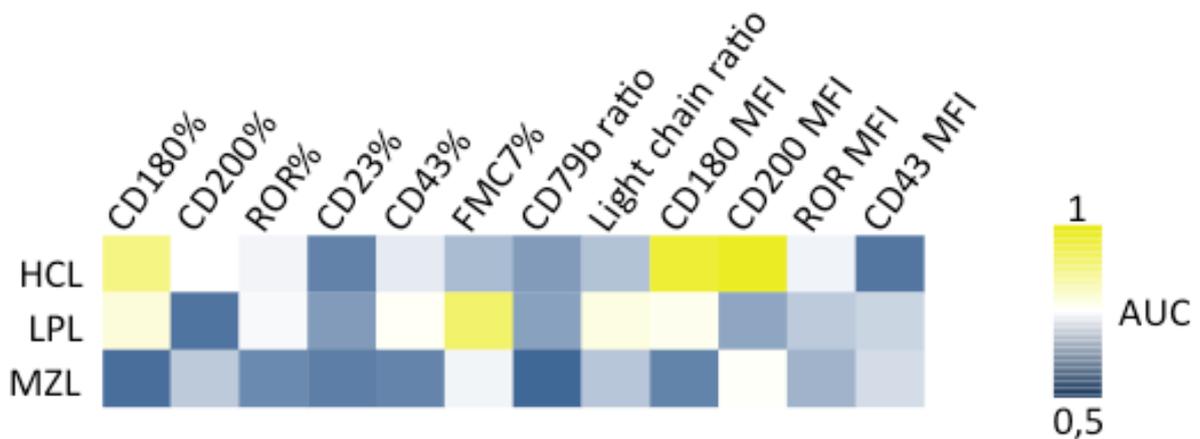


Figure 22 : Tableau récapitulatif des performances diagnostiques de chaque marqueur. Pour chacun des 3 SLPC-B est représenté par un code couleur la valeur de l'AUC du marqueur permettant de distinguer le lymphome en question des autres SLPC-B CD5-/CD10-

Les marqueurs présentant un intérêt à visée diagnostique car ayant un pouvoir discriminant des SLPC-B CD5-/CD10- sont représentés en Figures 20 et 21.

En ce qui concerne le LPL, un pourcentage de positivité de FMC7 inférieur à 76.13% permet d'affirmer le diagnostic avec une sensibilité de 87.5% et une spécificité de 93.9% (effectif positif = 16 ; effectif négatif = 33 ; AUC = 0.898 ; IC à 95% [0.777 : 0.966] ; P<0.0001).

Pour HCL :

- une valeur de MFI de CD200 supérieure à 6.9 permet d'affirmer le diagnostic avec une sensibilité de 100% et une spécificité de 85.7% (effectif positif = 23 ; effectif négatif = 35 ; AUC = 0.971 ; IC à 95% [0.877 : 0.998] ; P<0.0001) ;
- une valeur de pourcentage de CD180 supérieure à 92.52% permet d'affirmer le diagnostic avec une sensibilité de 71.4% et une spécificité de 88.6% (effectif positif = 14 ; effectif négatif = 35 ; AUC = 0.873 ; IC à 95% [0.747 : 0.951] ; P<0.0001)
- une valeur de pourcentage de ROR1 supérieure à 62.48% permet d'affirmer le diagnostic avec une sensibilité de 84.6% et une spécificité de 75% (effectif positif = 13 ; effectif négatif = 28 ; AUC= 0.734 ; IC à 95% [0.572 : 0.859] ; P<0.0075)

La Figure 22 récapitule les valeurs diagnostiques de chaque marqueur par leur valeur d'AUC représentée par un code couleur. Les marqueurs les plus discriminants dans la HCL sont les MFI de CD180 et CD200, le pourcentage de CD180 et de ROR1. Dans le LPL, le marqueur le plus discriminant est le FMC7.

Pour le pourcentage de positivité de CD180 dans le MZL, la valeur de l'AUC de la courbe de ROC des MZL (n=15) versus non MZL (n=34) est de 0,524 avec un IC à 95% [0,376 : 0.668] et P= 0.7846. Pour la valeur de MFI de CD180, la valeur de l'AUC de la courbe de

ROC des MZL (n=15) versus non MZL (n=33) est de 0,557 avec un IC à 95% [0.406 : 0.700] et P =0.5059.

D'après les résultats obtenus, nous avons au mis au point un score à visée diagnostique.

Les critères retenus pour établir ce score sont les suivants :

- FMC7%: $\geq 80\%$ = +1 $\geq 98\%$ = +2
- CD200 MFI: ≥ 7 = +2
- CD180%: $\geq 70\%$ = +1 $\geq 90\%$ = +2
- ROR%: $\geq 20\%$ = +1 $\geq 80\%$ = +2

Un score élevé est en faveur d'une HCL alors que score faible est en faveur d'un LPL.

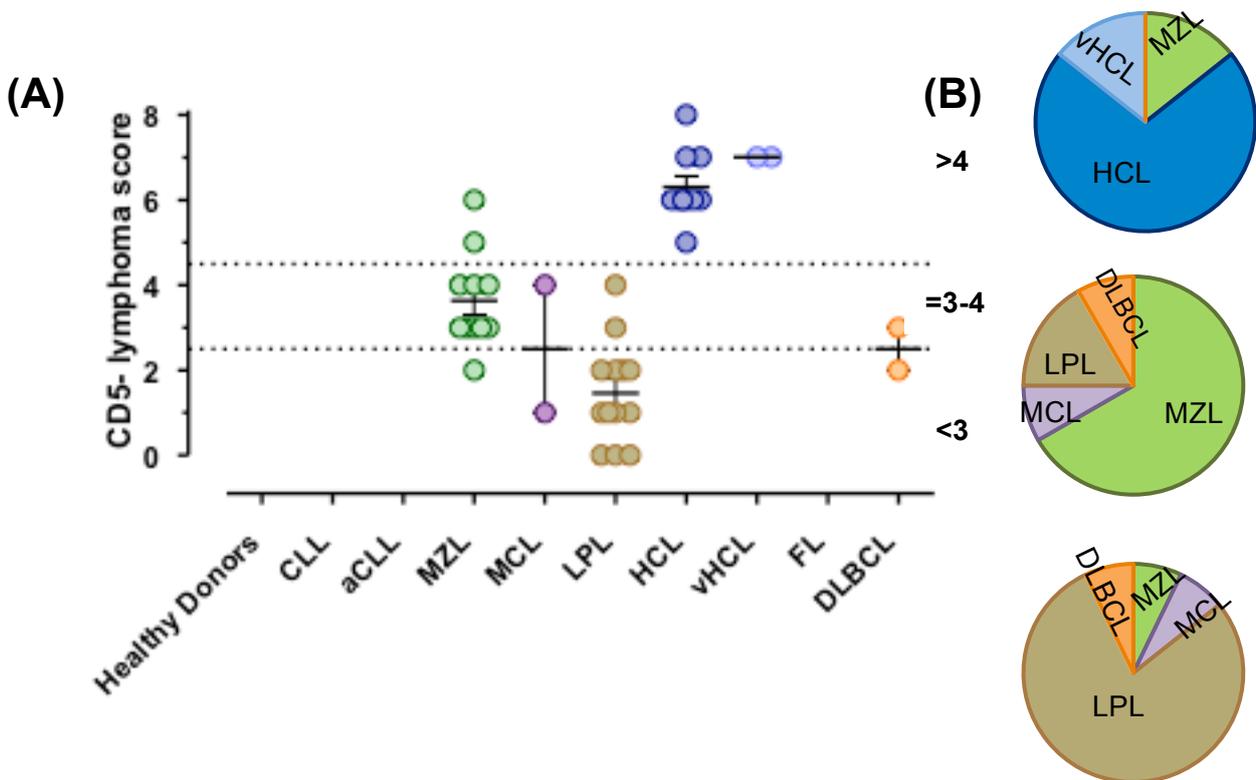


Figure 23 : Représentation graphique des scores obtenus en fonction des différents SLPC-B CD5-/CD10- (A). Représentation en diagramme circulaire de la répartition des SLPC-B CD5-/CD10- en fonction du score obtenu (B).

La Figure 23 reprend les scores obtenus en fonction des différents SLPC-B CD5-/CD10-. Toutes les HCL ont un score supérieur ou égal à 5. La plupart des MZL (81%) a un score intermédiaire compris entre 3 et 4, sauf 3/16 patients. La majorité des LPL (86%) ont un score faible inférieur ou égal à 2, sauf 2/15 patients qui ont un score intermédiaire.

Parmi les scores élevés (score supérieur ou égal à 5), 86% sont des HCL (dont 15% des vHCL) et 14% sont des MZL. Parmi les scores intermédiaires (score égal à 3 ou 4), 67% sont des MZL ; 17% sont des LPL; 8% sont des DLBCL et 8% sont des MCL. Parmi les scores faibles (score inférieur ou égal à 2), 79% sont des LPL, 7% sont des MCL, 7% sont des DLBCL et 7% sont des MZL.

II.2.4. Discussion

L'immunophénotypage lymphocytaire par CMF est l'outil diagnostique de première intention le plus adapté pour caractériser un SLPC-B. Classiquement, les SLPC-B sont classés en fonction de leur expression du CD5 et du CD10. Trois groupes principaux sont alors distinguables : les lymphomes CD5+/CD10- ; CD5-/CD10- et CD5-/CD10+. Le groupe présentant la co-expression de CD5 et de CD10 est plus rare (40).

Les représentations en diagramme ainsi que les courbes de ROC nous ont permis de dégager les marqueurs les plus discriminants pour l'immunophénotypage des SLPC-B d'une manière générale mais aussi au travers de chacun des groupes définis par l'expression de CD5 et de CD10.

Au sein du groupe CD5+/CD10-, un phénotype atypique peut poser un problème de diagnostic différentiel. Certains profils atypiques ont été observés dans notre étude comme les CLL CD23 négatives (n= 1/54) et les MCL CD5 négatifs (n= 2/13) ou CD23 positifs (n= 4/13). Le diagnostic précis a pu être porté par le recours à des examens complémentaires.

Nous avons observé dans notre étude une dichotomie dans l'expression du CD200 entre la CLL et le MCL. Tous les cas de l'étude de CLL (sauf n= 2/54 patients) présentent une expression modérée à importante du CD200 alors que les MCL présentent une expression faible voire négative de CD200. Des résultats semblables ont été obtenus par Palumbo et al. (47), Alapat et al. (82), Sandes et al. (83), Challangundla et al. (84) et Rahman et al. (85). Certaines études relatent néanmoins quelques rares phénotypes aberrants de CLL CD200 plus faibles ou de MCL plus forts, soulignant ainsi que ce marqueur ne peut être utilisé seul.

Challangundla et al. (84) ont trouvé une différence significative de l'expression de CD200 dans les CLL étudiées entre le sang périphérique et la moelle osseuse alors que Rahman et al. n'en ont pas retrouvé (85). Rahman et al. (85) n'ont pas mis en évidence de différence significative entre la MFI de CD200 et les différents stades cliniques de la classification RAI des CLL. En ce qui concerne la corrélation de l'expression de CD200 avec le profil génétique, nous n'avons trouvé aucune différence significative avec le statut muté ou non muté des immunoglobulines ; la délétion de *TP53* ; la délétion d'*ATM* ; la délétion du chromosome 13 ; la délétion 11q ; la trisomie 12 ; la délétion du chromosome 6 et la délétion 17p (données non présentées). Challangundla et al. (84) ont mis en évidence une différence significative du niveau de CD200 entre les CLL trisomie 12 (expression diminuée) et les CLL non trisomie 12 sans montrer de différence significative avec les sujets sains. Il n'y avait pas de différence significative avec les autres sous-groupes d'anomalie génétiques de CLL. Dans notre cohorte de 30 CLL, nous montrons qu'un score bas (de 3 à 5) corrèle avec un mauvais pronostic cytogénétique.

Une expression forte de CD200 a été relevée dans les HCL (sauf 1/18 patients) et les vHCL, ce qui vient confirmer ce qui déjà été montré (83)(84). Les valeurs de MFI de vHCL semblent être inférieures à celles des HCL comme des travaux similaires ont pu le prouver (86). Le panel tricholeucocytes comprenant le CD11c, le CD25, le CD103 et le CD123 n'est pas testé systématiquement lors de la prescription d'un immunophénotypage lymphocytaire par CMF. Ce panel est ajouté devant toute suspicion cytologique ou lorsque le contexte clinique le

justifie. Ainsi, dans un cas non soupçonné, une expression forte de CD200 doit faire suspecter ce diagnostic dans le cas de SLPC-B CD5-/CD10-.

Nous avons constaté que l'expression de CD200 des autres SLPC-B testés était globalement en deçà de la CLL mais au-dessus du MCL. La plupart des études sur CD200 se sont focalisées sur la CLL et le MCL. Rahman et al. (85) ont trouvé des résultats similaires sur 38 cas de SLPC-B non CLL, non MCL. Cependant, l'intensité est variable et généralement plus faible que celle relevée dans la CLL (83)(84).

Peu de données sont publiées sur l'expression de CD180 dans les SLPC-B. En ce qui concerne les SLPC-B CD5+/CD10- ou CD5-/CD10-, le CD180 semble être un marqueur peu discriminant. Décrit comme marqueur positif et solide du MZL par Mayeur-Rousse et al. (70), nous n'avons pu mettre en évidence de tels résultats. En revanche nos résultats coïncident avec Mayeur-Rousse et al. (70) au sujet des cas témoins et des HCL qui présentent des niveaux élevés en CD180. Les CLL, MCL, MZL et LPL ont des intensités d'expression de CD180 homogènes, similaires entre elles et inférieures aux sujets sains et HCL.

Le calcul des AUC des courbes de ROC de CD180 (pourcentage de positivité et MFI) dans les SLPC-B CD5+/CD10- et CD5-/CD10- sont voisines de 0,5 révélant ainsi un faible pouvoir discriminant pour ce marqueur.

Initialement décrite comme marqueur de la CLL (87)(88), l'expression de ROR1 concerne également d'autres SLPC-B (79)(89). L'expression de ROR1 était significativement élevée dans beaucoup de SLPC-B (excepté pour LPL, vHCL, FL et DLBCL) par rapport aux témoins. Les témoins semblent tous être ROR1 négatifs excepté 1 seul témoin sur 40 qui est très faiblement positif. Daneshmanesh et al. (88) et Fukuda et al. (90) ont montré que la protéine ROR1 n'était pas exprimé chez le sujet sain à l'exception d'une sous-population de progéniteurs B normaux (= hématogones, CD10+, CD19+, CD45+ diminué, CD38+ fort, CD34-, TdT-). Des valeurs de pourcentage de positivité supérieures à 46% et des valeurs de MFI supérieures 0,9 peuvent être considérées comme fort indicateur de l'existence d'une maladie lymphoproliférative. En revanche, la faible expression ou la négativité de ROR1 ne permet pas d'écarter une néoplasie lymphoïde car tous les FL ont un tel profil et également quelques MZL, LPL et HCL. Bien que la répartition des valeurs de pourcentage de positivité soit plus hétérogène que celles des MFI, l'expression de ROR1 était la plus élevée dans la CLL, suivie des MCL et MZL comme l'ont démontré Barna et al. (79) dans des expériences sur l'ARN messager de ROR1 et l'expression de ROR1 par CMF.

L'expression de ROR1 n'est pas limitée à la CLL car elle est partagée avec d'autres lymphomes comme l'ont également démontré Barna et al. (79). Uhrmacher et al. (89) ont prouvé qu'il n'y avait pas de différence significative de l'expression de ROR1 entre les CLL et au diagnostic et celles en cours de traitement par chimiothérapie (entre 2 et 6 cycles) ainsi qu'avec le statut CD38 ou ZAP70 et même entre les stades A de la classification de Binet et les patients ayant besoin de traitement. Au cours de notre étude, nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre l'intensité d'expression de ROR1 et les principales anomalies génétiques couramment recherchées dans la CLL (données non présentées car faible cohorte de 26 patients). La seule évaluation de ROR1 pour le diagnostic de CLL est bien-sûr insuffisante car son expression est partagée avec d'autres SLPC-B. ROR1 pourrait être également intéressant comme marqueur pour la surveillance et le suivi des patients atteints de CLL.

L'expression de ROR1 étant retrouvée dans différents SLPC-B, son inhibition pourrait être le fruit de nouvelles thérapeutiques ciblés (anticorps monoclonaux anti-ROR1 ou inhibiteurs de tyrosine kinase) (91) (92). A noter également qu'une expression de ROR1 a été mise en évidence dans d'autres hémopathies comme le myélome multiple ou les leucémies aigues myéloïdes (93).

La valeur diagnostique d'un marqueur à lui seul étant insuffisante, il est utile de combiner les résultats de plusieurs marqueurs à visée diagnostique afin de proposer une hypothèse diagnostique avec davantage de certitude. D'autant plus qu'une étude récente sur les hémopathies malignes a montré que 13% des diagnostics initiaux étaient modifiés a posteriori (94). Cette association de marqueurs est utilisée quotidiennement pour la CLL et la HCL avec les scores de Matutes (1) (57). En effet, ces scores permettent d'évoquer une CLL avec une précision de 98% pour un score ≥ 3 ou d'écarter une CLL avec une précision de 94,6%. Pour la HCL, un score des tricholeucocytes ≥ 3 permet d'avancer le diagnostic avec une précision de 98%.

Köhnke et al. (95) ont démontré que le CD200 présentait une spécificité élevée dans le diagnostic de CLL. Ils ont alors établi un score à visée diagnostique incluant CD5, CD23, FMC7, CD79b et CD200. Ce score présente une sensibilité élevée (97,1% contre 98,6% pour le score de Matutes, $P= 0,38$) et une spécificité considérablement accrue (87,2% contre 53,2%, $P= 0,001$).

Dans l'objectif de vérifier les résultats obtenus par Köhnke et son équipe sur le CD200, nous avons trouvé judicieux de séparer les SLPC-B CD5+/CD10- et CD5-/CD10-, d'augmenter le nombre de SLPC-B non CLL et de combiner les résultats des marqueurs classiques à ceux nouvellement étudiés, à savoir CD180 et ROR1. Nous souhaitons également mettre en place nos propres scores pour augmenter la puissance diagnostique.

Dans les SLPC-B CD5+/CD10-, les marqueurs les plus discriminants pour la CLL sont le CD200 (%), le CD23 (%), le CD43 (%), le CD79b (ratio) et la MFI de CD200. Le FMC7 (%) est un peu moins discriminant dans notre étude (sensibilité de 57,4% ; spécificité de 92,9 ; AUC de 0,758) que dans l'étude de Köhnke et al. (95) (sensibilité de 90,4% ; spécificité de 74,4% ; AUC de 0,88). Cela est certainement dû au fait que l'échantillonnage n'est pas le même. Nous avons moins de CLL (51 contre 101) mais davantage de non CLL (31 contre 22). Quoi qu'il en soit, nos résultats semblent corroborer ceux de cette étude. De plus, 100% de nos CLL ont un score ≥ 3 et 100% de nos MCL ont score < 3 ce qui permet d'éviter un diagnostic erroné en cas de doute sur un score de Matutes égal à 3.

Bien que très informative, l'évaluation de CD200 dans le diagnostic différentiel de CLL n'est pas nécessaire selon les critères OMS (13). Les directives Euroflow et de nombreuses publications ont néanmoins démontré sa valeur diagnostique (96).

Dans les SLPC-B CD5-/CD10-, les marqueurs les plus discriminants pour la HCL sont CD180 (%), CD200 (%) et la MFI de CD200. La valeur diagnostique importante de CD200 dans la HCL vient du fait que dans les SLPC-B CD5-/CD10-, les autres entités ne présentent que des intensités d'expression intermédiaires (MZL essentiellement) ou faibles (LPL essentiellement), contre des intensités d'expression fortes pour HCL et vHCL.

Pour le LPL, FMC7% paraît le marqueur le plus discriminant. Peu de données existent sur l'immunophénotypage du LPL. FMC7 (%) (marqueur de lignée B et épitope de CD20) est exprimé la plupart du temps et avec une intensité modérée (27). De façon surprenante nous avons mis en évidence que pour un FMC7% \leq 76,13%, nous avons une sensibilité de 87,5%, une spécificité de 93,9% et une AUC de 0,898 dans les SLPC-B CD5-/CD10-.

Au total, nous retrouvons l'intégralité des HCL dans les scores les plus élevés, la majorité des LPL dans les scores les plus faibles et la majorité des MZL dans la zone intermédiaire. Il s'agit encore d'un bon moyen pour éviter un diagnostic erroné, seulement la HCL n'est généralement pas le diagnostic différentiel des LPL. En effet, il existe généralement une forte suspicion cytologique, il existe 4 marqueurs spécifiques (57) de cette entité et le contexte clinique est différent. La principale difficulté se situe dans le diagnostic différentiel entre le MZL et le LPL qui peuvent présenter une similitude au niveau de cytologique, au niveau phénotypique (différenciation plasmocytaire), au niveau cytogénétique (certaines anomalies sont communes) et au niveau clinique car partageant certains points communs comme un syndrome tumoral ou un pic IgM. Malheureusement, ces deux entités peuvent présenter des scores diagnostiques identiques, ce qui ne permettra pas d'en faire la distinction avec certitude.

En ce qui concerne le MZL, il s'agit de l'entité la plus difficile à cerner phénotypiquement. Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion et le recours à des examens complémentaires est indispensable. Cependant, parmi les MZL CD5+ de notre étude, 74% ont un score \leq 3 et parmi les MZL CD5-, 81% ont des scores \geq 3 ce qui représente des données intéressantes.

Finalement, nous avons montré la valeur diagnostique de nouveaux marqueurs (CD180, CD200 et ROR1) dans le diagnostic différentiel des SLPC-B par CMF. Ces marqueurs combinés aux marqueurs classiques d'identification nous ont permis de mettre au point des scores diagnostiques, véritables aides lors de l'interprétation des immunophénotypes.

Conclusion

L'immunophénotypage lymphocytaire occupe une place prépondérante dans la démarche diagnostique des SLPC-B. La combinaison de l'examen cytologique et de la CMF apporte une réponse diagnostique rapide au clinicien.

Le CD200 est quasi systématiquement exprimé dans la CLL et son absence dans un SLPC-B CD5+/CD10- exclut pratiquement le diagnostic de CLL. Il permet de différencier les CLL des MCL ayant des niveaux d'expression en CD200 ne se chevauchant pas. L'intensité d'expression importante de CD200 dans les HCL et vHCL permet de confirmer le diagnostic. Il serait judicieux et légitime d'inclure le CD200 dans un panel primaire d'anticorps pour l'immunophénotypage des SLPC-B.

Le CD180 est moins prometteur qu'attendu car il ne permet pas d'argumenter un MZL. Des niveaux élevés peuvent néanmoins faire évoquer une HCL.

Le ROR1, qui n'est pas seulement exprimé dans la CLL, constitue un élément supplémentaire pour affirmer un SLPC-B quand il est élevé. Cependant, son expression pouvant être hétérogène il convient de se méfier lorsque l'on est confronté à des valeurs faibles qui ne peuvent écarter un lymphome. En effet, parmi les SLPC-B CD10+, les FL sont ROR1 négatifs ou faibles. A contrario, au niveau médullaire chez le sujet sain, les hémotogones (naturellement CD10+) sont caractérisés par une positivité de ROR1. Il s'agit là d'une notion importante à retenir pour s'affranchir des hémotogones lors d'une analyse de moelle osseuse.

Ces nouveaux marqueurs, bien que présentant un intérêt certain, doivent être interprétés avec précaution car il existe toujours des zones de chevauchement entre chaque entité. Cela dit, ces marqueurs sont davantage utilisés en complément dans les cas les plus atypiques.

L'élaboration de score à visée diagnostique simple à calculer est un outil supplémentaire et intéressant pour aider à l'interprétation quotidienne des immunophénotypages. Cette interprétation ne doit pas être déconnectée des données de la cytologie et de l'ensemble des arguments disponibles lors de la validation biologique. Elle doit aussi tenir compte de la fréquence des phénotypes atypiques.

Références bibliographiques

1. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the Chronic Lymphocytic Leukemia Scoring System With the Monoclonal Antibody SN8(CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1 oct 1997;108(4):378-82.
2. Baba Y, Pelayo R, Kincade PW. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol*. décembre 2004;25(12):645-9.
3. Plonquet A. Différenciation lymphocytaire B normale. *Rev Francoph Lab*. mai 2013;2013(452):27-35.
4. Hendriks RW, Middendorp S. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends Immunol*. mai 2004;25(5):249-56.
5. Weller S, Reynaud C-A, Weill J-C. Vaccination against encapsulated bacteria in humans: paradoxes. *Trends Immunol*. février 2005;26(2):85-9.
6. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol*. mai 2002;2(5):323-35.
7. Lymphocytes B : diversité, ontogénèse, différenciation et activation - page82-7.-lymphocytes-b.pdf [Internet]. [cité 1 mars 2017]. Disponible sur: http://www.assim.refer.org/raisil/raisil/L02_files/page82-7.-lymphocytes-b.pdf
8. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, et al. New Approaches to Lymphoma Diagnosis. *ASH Educ Program Book*. 1 janv 2001;2001(1):194-220.
9. Küppers R, Klein U, Hansmann M-L, Rajewsky K. Cellular Origin of Human B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 11 nov 1999;341(20):1520-9.
10. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. avril 2005;5(4):251-62.
11. Guerard EJ, Bishop MR. Overview of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Dis Mon*. avr 2012;58(4):208-18.
12. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, 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*. 15 juin 2008;111(12):5446-56.
13. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2375-90.
14. Baseggio L, Felman P. Diagnostic des lymphocytoses hors LLC-typique. *Rev Francoph Lab*. mai 2013;2013(452):93-102.
15. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 28 déc 2000;343(26):1910-6.
16. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. juill 2012;26(7):1458-61.
17. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stilgenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. janv 2007;21(1):1-3.

18. Masson E. LLC : physiopathologie, diagnostic et approche thérapeutique [Internet]. EM-Consulte. [cité 4 août 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/806498/article/llcc-physiopathologiec-diagnostic-et-approche-ther>
19. Thieblemont C, Leblond V. Lymphomes de la zone marginale. EMC - Hématologie. janv 2008;3(1):1-9.
20. Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E, Traverse-Glehen A, Salles G, Coiffier B, et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol.* févr 2003;4(2):95-103.
21. Sole F, Woessner S, Florensa L, Espinet B, Mollejo M, Martin P, et al. Frequent involvement of chromosomes 1, 3, 7 and 8 in splenic marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* août 1997;98(2):446-9.
22. Andersen CL, Gruszka-Westwood A, Atkinson S, Matutes E, Catovsky D, Pedersen RK, et al. Recurrent genomic imbalances in B-cell splenic marginal-zone lymphoma revealed by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* janv 2005;156(2):122-8.
23. Camara-Clayette V, Hermine O, Ribrag V. Lymphome du manteau : un modèle biologique et clinique. EMC - Hématologie. janv 2011;6(2):1-10.
24. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood.* 11 nov 2010;116(19):3724-34.
25. al BL et. Epidémiologie de la leucémie à cellules capillaires dans le comté de Los Angeles. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 10 août 2017]. Disponible sur: https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=fr&prev=search&rurl=translate.google.fr&sl=en&sp=nmt4&u=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2340508&usg=ALkJrhg2dKtWT6lhCSwnKjS2alxv6OTZCg
26. *BRAF* Mutations in Hairy-Cell Leukemia. *N Engl J Med.* 8 sept 2011;365(10):960-2.
27. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus Panel Recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* avr 2003;30(2):110-5.
28. Groves FD, Travis LB, Devesa SS, Ries LA □G., Fraumeni JF. Waldenström's macroglobulinemia: Incidence patterns in the United States, 1988-1994. *Cancer.* 15 mars 1998;82(6):1078-81.
29. Leblond V, Maloum K, Garff-Tavernier ML, Davi F, Nguyen-Khac F. La maladie de Waldenström ou macroglobulinémie. *Rev Francoph Lab.* mai 2013;2013(452):73-82.
30. Bosly A, Delos M, Michaux L. Lymphomes diffus à grandes cellules B. EMC - Hématologie. janv 2007;2(3):1-14.
31. SH S, E C, NL H, ES J, SA P, H S, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues [Internet]. [cité 11 juill 2017]. Disponible sur: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2008>
32. Nguyen-Khac F. Leucémie polymphocytaire B. *Rev Francoph Lab.* févr 2006;2006(379):45-7.
33. Gendron M-C. Cytométrie en flux. [Httpwwwem-Premiumcomdatatraitement-47641](http://www.em-premium.com/datatraitement/47641) [Internet]. 16 mai 2007 [cité 30 mars 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com/article/61453/resultatrecherche/7>
34. Merle-Béral H, Garff-Tavernier ML. Immunophénotypage des hémopathies malignes

- par cytométrie de flux. [Httpwwwem-Premiumcomdatatraitessa13-47155](http://www.em-premium.com/13-47155) [Internet]. 16 sept 2008 [cité 16 mars 2017]; Disponible sur: <http://www.em-premium.com/article/182927/resultatrecherche/1>
35. Drénou B, Fardel O, Fauchet R, Amiot L. La cytométrie en flux : intérêt dans le diagnostic phénotypique et le suivi des hémopathies malignes. *Ann Biol Clin (Paris)*. 25 nov 2002;60(6):663-72.
 36. de Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology*. 1 janv 2011;58(1):90-105.
 37. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. *Bull World Health Organ*. 1984;62(5):809-15.
 38. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 15 avr 2008;111(8):3941-67.
 39. Kussick SJ, Kalnoski M, Braziel RM, Wood BL. Prominent clonal B-cell populations identified by flow cytometry in histologically reactive lymphoid proliferations. *Am J Clin Pathol*. avr 2004;121(4):464-72.
 40. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 11 janv 2008;111(8):3941-67.
 41. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 1 avr 2011;25(4):567-74.
 42. Craig FE. Flow Cytometric Evaluation of B-cell Lymphoid Neoplasms. *Clin Lab Med*. sept 2007;27(3):487-512.
 43. Wood BL, Arroz M, Barnett D, DiGiuseppe J, Greig B, Kussick SJ, 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*. 2007;72B(S1):S14-22.
 44. Garff-Tavernier ML, Costopoulos M, Merle-Béral H. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B. [/data/revues/1773035X/00430452/37/](http://www.em-consulte.com/en/article/806496) [Internet]. 29 avr 2013 [cité 10 juill 2017]; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/806496>
 45. Shirai T, Hirose S, Okada T, Nishimura H. CD5+ B cells in autoimmune disease and lymphoid malignancy. *Clin Immunol Immunopathol*. mai 1991;59(2):173-86.
 46. Matutes E, Catovsky D. The Value of Scoring Systems for the Diagnosis of Biphenotypic Leukemia and Mature B-Cell Disorders. *Leuk Lymphoma*. janv 1994;13(sup1):11-4.
 47. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. sept 2009;33(9):1212-6.
 48. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen Y-H. Immunophenotypic Variations in Mantle Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol*. nov 2009;132(5):699-706.
 49. Liu Z, Dong HY, Gorczyca W, Tsang P, Cohen P, Stephenson CF, et al. CD5- Mantle Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol*. août 2002;118(2):216-24.
 50. Kelemen K, Peterson LC, Helenowski I, Goolsby CL, Jovanovic B, Miyata S, et al. CD23+ Mantle Cell Lymphoma: A Clinical Pathologic Entity Associated With Superior

Outcome Compared With CD23– Disease. *Am J Clin Pathol.* août 2008;130(2):166-77.

51. Meyerson HJ, MacLennan G, Husel W, Tse W, Lazarus HM, Kaplan D. 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.* 1 févr 2006;125(2):241-50.
52. Stark AN, Limbert HJ, Roberts BE, Jones RA, Scott CS. Prolymphocytoid transformation of CLL: a clinical and immunological study of 22 cases. *Leuk Res.* 1986;10(10):1225-32.
53. Ferry JA, Yang WI, Zukerberg LR, Wotherspoon AC, Arnold A, Harris NL. CD5+ extranodal marginal zone B-cell (MALT) lymphoma. A low grade neoplasm with a propensity for bone marrow involvement and relapse. *Am J Clin Pathol.* janv 1996;105(1):31-7.
54. Lin P, Medeiros LJ. Lymphoplasmacytic lymphoma/waldenstrom macroglobulinemia: an evolving concept. *Adv Anat Pathol.* sept 2005;12(5):246-55.
55. Bahler, MD, PhD DW, Perkins, MD, PhD SL, Hartung L, Greenwood, MS JH, Jasionowski, MD TM. Analysis of CD10+ Hairy Cell Leukemia. *Am J Clin Pathol.* 1 août 2003;120(2):228-35.
56. Ray S, Craig FE, Swerdlow SH. Abnormal Patterns of Antigenic Expression in Follicular Lymphoma: A Flow Cytometric Study. *Am J Clin Pathol.* oct 2005;124(4):576-83.
57. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, Meeus P, Catovsky D. 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.* 1994;14 Suppl 1:57-61.
58. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *The Lancet.* juin 2004;363(9424):1869-71.
59. Cessna MH, Hartung L, Tripp S, Perkins SL, Bahler DW. Hairy cell leukemia variant: fact or fiction. *Am J Clin Pathol.* janv 2005;123(1):132-8.
60. Langabeer SE, O'Brien D, Liptrot S, Flynn CM, Hayden PJ, Conneally E, et al. Correlation of the BRAF V600E mutation in hairy cell leukaemia with morphology, cytochemistry and immunophenotype. *Int J Lab Hematol.* août 2012;34(4):417-21.
61. Troussard X, Belmekki A, Malet M, Cornet E. Étude des hémopathies malignes avec cellules chevelues. *Rev Francoph Lab.* mai 2013;2013(452):83-91.
62. Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Jorgensen JL, Lin P. Immunophenotypic Profile of Lymphoplasmacytic Lymphoma/Waldenström Macroglobulinemia. *Am J Clin Pathol.* 1 sept 2005;124(3):414-20.
63. San Miguel JF, Vidriales MB, Ocio E, Mateo G, Sánchez-Guijo F, Sánchez ML, et al. Immunophenotypic analysis of Waldenstrom's macroglobulinemia. *Semin Oncol.* avr 2003;30(2):187-95.
64. Hunter ZR, Branagan AR, Manning R, Patterson CJ, Ditzel Santos D, Tournilhac O, et al. CD5, CD10, and CD23 Expression in Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin Lymphoma.* mars 2005;5(4):246-9.
65. Porakishvili N, Memon A, Vispute K, Kulikova N, Clark EA, Rai KR, et al. CD180 functions in activation, survival and cycling of B chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol.* mai 2011;153(4):486-98.
66. Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors. *Microbes Infect.* mars 2000;2(3):251-5.
67. Miura Y, Shimazu R, Miyake K, Akashi S, Ogata H, Yamashita Y, et al. RP105 Is

- Associated With MD-1 and Transmits an Activation Signal in Human B Cells. *Blood*. 15 oct 1998;92(8):2815-22.
68. Chaplin JW, Kasahara S, Clark EA, Ledbetter JA. Anti-CD180 (RP105) Activates B Cells To Rapidly Produce Polyclonal Ig via a T Cell and MyD88-Independent Pathway. *J Immunol*. 15 oct 2011;187(8):4199-209.
69. Miguet L, Bogumil R, Decloquement P, Herbrecht R, Potier N, Mauvieux L, et al. Discovery and identification of potential biomarkers in a prospective study of chronic lymphoid malignancies using SELDI-TOF-MS. *J Proteome Res*. sept 2006;5(9):2258-69.
70. Mayeur-Rousse C, Guy J, Miguet L, Bouyer S, Geneviève F, Robillard N, et al. CD180 expression in B-cell lymphomas: A multicenter GEIL study. *Cytometry B Clin Cytom*. 1 sept 2016;90(5):462-6.
71. Wright GJ, Jones M, Puklavec MJ, Brown MH, Barclay AN. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology*. février 2001;102(2):173-9.
72. McCaughan GW, Clarks MJ, Hurst J, Grosveld F, Barclay AN. The gene for MRC OX-2 membrane glycoprotein is localized on human chromosome 3. *Immunogenetics*. 1 févr 1987;25(2):133-5.
73. Minas K, Liversidge J. Is the CD200/CD200 Receptor Interaction More Than Just a Myeloid Cell Inhibitory Signal? *Crit Rev Immunol*. 2006;26(3):213-30.
74. McWhirter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T, Potter KN, Mockridge CI, et al. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 janv 2006;103(4):1041-6.
75. Valenzuela DM, Stitt TN, DiStefano PS, Rojas E, Mattsson K, Compton DL, et al. Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*. sept 1995;15(3):573-84.
76. MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol*. juin 2005;7(6):591-600.
77. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 3 déc 2001;194(11):1639-47.
78. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 3 déc 2001;194(11):1625-38.
79. Barna G, Mihalik R, Timár B, Tömböl J, Csende Z, Sebestyén A, et al. ROR1 expression is not a unique marker of CLL. *Hematol Oncol*. 1 mars 2011;29(1):17-21.
80. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia*. août 2013;27(8):1722-8.
81. Masson E. Maladie de Waldenström ou macroglobulinémie [Internet]. EM-Consulte. [cité 19 juill 2017]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/866205/maladie-de-waldenstrom-ou-macroglobulinemie>
82. Alapat D, Coviello-Malle J, Owens R, Qu P, Barlogie B, Shaughnessy JD, et al. Diagnostic Usefulness and Prognostic Impact of CD200 Expression in Lymphoid Malignancies and Plasma Cell Myeloma. *Am J Clin Pathol*. 1 janv 2012;137(1):93-100.
83. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N,

Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 1 mars 2014;86(2):98-105.

84. Challagundla P, Medeiros LJ, Kanagal-Shamanna R, Miranda RN, Jorgensen JL. Differential Expression of CD200 in B-Cell Neoplasms by Flow Cytometry Can Assist in Diagnosis, Subclassification, and Bone Marrow Staging. *Am J Clin Pathol.* 1 déc 2014;142(6):837-44.

85. Rahman K, Kumar P, Gupta R, Singh MK, Nityanand S. Role of CD200 in differential diagnosis of mature B-cell neoplasm. *Int J Lab Hematol.* août 2017;39(4):384-91.

86. Pillai V, Pozdnyakova O, Charest K, Li B, Shahsafaei A, Dorfman DM. 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.* 1 oct 2013;140(4):536-43.

87. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, Levy JM, Kennedy MG, Lee E, et al. Unique Cell Surface Expression of Receptor Tyrosine Kinase ROR1 in Human B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 15 janv 2008;14(2):396-404.

88. Daneshmanesh AH, Mikaelsson E, Jeddi-Tehrani M, Bayat AA, Ghods R, Ostadkarampour M, et al. Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy. *Int J Cancer.* 1 sept 2008;123(5):1190-5.

89. Uhrmacher S, Schmidt C, Erdfelder F, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Hallek M, et al. Use of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) as a diagnostic tool in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res.* oct 2011;35(10):1360-6.

90. Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, et al. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci.* 26 févr 2008;105(8):3047-52.

91. Daneshmanesh AH, Hojjat-Farsangi M, Khan AS, Jeddi-Tehrani M, Akhondi MM, Bayat AA, et al. Monoclonal antibodies against ROR1 induce apoptosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leukemia.* juin 2012;26(6):1348-55.

92. Yang J, Baskar S, Kwong KY, Kennedy MG, Wiestner A, Rader C. Therapeutic Potential and Challenges of Targeting Receptor Tyrosine Kinase ROR1 with Monoclonal Antibodies in B-Cell Malignancies. *Bunce C, éditeur. PLoS ONE.* 15 juin 2011;6(6):e21018.

93. Daneshmanesh AH, Porwit A, Hojjat-Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Tamm KP, Grandér D, et al. Orphan receptor tyrosine kinases ROR1 and ROR2 in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma.* avril 2013;54(4):843-50.

94. Engel-Nitz NM, Eckert B, Song R, Koka P, Hulbert EM, McPheeters J, et al. Diagnostic testing managed by hematopathology specialty and other laboratories: costs and patient diagnostic outcomes. *BMC Clin Pathol [Internet].* déc 2014 [cité 6 sept 2017];14(1). Disponible sur: <http://bmcclinpathol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6890-14-17>

95. Köhnke T, Wittmann VK, Bücklein VL, Lichtenegger F, Pasalic Z, Hiddemann W, et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. *Br J Haematol [Internet].* 18 août 2017 [cité 29 août 2017]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.14901>

96. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* sept

2012;26(9):1908-75.

Annexe 1 : Préparation des échantillons pour la cytométrie en flux

Marquage des sous-populations lymphocytaires :

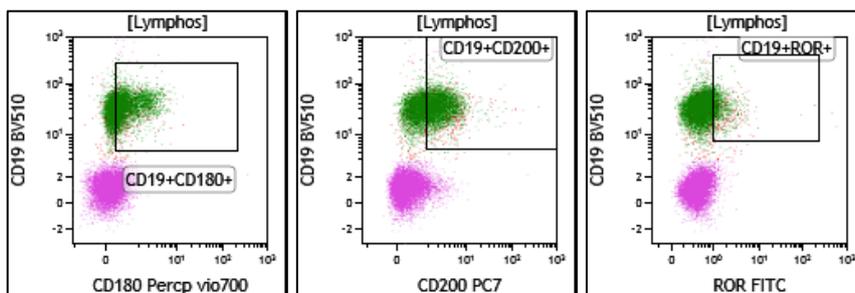
- Incubation de 50µL de sang total ou de moelle osseuse anticoagulés par l'EDTA (tubes de 2, 4.5 ou 7 ml) ou de 100 µl pour les liquides pleuraux, pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un tube à hémolyse avec le panel d'anticorps monoclonaux ;
- lyse des globules rouges avec 500µl de BD FACSLysis (BD biosciences) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ;
- acquisition sur le cytomètre.

Marquage des lymphocytes B :

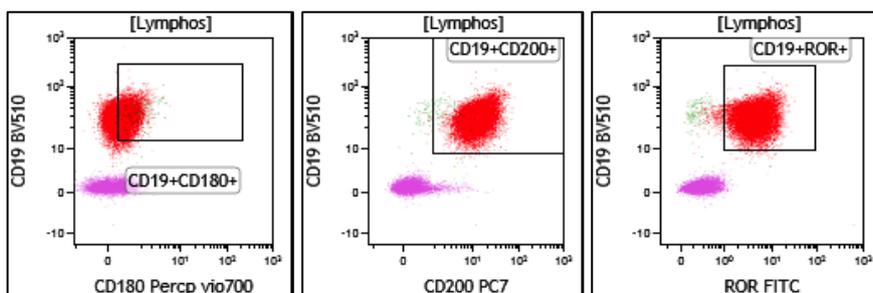
- Incubation de 100µl de moelle osseuse totale ou de sang total anticoagulé par EDTA (tubes de 2, 4.5 ou 7 ml) ou 200µl de liquide pleural pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière dans un tube à hémolyse avec le panel d'anticorps monoclonaux ;
- lyse des globules rouges avec 2ml de BD FACSLysis à 10% (BD biosciences) pendant 15 minutes ;
- lavage des cellules avec 2 ml de CellWash (BD biosciences) et reprise dans 250µl de cette même solution ;
- acquisition sur le cytomètre.

	FITC	PE	PEC594	PerCP 5.5	PC7	APC	AA700	APCG7	BV421	BV510
TBNK		CD16	CD56		CD4	CD8	CD3	CD45		CD19
		10 µl	5 µl		2 µl	2 µl	5 µl	1.5 µl		1.5 µl
Matutes	FMC7	LAMBDA		CD79B	CD5	KAPPA		CD45	CD23	CD19
	3 µl	6 µl		3 µl	1.5 µl	6 µl		1.5 µl	1.5 µl	1.5 µl
Lymphome	ROR	CD43		CD180	CD200	CD22	CD20	CD45	CD10	CD19
	5 µl	3 µl		10 µl	5 µl	2 µl	2 µl	1.5 µl	2 µl	1.5 µl
Tricho.	CD103			CD123		CD11C		CD45	CD25	CD19
	3 µl	3 µl		3 µl		3 µl		1.5 µl	5 µl	1.5 µl

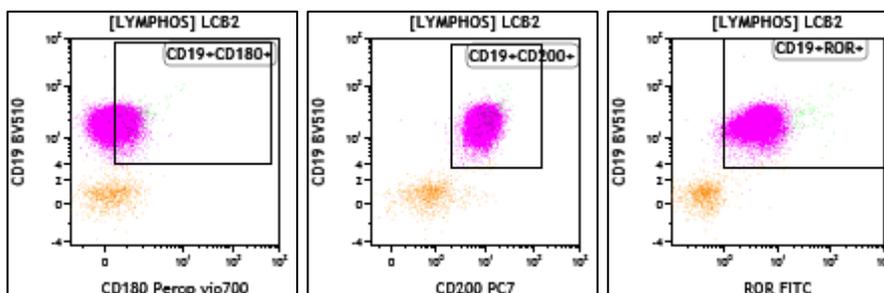
Annexe 2 : Exemples d'histogrammes biparamétriques obtenus



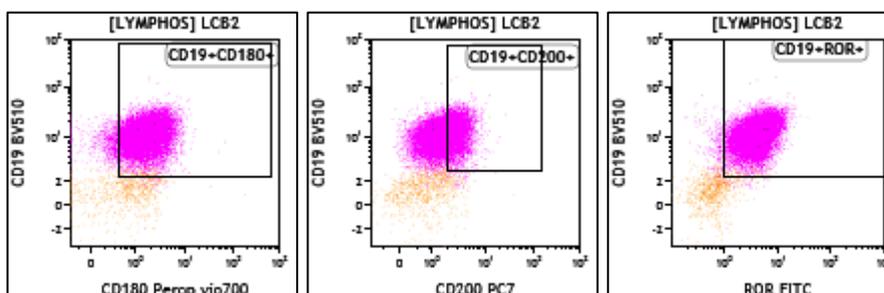
Sujet sain



Patient CLL



Patient aCLL



Patient MCL

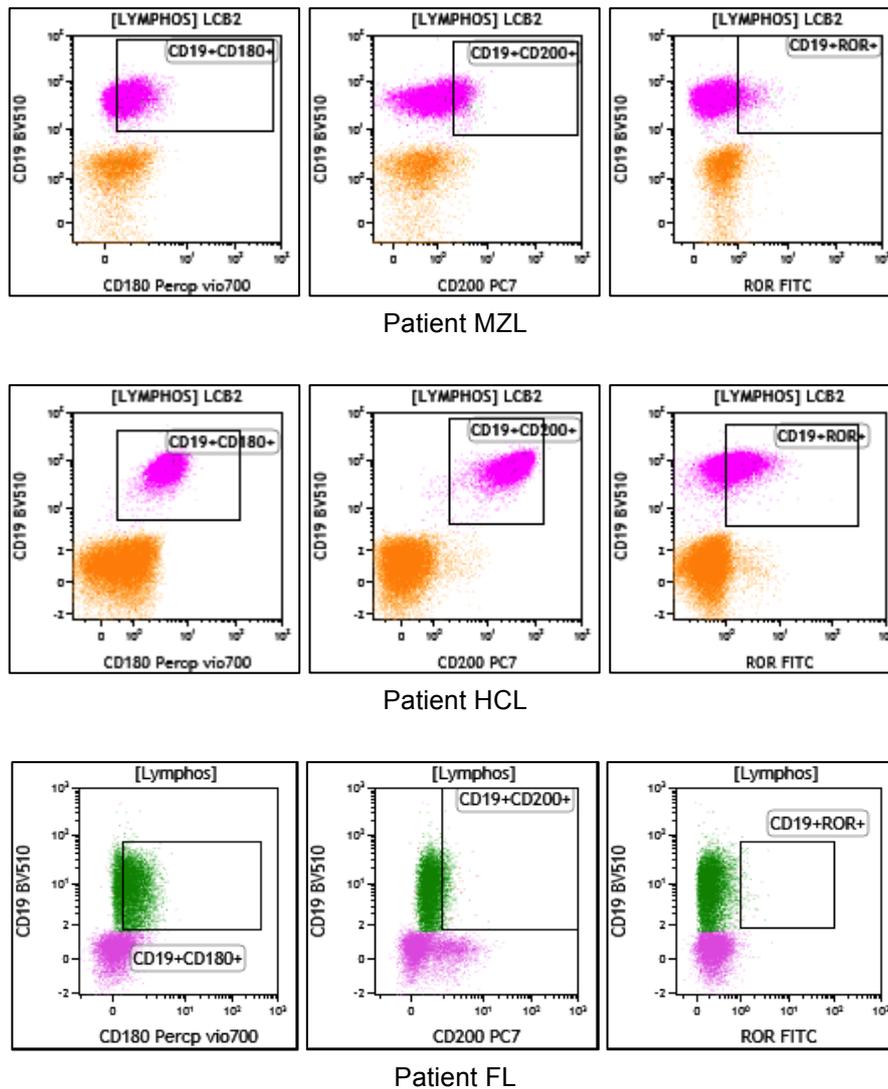


Figure 24 : Exemples de résultats obtenus

Le sujet sain exprime de façon modérée le CD180 et le CD200, en étant négatif pour ROR1. Les sujets CLL et aCLL expriment modérément le CD180 mais sont caractérisés par une expression forte de CD200 et de ROR1. Le patient MCL exprime modérément le CD180, faiblement le CD200 et fortement le ROR1. Le Patient MZL exprime de façon modérée le CD180, CD200 et ROR1 contrairement au patient HCL qui exprime fortement ces 3 marqueurs. Le patient FL exprime modérément le CD180 et est négatif pour CD200 et ROR1.

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

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

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les 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.

Analyse de nouveaux marqueurs (CD180, CD200 et ROR1) dans le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs par cytométrie en flux

L'immunophénotypage lymphocytaire sanguin ou médullaire occupe une place importante dans le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. Dans 20% des cas environ, un diagnostic précis ne peut être formulé. La pathologie tumorale n'est donc pas confirmée soit par absence de marqueurs spécifiques, soit parce que l'examen anatomopathologique est non disponible ou non contributif. Le choix de panels d'anticorps, la recherche de nouveaux marqueurs, et l'interprétation de l'immunophénotypage prennent alors une place importante dans la démarche diagnostique. Nous avons évalué les différents marqueurs du panel lymphocytaire existant ainsi que les nouveaux marqueurs : CD180, CD200 et ROR1. Dans un premier temps, nous avons étudié la distribution de ces nouveaux marqueurs en fonction de chaque syndrome lymphoprolifératif. Dans un second temps, nous avons combiné les résultats précédemment obtenus avec ceux des marqueurs inclus dans nos panels d'exploration habituels afin d'établir des scores à visée diagnostique. Les nouveaux marqueurs apportent des arguments complémentaires dans l'interprétation. Il a été retrouvé une expression forte de CD200 dans la CLL et la HCL, une expression faible de CD200 dans le MCL, une expression forte de CD180 dans la HCL. Le ROR1 est un marqueur de pathologie lymphomateuse. Les scores diagnostiques permettent de distinguer les CLL des MCL dans les SLPC-B CD5+/CD10- et les HCL, MZL et LPL dans les SLPC-B CD5-/CD10-.

Mots-clés : Syndromes lymphoprolifératifs chroniques B, Cytométrie en flux, Immunophénotypage lymphocytaire, CD180, CD200, ROR1.

Analysis of new markers (CD180, CD200 and ROR1) in the differential diagnosis of lymphoproliferative disorders by flow cytometry

Blood or medullary lymphocyte immunophenotyping is an important part of the diagnosis of chronic B-cell lymphoproliferative disorders. In about 20% of cases, a precise diagnosis can not be established. The tumor pathology is therefore not confirmed either by absence of specific markers or because pathological examination is unavailable or non-contributory. The selection of antibody panels, the search for new markers, and the interpretation of immunophenotyping are important in the diagnostic procedure. We evaluated the different markers of the existing lymphocyte panel as well as the new markers: CD180, CD200 and ROR1. First, we studied the distribution of these new markers according to each lymphoproliferative syndrome. Secondly, we combined the results obtained previously with those of the markers included in our usual exploration panels in order to establish diagnostic scores. It was found a strong expression of CD200 in CLL and HCL, a weak expression of CD200 in MCL, a strong expression of CD180 in HCL. ROR1 is a marker of lymphoproliferative disorder. Diagnostic scores distinguish CLL from MCL in CD5 + / CD10-SLPC-B and HCL, MZL and LPL in CD5- / CD10-SLPC-B.

Keywords : Lymphoproliferative disorders, Flow cytometry, Lymphocyte immunophenotyping, CD180, CD200, ROR1.

Thèse réalisée au laboratoire d'Hématologie du CHU de Toulouse – Institut Universitaire du Cancer de Toulouse – Oncopole – 1, avenue Irène Joliot-Curie – 31059 Toulouse cedex 9 - FRANCE

