



Centre d'études doctorales : Sciences et techniques de l'ingénieur

N° d'ordre : 64 /2020

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : MERYEME ABDDAOUI

Spécialité : Immunologie et pathologie infectieuse

Apport de la Cytométrie en Flux dans le Diagnostic et le Suivi des Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques de type B

Thèse présentée et soutenue le 16 Novembre 2020 devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Mohammed BERRAHO	PES	FMP -Fès	Président
Hassan FELLAH	PES	FMP -Casablanca	Rapporteur
Abdallah BADOU	PES	FMP -Casablanca	Rapporteur
Samira RABHI	PES	FMP -Fès	Rapporteur
Sanae BENNIS	PES	FMP -Fès	Examineur
Imane TLAMCANI	P Ag	FMP -Fès	Examineur
Moncef AMRANI HASSANI	PES	FMP -Fès	Directeurs de thèse
Mohammed El-AZAMI EL-IDRISSI	PES	FMP -Fès	

Laboratoire d'accueil : Laboratoire d'hématologie du CHU HASSAN II-Fès-

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès

RESUME :

Les proliférations lymphomateuses regroupent l'ensemble de la pathologie tumorale qui prend naissance dans le système lymphatique. 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 (SLPCB). 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 et de répondre à plusieurs interrogations au moment du diagnostic ou lors du suivi du patient, essentielles à une prise en charge thérapeutique correcte. . 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 qui permet de poser le diagnostic de leucémie lymphoïde chronique lorsqu'il est supérieur ou égal à 4, et le score du diagnostic de leucémie à tricholeucocyte, 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 des différents marqueurs utilisés en routine dans les panels d'anticorps utilisés au CHU de Fès 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.

Mots clés : Cytométrie en flux, Diagnostic, Immunophénotypage

lymphocytaire, Syndrome lymphoprolifératif chronique B, Cluster de différenciation.

ABSTRACT :

Lymphomatous proliferations include the entire tumour pathology that originates in the lymphatic system. In some cases, lymphoma cells will pass into the peripheral blood and will be referred to as the leukemia phase of lymphoproliferative disease. In this case, lymphocytic immunophenotyping is the most appropriate first-line diagnostic tool for characterizing chronic lymphoproliferative syndrome B (SLPCB).

Flow cytometry has the advantage of being fast, being able to use a wide range of antibodies determine both an expression intensity of a marker and a percentage of cells and to answer several questions at the time of diagnosis or during the follow-up of the patient, essential for a correct therapeutic management. Although CMF has grown considerably over the past decade, the absence fully specific cytometric marker reduces diagnostic accuracy and poses a management problem adapted to the patient.

Apart from the existence of the Matutes/Moreau score which makes it possible to diagnose chronic lymphocytic leukemia when greater than or equal to 4, and the score of the diagnosis of tricholeucocyte leukemia, there is no broad international recommendation on the diagnostic strategy to be adopted for other SLPC-B.

The study we are presenting aimed to assess the intensity values of fluorescence of the various markers routinely used in the antibody panels used at the University Hospital of Fez as well as the distribution of these markers according to the different CLPS-B. These data are of great help to the medical biologist in the daily interpretation of lymphocyte immunophenotyping.

Keywords: Flow cytometry, Diagnosis, lymphocyte Immunophenotyping, Chronic lymphoproliferative syndrome B, cluster of Differentiation.

DEDICACE

Je dédie ce travail

À mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur amour, soutien et leurs encouragements

À mon fils

À mon frère et mes sœurs

À mes amis et collègues

À tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail

REMERCIEMENTS

A Allah

Tout puissant

Qui m'a inspiré

Qui m'a guidé dans le bon chemin

Je vous dois ce que je suis devenue

Louanges et remerciements

Pour votre clémence et miséricorde.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mes encadrants qui n'ont pas cessé de me soutenir. Leurs compétences diversifiées et complémentaires ont permis à cette thèse de voir le jour et l'ont considérablement valorisée.

*J'adresse tout d'abord mes remerciements les plus distingués à mon directeur de thèse Professeur **AMRANI HASSANI MONCEF** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse sous sa direction. Je le remercie vivement pour ses qualités humaines, pour son soutien consécutif et pour sa disponibilité durant les différentes étapes de ce travail.*

*J'exprime mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance la plus profonde à mon directeur de thèse Professeur Mr **EL-AZAMI-EL-IDRISSI Mohammed** d'avoir accepté de m'inscrire en doctorat sous sa direction. Je le remercie vivement pour son encadrement professionnel, son suivi méticuleux des différentes étapes de la thèse et pour sa révision minutieuse du manuscrit. Je voudrais le remercier particulièrement pour ses discussions enrichissantes, pour sa*

patience et pour le temps et l'effort énorme qu'il m'a consacré depuis le début jusqu'à la dernière minute de la thèse.

*J'exprime mes plus sincères remerciements à mon Professeur Mme **TLEMCAANI IMANE** d'avoir accepté d'encadrer la partie pratique de cette thèse. Je la remercie particulièrement pour sa disponibilité, pour la confiance et l'autonomie qu'elle m'a constamment témoignées. Ses excellentes qualités humaines m'ont énormément marqué. Cette thèse n'aurait pu voir le jour sans sa contribution. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.*

*Je tiens à remercier chaleureusement Professeur Mr **BERAHO MOHAMMED** de m'avoir fait l'honneur de Présider le jury de cette thèse. C'est pour moi l'occasion de lui exprimer ma profonde estime et respect.*

*J'adresse mes remerciements les plus profonds aux Professeurs Mme **RABHI SAMIRA**, Mr **FELLAH HASSAN**, Mr **ABDELLAH BADOU** et Mme **BENNIS SANAE** pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs. Leur présence parmi le jury représente pour moi un très grand honneur.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude et mes profonds remerciements au Dr. **MERYEM ATASSI**, du grand intérêt qu'elle a porté à ce travail, de son aide incessante. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.*

Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à arriver à ce jour mémorable.

Liste des tableaux :

Tableau 1. Classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures	4
Tableau 2. Score de Matutes	20
Tableau 3. Critères diagnostiques de la maladie de Waldenström.....	27
Tableau 4. Classification d'Ann Arbor	29
Tableau 5. Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.....	43
Tableau 6. Exemple de spécificité de fluorochrome	45
Tableau 7. exemple de tandems	46
Tableau 8. Principaux fluorochromes utilisés	47
Tableau 9. Marqueurs de différenciation lymphoïdes B	54
Tableau 10. Profil immunophénotypique dans la maladie de Waldenström.....	59
Tableau 11. Caractéristiques phénotypiques des SLPC-B	60
Tableau 12. Classification des SLPC-B	61
Tableau 13. Répartition des syndromes lymphoprolifératifs chroniques selon l'âge.....	67
Tableau 14. Répartition des SLPC-B selon l'âge.....	69
Tableau 15. les IFM des différents CD au cours de la LLC.....	78
Tableau 16. les IFM des différents CD au cours du LM.....	78
Tableau 17. les IFM des différents CD au cours de la LPL-B	79
Tableau 18. les IFM des différents CD au cours du LF	79
Tableau 19. les IFM des différents CD au cours de la LT	80
Tableau 20. les IFM des différents CD au cours du LZMS	80
Tableau 21. profil immunophénotypique des SLPC-B selon IFM de chaque marqueur	82
Tableau 22. Variable(s) de résultats tests: CD5 /LLC	83
Tableau 23. Variable(s) de résultats tests: CD23 /LLC	84
Tableau 24. Variable(s) de résultats tests: CD79b /LLC	85
Tableau 25. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LLC.....	86
Tableau 26. Tableau 26 : Variable(s) de résultats tests : Kappa /LLC.....	87
Tableau 27. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LLC	88
Tableau 28. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LLC	89
Tableau 29. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LLC	90
Tableau 30. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LLC.....	91
Tableau 31. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LLC	92
Tableau 32. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LLC	93
Tableau 33. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LLC	94

Tableau 34. Variables de résultats tests les plus discriminants CD5/CD23/CD43.....	95
Tableau 35. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LM.....	96
Tableau 36. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LM.....	97
Tableau 37. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LM.....	98
Tableau 38. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LM.....	99
Tableau 39. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LM Tableau : variable de résultats tests : Lambda /LM.....	100
Tableau 40. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LM.....	101
Tableau 41. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LM.....	102
Tableau 42. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LM.....	103
Tableau 43. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LM.....	104
Tableau 44. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LM.....	105
Tableau 45. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LM.....	106
Tableau 46. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LM.....	107
Tableau 47. Variables de résultats tests les plus discriminants.....	108
Tableau 48. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LPL-B.....	109
Tableau 49. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LPL-B.....	110
Tableau 50. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LPL-B.....	111
Tableau 51. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LPL-B.....	112
Tableau 52. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LPL-B Tableau : variable de résultats tests: Lambda /LPL-B.....	113
Tableau 53. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LPL-B.....	114
Tableau 54. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LPL-B.....	115
Tableau 55. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LPL-B.....	116
Tableau 56. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LPL-B.....	117
Tableau 57. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LPL-B.....	118
Tableau 58. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LPL-B.....	119
Tableau 59. variables de résultats tests les plus discriminants.....	120
Tableau 60. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LF.....	121
Tableau 61. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LF.....	122
Tableau 62. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LF.....	123
Tableau 63. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LF.....	124
Tableau 64. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LF Tableau : variable de résultats tests : Lambda /LF.....	125
Tableau 65. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LF.....	126

Tableau 66. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LF	127
Tableau 67. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LF	128
Tableau 68. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LF.....	129
Tableau 69. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LF	130
Tableau 70. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LF	131
Tableau 71. Variables de résultats tests les plus discriminants.....	132
Tableau 72. Variable(s)de résultats tests : CD5 /LT	133
Tableau 73. Variable(s)de résultats tests : CD23 /LT	134
Tableau 74. Variable(s)de résultats tests : CD79b /LT	135
Tableau 75. Variable(s)de résultats tests : FMC7 /LT	136
Tableau 76. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LT Tableau : variable de résultats tests : Lambda /LT.....	137
Tableau 77. Variable(s)de résultats tests : CD25 /LT	138
Tableau 78. Variable(s)de résultats tests : CD11c /LT	139
Tableau 79. Variable(s)de résultats tests : CD103 /LT	140
Tableau 80. Variable(s)de résultats tests : CD10 /LT	141
Tableau 81. Variable(s)de résultats tests : CD22 /LT	142
Tableau 82. variables de résultats tests les plus discriminants CD25/CD11c/CD103	143
Tableau 83. Variable(s)de résultats tests : CD5 /LZMS	144
Tableau 84 . Variable(s)de résultats tests : CD23 /LZMS	145
Tableau 85. Variable(s)de résultats tests : CD79b /LZMS	146
Tableau 86. Variable(s)de résultats tests : FMC7 /LZMS	147
Tableau 87. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LZMS Tableau : variable de résultats tests : Lambda /LZMS.....	148
Tableau 88. Variable(s)de résultats tests : CD43 /LZMS	149
Tableau 89. Variable(s)de résultats tests : CD38 /LZMS	150
Tableau 90. Variable(s)de résultats tests : CD25 /LZMS	151
Tableau 91. Variable(s)de résultats tests : CD11c /LZMS.....	152
Tableau 92. Variable(s)de résultats tests : CD103 /LZMS	153
Tableau 93. Variable(s)de résultats tests : CD22 /LZMS	154
Tableau 94. Variable(s)de résultats tests : CD10 /LZMS	155
Tableau 95. Variables de résultats tests les plus discriminants.....	156
Tableau 96. Valeur seuil selon une meilleure spécificité.....	157
Tableau 97. Tableau croisé CD5_5224 * LLC	158
Tableau 98. Tableau croisé CD23_2838 * LLC	158

Tableau 99. Tableau croisé CD43_2544,5 * LLC	159
Tableau 100. Tableau croisé CD5+CD23 * LLC.....	160
Tableau 101. Tableau croisé CD5+CD43 * LLC.....	160
Tableau 102. Tableau croisé CD23+CD43 * LLC.....	161
Tableau 103. Tableau croisé CD5+CD23+CD43 * LLC.....	161
Tableau 104. VPP et VPN des marqueurs discriminants	162
Tableau 105. Fréquence du CD5 selon nos valeurs seuils	164
Tableau 106. Fréquence du CD23 selon nos valeurs seuils	164
Tableau 107. Fréquence du CD79b selon nos valeurs seuils	165
Tableau 108. Fréquence du FMC7 selon nos valeurs seuils	165
Tableau 109. Fréquence d'Igs selon nos valeurs seuils	166
Tableau 110. Patients avec un score de Matutes supérieur à 4	166
Tableau 111. Tableau croisé matutes_supérieur ou égal à_4 * LLC	167
Tableau 112. Matutes supérieur ou égal à 3 * LLC	167

Liste des figures :

Figure 1. schéma de l'hématopoïèse. (Lacombe C. Hématologie 2006)	6
Figure 2. Lymphopoïèse B. Les différents stades en fonction du réarrangement des gènes et des marqueurs de différenciation.....	8
Figure 3. structure de base des immunoglobulines	10
Figure 4. réarrangement des gènes des immunoglobulines.....	12
Figure 5. Représentation schématique des évènements de recombinaison au locus IgH lors de la lymphopoïèse B.....	14
Figure 6. Ontogénie des lymphocytes et hémopathies malignes lymphoïdes B	16
Figure 7. Figure 7 , A : LLC Typique Figure 7 , B : LLC/LPL-B Figure 7 , C : LLC Mixte [2].	18
Figure 8. Profil immunophénotypique de LLC : score de Matutes égal à 5.....	19
Figure 9. forme classique du lymphome du manteau (www.hematocell.com)	21
Figure 10. cellule d'aspect monocytoïde du LZMS (www.hematocell.com).....	22
Figure 11. aspect cytologique de leucémie a tricholeucocyte (www.hematocell.com).....	23
Figure 12. Centrocytes du lymphome folliculaire (www.hematocell.com)	24
Figure 13. leucémie à polylmphocyte (www.hematocell.com).....	25
Figure 14 . Lymphome lymphoplasmocytaire (www.hematocell.com).....	28
Figure 15. Représentation schématique du fonctionnement d'un cytomètre de flux	36
Figure 16. représentation schématique de la focalisation hydrodynamique	37
Figure 17. Forward scatter.....	39
Figure 18. Side scatter.....	40
Figure 19. fluorescence	40
Figure 20. diagramme de jablonski	44
Figure 21. Exemple de fichier FCS et représentation graphique correspondante	48
Figure 22.répartition des différents types leucocytaires FS/SS.....	49
Figure 23. Représentation bi-paramétrique SS/CD45	49
Figure 24. Gaiting des différents éléments dans le sang total	50
Figure 25. représentation monoparamétrique.....	51
Figure 26. représentation bi paramétrique.....	52
Figure 27. Cytomètre en flux FC500 BECKMAN COULTER	64
Figure 28. Répartition des syndromes lymphoprolifératifs chroniques selon le type.	67
Figure 29. Répartition des syndromes lymphoprolifératifs chroniques selon le sexe.	68
Figure 30. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF de CD5 ; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.....	83
Figure 31. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF de CD23 ; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.....	84

Figure 32. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF de CD79b; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.	85
Figure 33. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du FMC7; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.	86
Figure 34. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour CLL versus non LLC dans les SLPC-B.	87
Figure 35. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.	88
Figure 36. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD38; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.	89
Figure 37. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.	90
Figure 38. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.	91
Figure 39. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.	92
Figure 40. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD10; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.	93
Figure 41. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD22; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.	94
Figure 42. Récapitulatifs des marqueurs	95
Figure 43. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD5; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	96
Figure 44. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD23; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	97
Figure 45. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD79b; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	98
Figure 46. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du FMC7; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	99
Figure 47. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	100
Figure 48. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	101
Figure 49. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD38; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	102
Figure 50. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	103
Figure 51. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	104

Figure 52. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	105
Figure 53. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD10; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	106
Figure 54. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD22; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.	107
Figure 55. Récapitulatif des marqueurs.....	108
Figure 56. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD5; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	109
Figure 57. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD23; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	110
Figure 58. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD79b; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	111
Figure 59. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du FMC7; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	112
Figure 60. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	113
Figure 61. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	114
Figure 62. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	115
Figure 63. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	116
Figure 64. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	117
Figure 65. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD22; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	118
Figure 66. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD10; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.	119
Figure 67. Récapitulatifs des marqueurs	120
Figure 68. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD5; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.	121
Figure 69. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD23; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.	122
Figure 70. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD79b; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.	123
Figure 71. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du FMC7; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.	124

Figure 72. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	125
Figure 73. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	126
Figure 74. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD38; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	127
Figure 75. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	128
Figure 76. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	129
Figure 77. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	130
Figure 78. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD10; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.....	131
Figure 79. Récapitulatifs des marqueurs	132
Figure 80. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD5; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	133
Figure 81. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD23; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	134
Figure 82. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD79b; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	135
Figure 83. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du FMC7; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	136
Figure 84. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour LT versus non LT dans les SLPC-B.	137
Figure 85. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	138
Figure 86. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	139
Figure 87. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	140
Figure 88. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD10; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	141
Figure 89. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD22; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.....	142
Figure 90. Récapitulatifs des marqueurs	143
Figure 91. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD5; pour la LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.....	144

Figure 92. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD23; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	145
Figure 93. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD79b; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	146
Figure 94. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du FMC7; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	147
Figure 95. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	148
Figure 96. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	149
Figure 97. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD38; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	150
Figure 98. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	151
Figure 99. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	152
Figure 100. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	153
Figure 101. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD22; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	154
Figure 102. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD10; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.	155
Figure 103. Récapitulatifs des marqueurs	156

Liste des abréviations :

ADCC	: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADN	: Acide désoxyrébonucléique
AID	: Activation induced cycline deaminase
ARN	: Acide rébonucléique
AUC	: Area under the cuve
BCR	: B cell receptor
BOM	: Biopsie ostéomédulaire
BRAF	: B- RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
BCL2	: B-Cell lymphoma 2
CALLA	: Common acute lymphoïd leukemia antigen
CAR-T	: Chemeric antigen receptor –T
CCDN1	: Cycline D1
CFUs	: Colony Forming Unit in the spleen
CD	: Cluster de différenciation
CDC	: Complement-dependent cytotoxicity
CPA	: Cellule présentatif d’antigène
CHU	: Centre hospitalier universitaire
CMF	: Cytométrie en flux
CMH	: Complexe major d’histocompatibilité
CSH	: Cellule Souche Hématopoïétique
EBV	: Virus d'Epstein-Barr
ECD	: Phycoérythrine texas red
EDTA	: Éthylène diamine tétra-acétique
FCS	: flow cytometry standard
FITC	: Isothiocyanate de fluoresceine
FMC7	: Flinders Medical Centre
FS	: Farward Scatter
HLA-DR	: Humn leukocyte antigen

GEIL	: Groupe d'étude immunologique des leucémies
HM	: Hémopathie maligne
IFNα	: Interféron α
Ig	: Immunoglobuline
IL2	: Interleukine 2
IMF	: Intensité moyenne de fluorescence
IRM	: Imagerie par résonance magnétique
LAIP	: Leukemia-associated aberrant immunophenotypes
LB	: Lymphocyte B
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LF	: Lymphome folliculaire
LLC	: Leucémie lymphoïde chronique
LM	: Lymphome du manteau
LNH	: Lymphome non hodgkinien
LPL-B	: Leucémie prolymphocytaire B
LT	: Leucémie à tricholeucocytes
LTv	: Leucémie à tricholeucocytes variante
LZMS	: Lymphome de la zone marginal splénique
MALT	: Le lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses
MBL	: Monoclonal B-Lymphocytosis
MM	: Myélome multiple
MO	: Moelle osseuse
MRD	: Maladie résiduelle minimale
MW	: Maladie de Waldenstrom
NFS	: Numération formule sanguine
NK	: Naturel killer
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PBS	: Phosphate buffered saline

PET scanne	: Tomographie par Émission de Positrons
PMT	: Photomultiplicateurs
RAG	: Recombination activating gene
RMH	: Royal marsden hospital
ROC	: Receiver operating characteristic
SFH	: Société française d'hématologie
SLPC-B	: Syndrome lymphoprolifératif chronique type B
SLVL	: Lymphome splénique a lymphocytes villeux
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SS	: Side Scatter
TCR	: T- Cell receptor
TDM	: Tomodensitométrie
TDT	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
VIH	: Virus d'immunodéficience humaine
WHO	: World Health Organization
ZAP-70	: Zeta-chain-associated protein of 70 kDa

Table des Matières :

RESUME	I
ABSTRACT	II
DEDICACES	III
REMERCIEMENTS	IV
Liste des Tableaux	VIII
Liste des Figures	XII
Liste des Abréviations	XVII
Table des Matières:	XX
INTRODUCTION :	1
PARTIE I : LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES TYPE B	2
A. LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B :	3
I. Epidémiologie :	3
II. Physiopathologie :	6
1. Rappel sur l'hématopoïèse :	6
2. Lymphopoïèse B :	7
2.1. Différenciation médullaire des lymphocytes B :	7
2.1.1 Stade pro-B :	7
2.1.2 Stade pré-B :	7
2.1.3 Stade de lymphocyte B immature :	7
2.2. Différenciation post-médullaire des lymphocytes B	7
3. Les principaux marqueurs caractérisant la lignée lymphoïde B :	9
4. Les Immunoglobulines :.....	10
4.1. Généralité et structure :.....	10
4.2. Organisation des gènes des immunoglobulines humaines :	11
4.3. Génération de la diversité des immunoglobulines:.....	11
4.3.1. Réarrangement des gènes des immunoglobulines :	11
4.3.2. Hypermutation somatique :	13
4.3.3. Commutation isotypique ou switch de classe :	13
5. Lymphomagénèse :	14
5.1. Evènements génomiques :	14
5.2. Stimulation par BCR, d'origine antigénique ou non :	15
5.3. Microenvironnement tumoral :	15
5.4. Infections virales :	15
III. Diagnostic et exploration :	17

1. La leucémie lymphoïde chronique B :	17
2. Le lymphome du manteau :	20
3. Lymphome de la zone marginale :	21
4. La leucémie à tricholeucocytes :	23
5. Le lymphome folliculaire :	24
6. Leucémie à prolymphocyte -B :	25
7. Lymphome lymphoplasmocytaire ou maladie de Waldenström :	26
IV. La stratégie thérapeutique :	29
1. Bilan d'extension :	29
1.1. Biologie :	29
1.2. Imagerie :	29
2. Classification de LNH :	29
2.1. Classification d'Ann Arbor :	29
2.2. Classification de Binet :	30
3. Thérapie :	30
3.1. Lymphomes non hodgkiniens agressifs :	30
3.2. Lymphomes non hodgkiniens indolents :	30
4. Immunothérapie et CMF :	31
4.1. Cible potentielles des anticorps monoclonaux dans les hémopathies malignes lymphoïdes B :	31
4.2. Thérapie par des Lymphocytes T génétiquement modifiés:	32
4.2.1. Concepts et principes des CAR-T Cells :	32
4.2.2. Activation des CAR-T :	32
4.2.3. Sélection de la cible des CAR :	33
5. Maladie résiduelle minimal et CMF :	33
B. IMMUNOPHENOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE DES SLPC-B PAR CMF :	35
I. PRINCIPE :	35
1. Définition :	35
2. Historique de la CMF:	35
3. Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux :	36
3.1. Système fluide :	37
3.2. L'excitation lumineuse :	38
3.3. Système optique :	38
3.3.1. La cellule de lecture :	39
3.3.2. Filtre et miroir :	40
3.3.3. Détecteurs :	41

3.4.	Digitalisation du signal :.....	41
4.	Préparation et analyse des échantillons :	41
5.	La notion de CD :.....	42
6.	Fluorochromes :	44
6.1.	Caractéristiques spectrales :.....	45
6.1.1.	Spécificité :	45
6.1.2.	Accessibilité :.....	45
6.1.3.	Toxicité :	45
6.1.4.	Photo-destruction :	46
6.1.5.	Transfert d'énergie (tandems de fluorochromes) :.....	46
6.2.	Compensation de fluorescence :	47
6.3.	Principaux fluorochromes utilisés :	47
7.	Interprétation des résultats :	48
C.	APPLICATION DE LA CYTOMETRIE EN FLUX EN HEMATOLOGIE :	53
1.	Rôle de la cytométrie en flux dans le diagnostic les SLPC-B	53
2.	Etudes de la population B clonale par CMF	53
2.1.	Repérage des lymphocytes B matures :.....	53
2.2.	Restriction isotypique :	55
2.3.	Marqueurs aberrants de la population clonale :	55
3.	Immunophénotypage des SLPC-B par CMF :	56
3.1.	Caractéristique immunophénotypique des SLPC-B CD5+/CD10- :	57
3.1.1.	Leucémie lymphoïde chronique :	57
3.1.2.	Le lymphome du manteau :	57
3.1.3.	La leucémie prolymphocytaire :	58
3.2.	Caractère immunophénotypique des SLPC-B CD5- /CD10+ :	58
3.2.1.	Le lymphome folliculaire :	58
3.3.	Caractère immunophénotypique des SLPC-B CD5- /CD10- :	58
3.3.1.	La leucémie à tricholeucocytes :	58
3.3.2.	Le lymphome de la zone marginale :	58
3.3.3.	Lymphome lymphoplasmocytaire :	59
3.4.	Caractère immunophénotypique des SLPC-B CD5+ / CD10+ :	60
4.	Revue de littérature sur l'expression des différents marqueurs selon chaque entité: 60	
4.1.	Principales caractéristiques phénotypiques des SLPC-B :	60
4.2.	Récapitulatif d'immunophénotypage et classification des SLPC-B:	61
	PARTIE II : DIAGNOSTIC IMMUNOPHENOTYPIQUE DES SLPC-B PAR CMF... 62	
A.	CARACTERISTIQUE CLINICO-BIOLOGIQUE DES SLPC-B :	63

1. Objectif :	63
2. Matériels et méthodes :	63
2.1. Protocole d'analyse cytométrique des SLPC-B :	64
2.1.1. Prélèvement :	64
a. Sang périphérique :	64
b. Moelle osseuse :	64
2.1.2. Préparation de l'échantillon :	65
2.2. Aquisition et traitement de données :	66
3. Résultats :	66
3.1. Aspect épidémiologique des SLPC-B :	66
3.2. Aspect clinico-biologique des SLPC-B :	69
4. DISCUSSION :	70
B. ETUDES DE LA REPARTITION DES DIFFERENTS MARQUEURS ET L'ÉTABLISSEMENT DES VALEURS SEUILS DU PANEL DES SLPC-B	74
1. Objectif :	74
2. Matériels et méthodes :	74
3. Méthodologie d'analyse :	74
3.1. Validation technique :	74
3.2. Analyse statistique :	74
3.2.1. Exploitation statistique des IFM des différents marqueurs :	74
3.2.2. Courbe ROC des différents marqueurs en fonction du diagnostic:	74
3.2.3. Etude du pouvoir discriminant et l'évaluation du score de matutes :	75
4. Résultats :	77
I. Exploitation statistique des résultats obtenus pour les IFM des différents CD au cours des 91 LLC, 12 LM ,5 LPL-B, 3LF ,2 LZMS, 5 LT :	78
II. Exploitation statistiques des IFM sous forme de courbes :	83
1. Marqueurs pour LLC :	83
2. Marqueurs de LM :	96
3. Marqueurs de LPL-B :	109
4. Marqueurs du LF :	121
5. Marqueurs de LT :	133
6. Marqueurs pour LZMS	144
III. Etude du pouvoir discriminant de chaque marqueur et évaluation de scores à visée diagnostique (score de matutes)	157
1. Exploitation des marqueurs les plus discriminants dans la LLC :	157
1.1. Valeurs seuils selon une meilleure spécificité :	157

1.2. Couplage des marqueurs discriminant de la LLC :	157
1.3. Calculs de Valeur Prédicatif Positive et Valeur Prédicatif Négatif des marqueurs discriminants :.....	162
2. Evaluation du score du Matutes selon nos valeurs seuils :	163
2.1. Répartition des patients selon l'expression des marqueurs du score :.....	164
2.2. Répartition des patients selon le socre de matutes :	166
2.3. Répartition des patients avec LLC selon la valeur du score :.....	167
2.4. Calcul du coefficient kappa :	168
3. DISCUSSION :	169
CONCLUSION :	172
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE :	173
ANNEXES	181
LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	183
ملخص الأطروحة	185

INTRODUCTION :

L'immunophénotypage des lymphocytes circulants utilisant la technique de cytométrie en flux est la méthode de choix pour la classification et le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC-B) qui constituent un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par une expansion clonale de lymphocytes B matures dans des sites (sang, moelle osseuse ...) et par une grande hétérogénéité cellulaire, d'une part indispensable à l'efficacité et à l'efficience de notre système immunitaire, mais d'autre part, elle rend la démarche diagnostique plus complexe. Dans ce contexte, le rôle de la cytométrie en flux est de faciliter cette démarche grâce à sa capacité d'analyser des sous-populations cellulaires distinctes parmi une population hétérogène. Elle permet l'obtention de résultats rapides et fiables, avec la détermination des paramètres de taille et de structure des cellules, ainsi que des paramètres de fluorescence spécifiques grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. L'utilisation de ces anticorps permet de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires facilitant de ce fait l'analyse de populations cellulaires hétérogènes. Toutefois, il est nécessaire de bien cerner tous les différents aspects méthodologiques, y compris les facteurs propres au sujet : âge, sexe, les facteurs propres au prélèvement : heure, quantités, les conditions de préparation de l'échantillon à tester. Les valeurs de références indispensables pour l'interprétation des résultats, n'auront un sens que si elles sont définies dans ces limites de validité [1].

L'objet de ce travail est d'évaluer la place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chronique de type B.

Dans une première partie bibliographique, nous développerons les éléments de base préalables à la compréhension de l'immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux. Nous terminerons cette partie par une revue de la littérature sur l'immunophénotypage des syndromes lymphoprolifératifs chronique type B afin de situer l'état actuel des connaissances et la place que tient à ce jour l'immunophénotypage dans le diagnostic et dans la prise en charge thérapeutique des syndromes lymphoprolifératifs chronique type B.

La seconde partie du travail présentera les résultats d'une étude de validité diagnostic menée dans le service d'Hématologie Biologique du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de FES, en collaboration avec le service de médecine interne et l'hôpital régional El GHASSANI de Fès.

Partie I :
Les Syndromes Lymphoproliferatifs
Chroniques Type B

A. LES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES B :

I. Epidémiologie :

Les hémopathies malignes représentent 10% des cas de cancers incidents, qui regroupent de nombreuses entités, allant de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) à un grand nombre d'hémopathies malignes, avec pour chacune d'entre elles des caractéristiques cliniques et biologiques spécifiques [2].

La classification de l'organisation mondiale de santé (OMS 2016/2017) en décrit un peu plus de quarante entités définies par la combinaison de toutes les informations disponibles incluant les données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques (Tableau 1).

Les hémopathies B comprennent la LLC, la LLC mixte, la leucémie prolymphocytaire (LPL), la leucémie à tricholeucocytes (LT) et sa forme variante (LT-v), les phases leucémiques des lymphomes à cellules du manteau (LM) et du lymphome folliculaire (LF), le lymphome lymphoplasmocytaire, la leucémie à plasmocytes et le lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL) [3].

Tableau 1. Classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures 2016/2017 [4].

Néoplasies lymphoïdes B matures
Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
Lymphocytose B monoclonale *
Leucémie pro-lymphocytaire B
Lymphome de la zone marginale splénique
Leucémie à tricholeucocytes
Lymphome / Leucémie B splénique, non classable
Lymphome B diffus à petites cellules de la pulpe rouge splénique
Leucémie à tricholeucocytes – variant
Lymphome lymphoplasmocytaire
Macroglobulinémie de Waldenström
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgM *
Maladie des chaînes lourdes mu alpha gamme
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée IgG/IgA *
Myélome multiple
Plasmocytome solitaire osseux et extra osseux
Maladie des dépôts d'immunoglobulines monoclonales *
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire
Lymphome folliculaire
Lymphome à grandes cellules B avec réarrangement de IRF4 *
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif
Lymphome à cellules du manteau
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), sans autre spécificité (NOS)
Lymphome à grandes cellules B, riche en lymphocytes T/histiocytes
Granulomatose lymphomatoïde
Lymphome médiastinal (thymique) primitif à grandes cellules B,
Lymphome à grandes cellules B intravasculaire
Lymphome plasmablastique
Lymphome des séreuses
Lymphome de Burkitt
Lymphome Burkitt-like avec aberration 11q *
Lymphome B de haut grade, avec réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6 *
Lymphome B de haut grade, NOS
Lymphome B inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Hodgkin classique

- ❖ La LLC est la plus fréquente des SLPC-B avec un âge moyen de 65 ans, elle représente 1% des cancers et 12,5% des hémopathies malignes (HM) et touche plus fréquemment l'homme. Le taux d'incidence ajusté à la population mondiale est de 3,6 pour 100 000 Habitants en 2005 et de 2 pour les femmes. La survie globale diminue avec l'âge. La prédisposition familiale est retrouvée chez 5 à 10% des cas et le risque de développer un lymphome lymphoplasmocytaire ou une leucémie à tricholeucocyte est augmenté [2].
- ❖ Le lymphome du manteau représente 3 à 10% des lymphomes non hodgkiniens avec un âge médian au diagnostic de 68 ans et possède un pronostic péjoratif avec des rémissions de courte durée et une survie médiane de 3 à 4 ans [5,6].
- ❖ La leucémie prolymphocytaire B est une hémopathie lymphoïde mature B rare d'évolution le plus souvent agressive, représente moins de 1% des SLPC-B et touche principalement les sujets âgés avec un âge médian de 65 à 69 ans [7].
- ❖ Le lymphome folliculaire est le second type le plus fréquemment rencontré ; il représente de 22 % à 35 % des cas de lymphomes non hodgkiniens. Son incidence est très forte aux Etats-Unis et dans l'ouest de l'Europe avec un âge médian de 60 ans, le sexe ratio est proche de 1, avec souvent une discrète prédominance masculine [8].
- ❖ Le lymphome lymphoplasmocytaire est considéré comme une hémopathie maligne rare représentant 1 % à 2 % des hémopathies malignes, avec une incidence annuelle estimée à 3,4 cas par million d'habitants. Le lymphome lymphoplasmocytaire touche en priorité les adultes avec une incidence qui augmente après 60 ans. Vingt pourcent des patients ont des apparentés avec cas de lymphome lymphoplasmocytaire ou de syndromes lymphoprolifératifs B dans la famille [9].
- ❖ La leucémie à tricholeucocytes est une hémopathie rare avec une incidence globale de 1/100 000 habitant/an et représente moins de 2 % de l'ensemble des cas de leucémies chroniques. Le sexe ratio est très en faveur des hommes (5 : 1) et l'âge médian au diagnostic est de 55 ans. Récemment, il a été noté que les Afro-Américains avaient significativement un risque de mortalité plus élevé que les Caucasiens [10].
- ❖ Le lymphome splénique de la zone marginale (LSZM) représente 1 à 2 % de l'ensemble des LNH. Dans 20 % des cas, il est associé à des manifestations auto-immunes dont les plus fréquentes sont les cytopénies auto-immunes et un

anticoagulant circulant de type lupique. Ce lymphome est plus souvent retrouvé chez les femmes avec une médiane d'âge d'environ 65 ans [11].

II. Physiopathologie :

1. Rappel sur l'hématopoïèse :

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication des cellules sanguines qui trouvent leurs origines dans la moelle, siège exclusif de l'hématopoïèse chez l'adulte, à partir d'une cellule ancestrale appelée CSH (Cellule Souche Hématopoïétique) ou CFUs (Colony Forming Unit in the spleen). Processus complexe et coordonné de prolifération, de différenciation et d'apoptose de cellules hématopoïétiques, réglés par le microenvironnement médullaire, des actions intercellulaires, et des facteurs de croissance et cytokines.

Après plusieurs divisions, différenciations, la maturation terminale donne naissance à neuf types cellulaires qui passent dans le sang ; Cellules très spécialisées avec des fonctions diverses et considérées comme des éléments terminaux et fonctionnels de lignées : les érythrocytes, les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires basophiles, les monocytes, les ostéoclastes, les mégacaryocytes, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces cellules se caractérisent par une durée de vie limitée, leurs renouvellements continus au cours de la vie de l'individu est indispensable au maintien des fonctions vitales du sang.

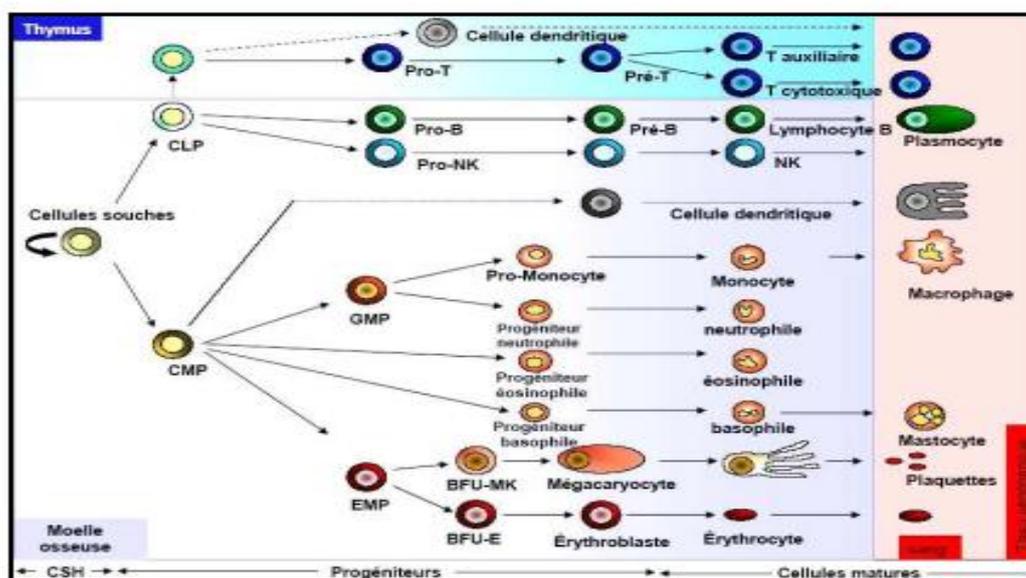


Figure 1. Schéma de l'hématopoïèse. (Lacombe C. Hématologie 2006) [12].

2. Lymphopoïèse B :

2.1. Différenciation médullaire des lymphocytes B :

Les lymphocytes B se différencient à partir de cellules souches CD34+, dans le microenvironnement du foie fœtal (à partir de la 9ème semaine), puis vers la fin de la gestation chez le fœtus, puis chez l'enfant et l'adulte au niveau de la moelle hématopoïétique. C'est au niveau de la moelle osseuse que la cellule souche primitive hématopoïétique va s'orienter dans la différenciation lymphoïde B [13].

2.1.1 Stade pro-B :

Des cellules pro-B, sont individualisées à partir de cellules souches lymphoïdes B, caractérisées par l'expression des antigènes CD19 et CD10. Ces cellules expriment une enzyme nucléaire TDT (Terminal Déoxynucleotidyl Transférase) et des protéines RAG1 et RAG2 qui sont des produits de gènes activant les phénomènes de recombinaison. Elles expriment également à leur surface les protéines CD24/CD20, les chaînes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe HLA-DR qui seront exprimées tout au long de la maturation des lymphocytes B. Au stade pro-B se réalise le réarrangement V-DJ de la chaîne lourde [14].

2.1.2 Stade pré-B :

A ce stade a lieu le réarrangement des gènes de la chaîne légère et la formation du pré-BCR qui sera exprimé à la membrane. La cellule sera donc soumise à une sélection dite positive, permettra à la cellule pré-B dans le cas où l'expression est productive de recevoir un signal de survie afin de poursuivre sa maturation, dans le cas contraire la cellule mourra.

2.1.3 Stade de lymphocyte B immature :

Les cellules exprimant une immunoglobuline fonctionnelle sous la forme d'une IgM de surface sont alors classées comme cellules B immatures. Elles subissent une étape de sélection négative visant à éliminer les cellules exprimant un BCR potentiellement autoréactif.

Dans le même temps, la transcription des gènes des immunoglobulines est étendue jusqu'au segment C δ . Ainsi, l'épissage alternatif permettra la co-expression en surface d'IgM et d'IgD qui caractérise le stade B mature (naïf), qui sort de la moelle et circule dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires.

2.2. Différenciation post-médullaire des lymphocytes B

Les lymphocytes B matures primitifs ou naïfs gagnent les organes lymphoïdes périphériques. La plupart de ces lymphocytes vierges ont une durée de vie courte et sont programmés pour mourir en quelques jours. Cependant, si leur récepteur membranaire entre en contact avec l'antigène spécifique, ils vont répondre par un phénomène d'activation. Les lymphocytes B peuvent, soit se différencier rapidement en plasmocytes à IgM à courte durée de vie, soit former des centres germinatifs où ils subissent les processus d'hypermutation

somatique et de commutation isotypique, avant de se différencier en cellules B mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie. Les cellules B mémoires constituent un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie, capables de persister à l'état quiescent sans proliférer (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles n'expriment en général plus d'IgD, et peuvent avoir des localisations préférentielles telles que les muqueuses pour les cellules ayant commuté pour produire des IgA.

Les cellules mémoires ont la faculté de répondre rapidement à des pathogènes. En effet, elles peuvent présenter rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se différencier plus rapidement en plasmocytes.

Les plasmocytes sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale par sécrétion d'anticorps. Ils sont retrouvés dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions et tissu lymphoïde annexé au tissu digestif) et dans la moelle osseuse. Ils ne sont habituellement pas retrouvés dans le sang (sauf circonstances pathologiques) [15 ,16].

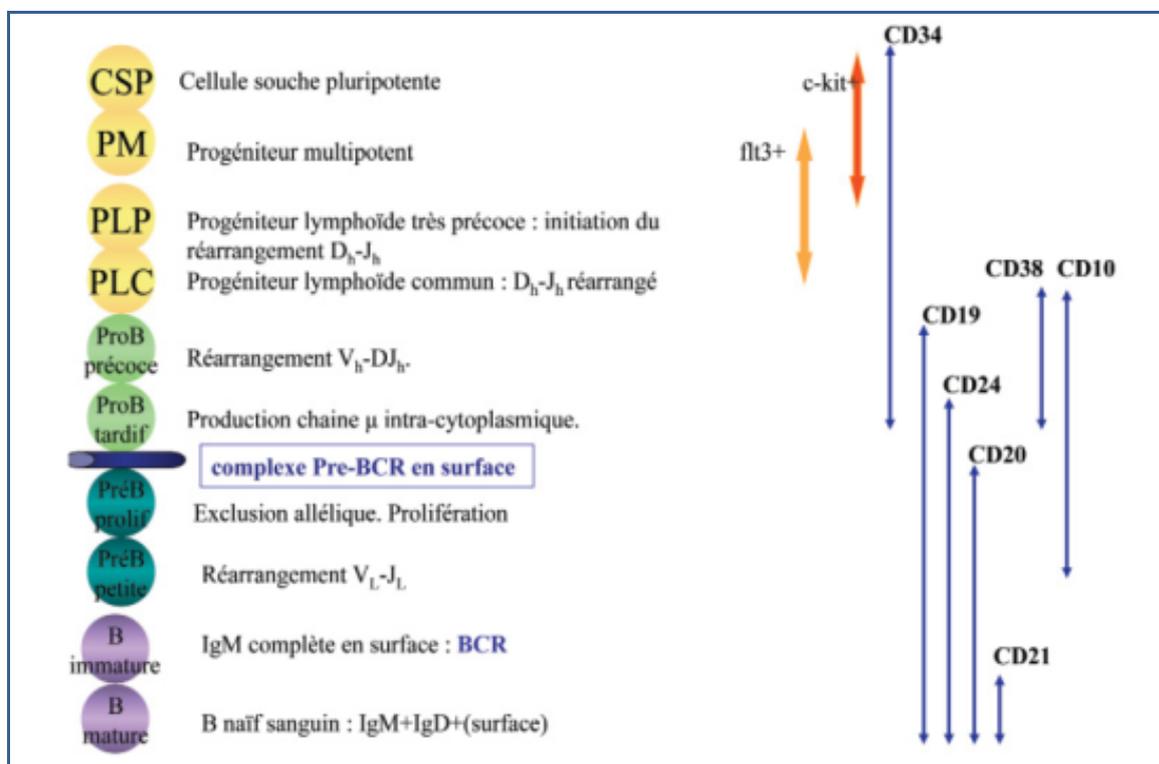


Figure 2. Lymphopoïèse B. Les différents stades en fonction du réarrangement des gènes et des marqueurs de différenciation [14].

3. Les principales molécules caractérisant la lignée lymphoïde B :

Les cellules lymphoïdes B, quel que soit leur niveau de différenciation ou d'implication dans la réponse immunitaire portent sur leur membrane une ou plusieurs molécules qui permettent de les caractériser.

- **Les molécules qui constituent le BCR : (Elément fonctionnel majeur de la lignée B):**

L'immunoglobuline (deux chaînes H+ deux chaînes L)

Les marqueurs CD79a et CD79b, phosphoprotéines dont la partie intra-cytoplasmique initie la transduction du signal, quand l'antigène s'est spécifiquement fixé à l'immunoglobuline. Ces molécules très précoces persistent à tous les stades de la différenciation B et sur toutes les cellules B matures (sauf les plasmocytes qui sont négatifs pour le marqueur CD79a) [17.18].

- **Des molécules présentes à tous stades de la différenciation B**

- CD19 : marqueur présent à tous les stades de la lignée B, y compris sur les plasmocytes normaux (Phosphoprotéine qui stabilise le BCR).
- CD22 : marqueur précoce et qui persiste à tous les stades de la différenciation B (Molécule impliquée dans la transduction du signal du BCR et qui stabilise le BCR)

- **Des marqueurs plus tardifs ou spécialisés :**

- CD20 : molécule de canal calcique, qui apparaît tardivement (présente sur les cellules matures).
- CD23 : ou Fc Epsilon R2, il existe sous deux isoformes [CD23a qui est spécifique des cellules B, et CD23b qui est une molécule inductible sur diverses cellules (B, T, NK, ...)]; ce récepteur peut être clivé et retrouvé dans le plasma.
- CD10 : endopeptidase neutre appelée également CALLA (Common Acute Lymphoid Leukemia Antigen) ; molécule exprimée dans les stades immatures de la moelle osseuse, mais aussi dans certains stades de l'immunopoïèse.
- CD21 : régule les réponses prolifératives B ; c'est aussi le récepteur d'une fraction du complément, et de l'Epstein Barr Virus (EBV).

4. Les Immunoglobulines :

4.1. Généralité et structure :

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines exprimées à la surface des cellules B, où elles jouent le rôle de récepteur spécifique d'antigènes, ou circulant sous forme soluble dans le sang ou la lymphe. Chaque immunoglobuline présente une dualité fonctionnelle : une région de la molécule lie l'antigène, tandis qu'une autre assure les fonctions dites effectrices (fixation à des tissus de l'hôte, à diverses cellules du système immunitaire...). Toutes les immunoglobulines sont formées d'une structure commune comprenant quatre chaînes polypeptidiques, composées de deux chaînes légères (L ; Light) identiques (23kD) et deux chaînes lourdes (H ; Heavy) identiques (50-70kD) maintenues ensemble par des ponts disulfures ainsi que des liaisons non covalentes [19].

Les chaînes peuvent être divisées en deux types de régions basées sur la variabilité des séquences :

- pour la chaîne légère : les régions variables VL et constante CL.
- pour la chaîne lourde : les régions variables VH et constantes CH.

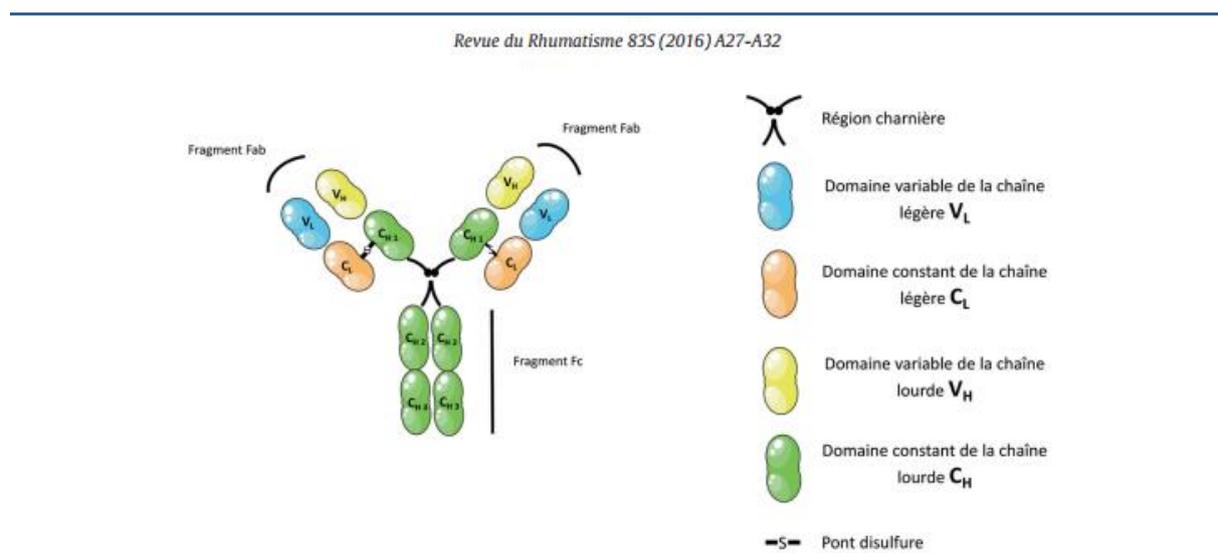


Figure 3. Structure de base des immunoglobulines [20].

Il existe différents types de chaînes lourdes, gamma, alpha, mu, delta et epsilon, qui déterminent 5 classes d'immunoglobulines, respectivement, IgG, IgA, IgM, IgD, et IgE. Certaines classes d'Ig sont également divisées en sous classes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2). Il n'y a pas de sous classe d'Ig pour les IgM, les IgD et les IgE. Il existe seulement deux types de chaînes légères : kappa ou lambda.

4.2. Organisation des gènes des immunoglobulines humaines :

Le locus des gènes des chaînes lourdes (IGH) est situé sur le chromosome 14. Il comprend environ 70 segments regroupés en trois familles de gènes dits de variabilité (V), de diversité (D) et de jonction (J). Neuf gènes codent les régions constantes (C) des 9 sous-classes d'immunoglobulines. Il y a deux loci pour les gènes des chaînes légères. Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 2. Ils comportent 31 à 35 segments $V\kappa$ fonctionnels ainsi que 5 segments $J\kappa$ qui codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment $C\kappa$ code pour la partie constante. Les gènes des chaînes légères λ sont situés sur le chromosome 22. Ils comportent environ 30 segments $V\lambda$ ainsi que 4 segments $J\lambda$. Il existe au moins 6 gènes $C\lambda$ différents. Il n'y a pas de segment D dans la partie variable des gènes des chaînes légères kappa ou lambda [21.22].

4.3. Génération de la diversité des immunoglobulines:

4.3.1. Réarrangement des gènes des immunoglobulines :

En réalité, seuls les gènes codant pour les parties variables des Ig sont réarrangés. Ces réarrangements ont lieu aux différents stades du développement des précurseurs B. Les régions variables des chaînes lourdes sont obtenues par l'association, dans un premier temps, d'un segment de jonction JH avec un segment de diversité DH, puis le réarrangement de cette association D-JH avec un segment variable VH, le tout aboutissant à la formation d'un exon VDJ. Lorsque le réarrangement productif d'une chaîne lourde est effectif, le même scénario se reproduit avec les chromosomes codant pour les chaînes légères. Les régions variables des chaînes légères sont générées seulement par jonction de segments VL et JL pour former un exonVJ.

Les régions d'ADN comprises entre les différents segments sont délétées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisode. Les segments géniques codant les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères ainsi qu'une séquence signal (L, Leader) sont ensuite associés aux exons codant la région constante des chaînes correspondantes. Après épissage, les ARN messagers matures sont prêts à être traduits en protéines. Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des immunoglobulines s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde.

La légation des gènes V, (D) et J est assurée par des enzymes spécifiques, les recombinases. Les recombinases RAG-1 et RAG-2 sont les seules enzymes lymphoïdes nécessaires à la recombinaison V(D) J. L'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 est strictement contrôlée lors du développement lymphocytaire B permettant les réarrangements d'abord au niveau du locus IGH, puis au niveau des gènes des chaînes légères.

Le choix des segments constituant les régions variables au cours du réarrangement des gènes des immunoglobulines est gouverné par le hasard. Le grand nombre de segments V, D et J disponibles et les multiples combinaisons possibles entre ces éléments constituent la base de ce qui est appelé la diversité combinatoire.

La diversité jonctionnelle permet d'augmenter encore la diversité créée par les mécanismes de recombinaison. Lors des processus de recombinaison V(D) J, les mécanismes de réparation de l'ADN créent une variabilité dans les zones de jonction entre les gènes associés et la position précise à laquelle les segments génétiques V(D) J se joignent peut légèrement varier.

A la jonction entre les segments D et J on retrouve souvent une insertion de quelques nucléotides, catalysée par la TDT, cette enzyme catalyse la polymérisation au hasard de nucléotides dans l'ADN sans nécessité de matrice. Cela conduit à encore davantage de diversité [16].

Les réarrangements géniques sont extrêmement bien régulés, effectués dans une chronologie précise (réarrangement des chaînes lourdes en premier, puis réarrangement de la chaîne légère κ ou de la chaîne légère λ si échec) [15]. L'échec de ces recombinaisons (codon stop, décalage du cadre de lecture, etc..) conduit à l'absence d'expression des BCR et à la mort du LB [21].

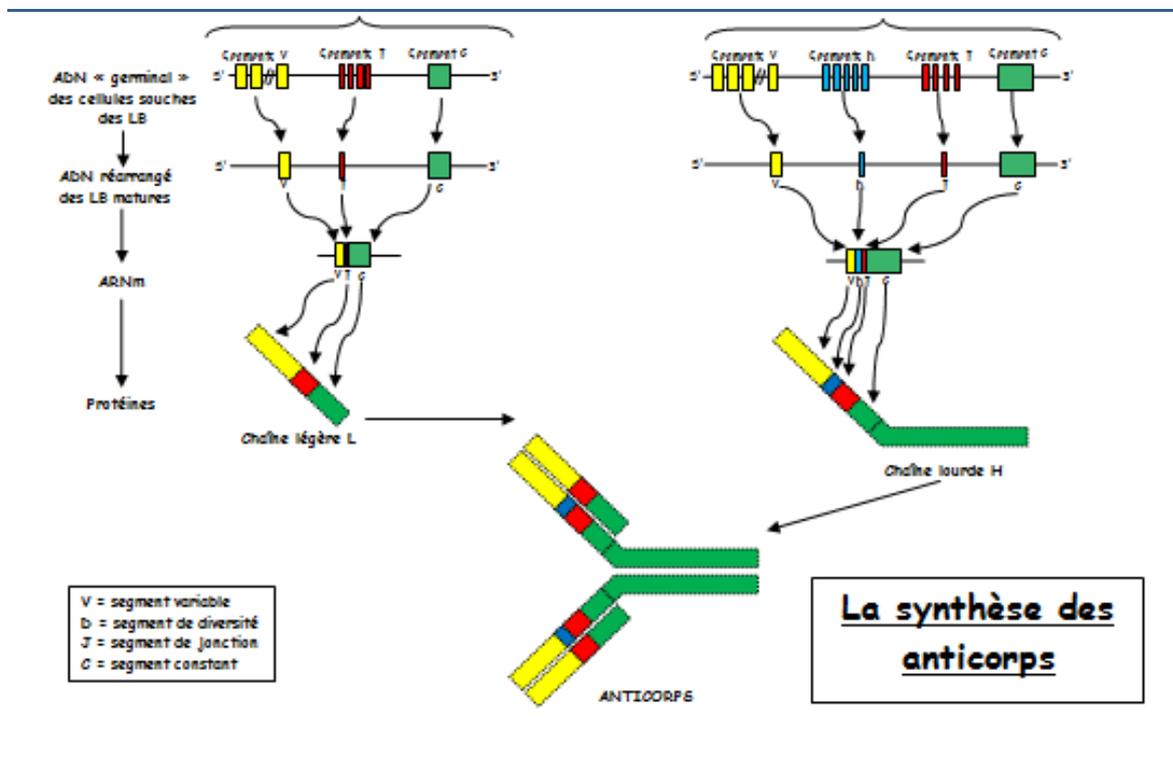


Figure 4. Réarrangement des gènes des immunoglobulines

(Banque de schémas-SVT-Académie de Dijon 2005-2019)

4.3.2. Hypermutation somatique :

Malgré sa diversité, le répertoire primaire des régions variables des immunoglobulines, créé par le réarrangement V(D) J a une faible affinité pour l'antigène.

La maturation des lymphocytes B lors de la réponse aux antigènes dépendants des lymphocytes T est marquée par une diversification de ce répertoire par l'introduction de mutations ponctuelles au sein des gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines déjà réarrangées, plus rarement par des insertions ou des délétions nucléotidiques. Ce phénomène qui a lieu dans la zone sombre des centres germinatifs permet de moduler et donc, dans certains cas, d'augmenter l'affinité des immunoglobulines. Les lymphocytes B qui expriment des immunoglobulines de haute affinité sont sélectionnés par l'antigène au niveau de la zone claire du centre germinatif, prolifèrent, se différencient en cellules sécrétrices d'anticorps et dominent la réponse secondaire. Ainsi, l'expression de gènes variables mutés est la caractéristique des lymphocytes des centres germinatifs et des cellules qui en dérivent [23].

L'AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), une enzyme exclusivement exprimée dans les centres germinatifs *in vivo*, est responsable de ces hypermutations somatiques.

4.3.3. Commutation isotypique ou switch de classe :

La spécificité antigénique des immunoglobulines est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et légères. Les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des régions constantes (C) des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Les IgM sont majoritairement produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont majoritairement produites au cours d'une réponse secondaire ou tertiaire. Au cours de la commutation isotypique ou switch de classe, le gène réarrangé VDJ se rapproche d'un nouveau segment constant codant pour les domaines constants d'une classe d'immunoglobulines différente par un processus de recombinaison somatique. Les lymphocytes B matures peuvent alors exprimer et sécréter une des classes d'immunoglobulines (IgG, IgA ou IgE) spécifiques de l'antigène. Ce processus est primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps. La commutation de classe est un mécanisme complexe et hautement régulé. Il cible des "points chauds" de recombinaisons appelés régions «switch» ou S, situées en amont de tous les domaines constants à l'exception de C δ . Les régions «switch» sont des sites de recombinaison de longueur variable. L'AID est également indispensable pour cette étape.

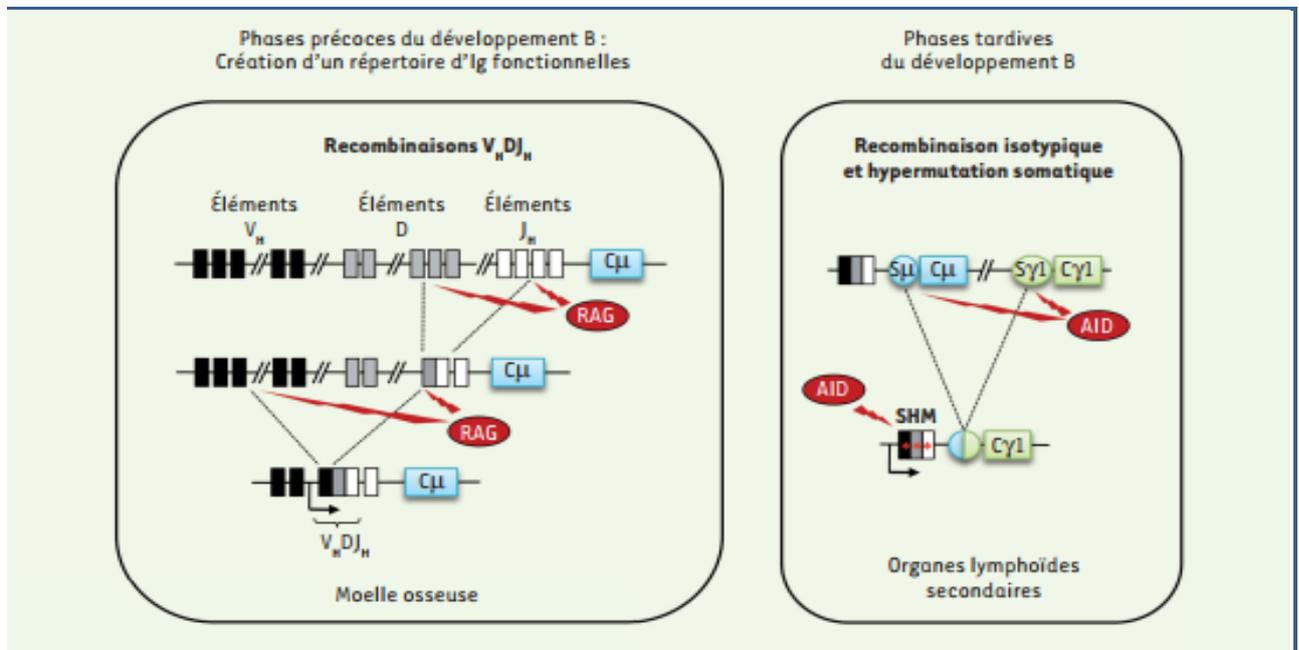


Figure 5. Représentation schématique des évènements de recombinaison au locus IgH lors de la lymphopoïèse B [24].

5. Lymphomagénèse :

Chaque étape de la différenciation lymphocytaire B peut être émaillée d'accidents oncogéniques. Les translocations chromosomiques constituent un événement-clé dans l'oncogénèse des lymphomes B, et seraient retrouvées dans 90% des lymphomes, et sont caractéristiques de certains types de lymphome B. Toutefois, une stimulation du BCR semble aussi nécessaire à la survie des cellules lymphomateuses B. Les facteurs produits par le microenvironnement du lymphome semblent également avoir une part importante dans le développement des lymphoproliférations [25].

5.1. Evènements génomiques :

Les translocations chromosomiques réciproques impliquent le gène codant pour les Ig et un proto-oncogène : en conséquence, l'oncogène se trouve sous contrôle du promoteur du gène actif codant pour les Ig, et son expression en devient constitutive et dérégulée. Il existe trois types de points de cassure au niveau du locus des Ig : certains sont adjacents à des segments D ou J, avec perte de nucléotides ou adjonction de nucléotides N, et indiquent une recombinaison VDJ défectueuse au moment de la lymphopoïèse médullaire. Dans d'autres translocations, les points de cassure se font dans des segments V réarrangés et mutés, indiquant une cassure au moment des évènements d'hyper mutation somatique. Enfin, certaines translocations proviennent d'une cassure au niveau des régions de switch des parties constantes, ce qui indique que l'évènement oncogénique est survenu au moment d'un switch de classe d'Ig.

Il faut noter que la plupart des lymphomes dérivent de lymphocytes B post –Centre Germinatif, qui ont subi les étapes d'hypermutation et de switch.

5.2.Stimulation par BCR, d'origine antigénique ou non :

La survie et la sélection des lymphocytes B, même au stade mature et quiescent, dépend de leur BCR. Parfois, on ne sait pas si le signal de survie est un signal délivré de façon autonome ou secondaire à une activation par l'antigène (prè-BCR). Quoiqu'il en soit, la grande majorité des cellules lymphomateuses B expriment un BCR. Et il existe plusieurs arguments pour suggérer que dans les lymphomes le signal BCR est également nécessaire à la survie : par exemple, on n'observe presque jamais de variants BCR négatifs dans les lymphomes qui continuent à subir des hypermutations somatiques, alors que statistiquement, une mutation sur dix devrait aboutir (par délétion, mutation non-sens, ou changement du cadre de lecture) à l'absence d'expression de la protéine : les cellules doivent donc toujours être sélectionnées sur leur expression du BCR. (Malgré la translocation, l'expression du BCR est assurée par le deuxième allèle, témoignant de l'intérêt que porte la cellule à exprimer le BCR malgré les défauts génétiques qui surviennent) [26].

La stimulation du BCR pourrait provenir également d'une stimulation antigénique : Un argument clinique est en faveur de cette hypothèse : le traitement par interféron des hépatites C non seulement élimine le virus, mais cause parfois la régression des lymphomes spléniques associés au virus C. De récents travaux établissent un lien direct entre l'infection virale et le développement du clone malin [7].

5.3.Microenvironnement tumoral :

Le microenvironnement peut être nécessaire à la survie des cellules lymphomateuses et conditionner leur progression. Dans le lymphome folliculaire par exemple, les cellules lymphomateuses ne se multiplient *in vitro* qu'en présence de lymphocytes T helper ou d'une stimulation par leur CD40. *In vivo*, les cellules tumorales sont toujours en contact étroit avec les cellules folliculaires dendritiques et des lymphocytes T CD4 helper. Les rares cellules lymphoïdes des espaces interfolliculaires ne prolifèrent pas.

5.4.Infections virales :

Plusieurs résultats indiquent un rôle possible des EBER dans la physiopathologie du lymphome : EBER induit l'expression de l'IL-10, ce qui provoque une résistance à l'IFN α et favorise par ce biais la croissance et la survie des cellules tumorales.

Le virus d'Epstein-Barr n'est pas le seul agent infectieux impliqué dans la pathogénèse des lymphomes, nous avons déjà cité le virus de l'hépatite C. Les lymphomes non hodgkiniens sont un des cancers les plus fréquemment associés à l'infection par le VIH. La survenue d'un lymphome chez un patient séropositif est un critère

d'entrée dans le sida. Pour autant, le VIH n'est pas considéré comme oncogénique : sa contribution à la lymphomagénèse tient plutôt à l'immuno dépression ainsi qu'aux proliférations réactionnelles induites par les multiples infections, ce qui favorise la survenue des aberrations génétiques.

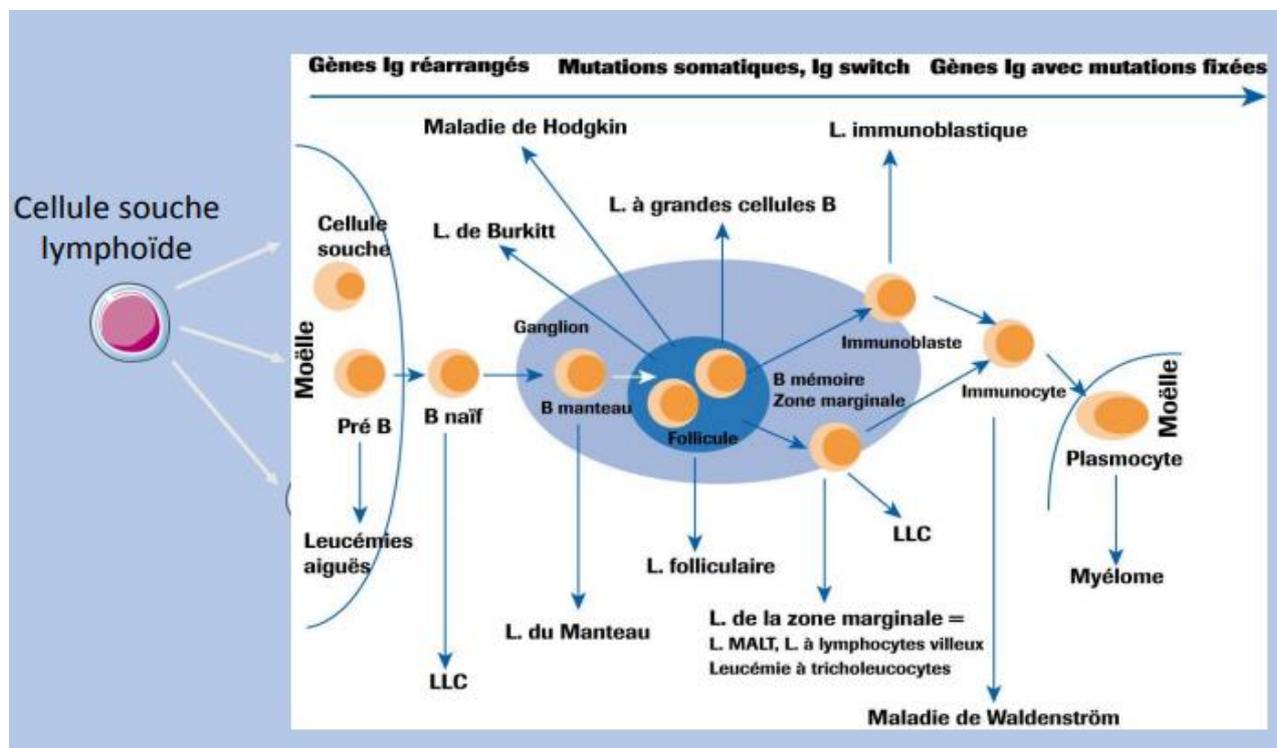


Figure 6. Ontogénie des lymphocytes et hémopathies malignes lymphoïdes B [27].

III. Diagnostic et exploration :

1. La leucémie lymphoïde chronique B :

La LLC est le SLPC-B le plus fréquent. Elle est définie par la présence de cellules lymphoïdes matures de petite taille avec une chromatine mottée à l'examen du frottis sanguin et la présence d'une lymphocytose sanguine B supérieures à $5.10^9/l$ persistant plus de trois mois [2].

La LLC est considérée comme une maladie dite indolente : les patients sont initialement asymptomatiques et les symptômes apparaissent avec l'évolution de la maladie. L'importance de la masse tumorale identifiée dans la classification de Binet trois stades d'évolution différente: les stades A (65 %) et les stades B (28 %) sont définis par l'absence ou la présence d'au moins trois aires ganglionnaires, sans anémie ni thrombopénie, les stades C (9 % des cas) sont caractérisés par la présence d'une anémie (hémoglobine inférieure à 10 g/dl) ou d'une thrombopénie (plaquettes inférieures à $100 \times 10^9/l$), quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes anormales [15].

Une fois le diagnostic de LLC est suspecté, le bilan comprendra en première intention un hémogramme avec frottis sanguin qui va permettre de distinguer avec plus ou moins de certitude les LLC typiques des autres lymphoproliférations, et d'évoquer les diagnostics différentiels, notamment devant les aspects cytologiques atypiques.

Le frottis sanguin permet de distinguer la forme typique des deux formes variantes, la LLC mixte et la LLC/LPL-B (Figure 7 : A, B, C). Dans la forme typique, la plus fréquente, les cellules lymphoïdes ont une petite taille, le noyau est entouré d'un anneau de cytoplasme peu étendu et régulier, même si de petites irrégularités nucléaires peuvent communément se voir. Le cytoplasme est homogène, faiblement basophile et dépourvu de granulations. Le noyau présente des renforcements sombres nettement séparés par des espaces plus clairs, donnant l'impression de mottes chromatiniennes ; les nucléoles ne sont pas ou peu visibles. Le rapport nucléocytoplasmique est élevé. Des cellules de plus grande taille avec des cellules clivées ou des prolymphocytes (< 10 %) peuvent être observées (Figure 7 ; A) [28].

Dans la LLC/LPL-B, les petits lymphocytes matures sont associés à des prolymphocytes dont le pourcentage varie entre 10 et 55 % .Un contingent supérieur à 55 % définit la LPL-B [29]. La forme mixte est caractérisée par la présence de petits et de grands lymphocytes associés à des prolymphocytes, dont le pourcentage reste inférieur à 10 %. Il existe aussi des cellules clivées, des cellules lymphoplasmocytaires voire quelques cellules binucléées (Figure 7 ; B).

Les ombres de Gümprich (smudge cells), sont des cellules lymphoïdes altérées avec un cytoplasme non intact et une membrane nucléaire rompue [3]. Leur présence est très

évocatrice du diagnostic de LLC. La formation de ces ombres est liée à une expression diminuée de vimentine, protéine du cytosquelette essentielle pour la rigidité et l'intégrité du lymphocyte. Un pourcentage faible d'ombres de Gumprecht est un facteur de pronostic défavorable [18].

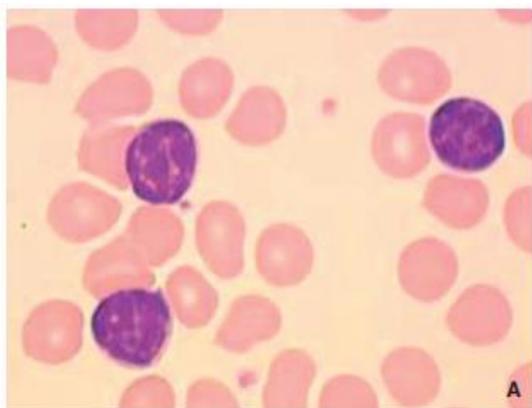


Figure 7. Figure 7 , A : LLC Typique [3]

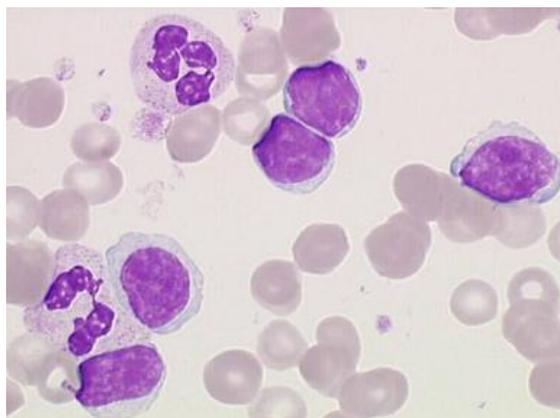


Figure 7 , B : LLC Mixte [2]

L'étude des marqueurs de membrane par cytométrie est indispensable pour affirmer le diagnostic de LLC. Les cellules leucémiques portent les antigènes caractéristique de la lignée B, en particulier le CD19, marqueur pan-B, et le CD20, marqueur des cellules B matures qui est plus faiblement exprimé que sur les cellules B normales [2]. La monotypie est révélée par l'expression de membrane d'une seule chaîne légère d'immunoglobuline kappa ou lambda, l'expression des immunoglobulines de surface est de densité faible ou absente, Il s'agit le plus souvent d'une IgM. La molécule CD5, exprimée par les lymphocytes T est retrouvée de façon constante. Le CD23, marqueur d'activation des lymphocytes B, est également présent mais le FMC7, le CD22 et le CD79b (chaîne associé au BCR) sont peu exprimés ou absents. Le score Royal Marsden Hospital (RMH) ou score de Matutes, score immunologique basé sur l'expression de cinq marqueurs avec une valeur de 1 attribuée en cas d'expression faible des immunoglobulines de surface, d'expression faible ou négative du CD79b et du FMC7, d'expression positive du CD5 et du CD23 . Dans la LLC, le score est à 4 ou 5. Un score inférieur ou égal à 3 doit faire remettre en cause le diagnostic de LLC [18].

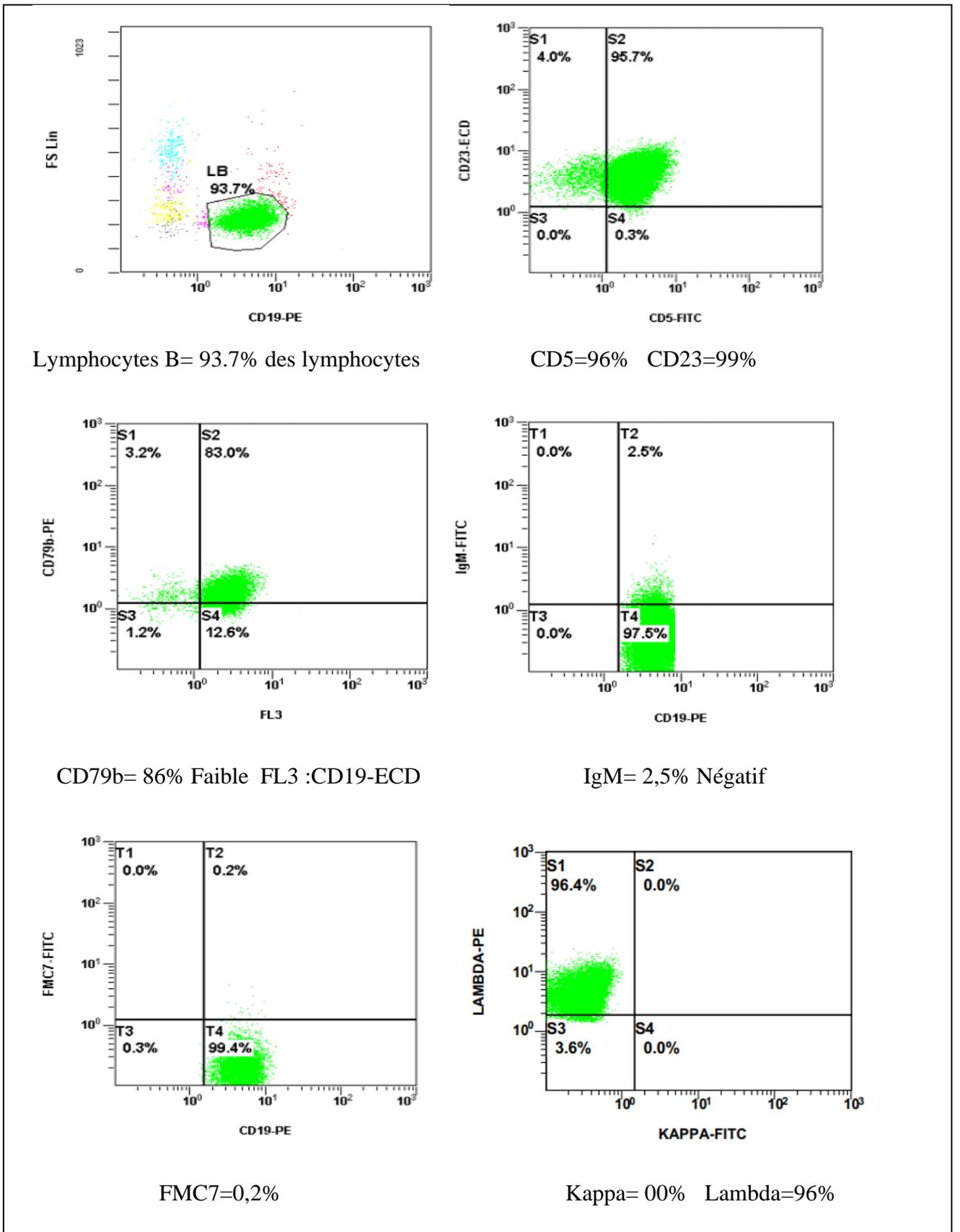


Figure 8. Profil immunophénotypique de LLC : score de Matutes égal à 5

Tableau 2. Score de Matutes [3].

Antigène	Attribuer 1 point si	Attribuer 0 point si
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
CD79b	Faiblement exprimé ou négatif	Fortement exprimé
FMC7	Négatif	Positif
Ig de surface monotypique	Faiblement exprimé	Fortement exprimé

Concernant la cytogénétique, Deux anomalies en particulier ont un impact pronostique majeur: les délétions 17p et 11q. L'existence d'une délétion 17p témoigne d'une perte monoallélique de la p53 gène suppresseur de tumeur dont la perte est impliquée dans de très nombreux cancers. Dans la majorité des cas, l'autre allèle est touché par une mutation ponctuelle entraînant ainsi l'inactivation de la p53, avec pour conséquence une résistance aux analogues des purines [20]. C'est un facteur pronostique défavorable en raison de la résistance au traitement qu'elle implique. La délétion 11q22 est la deuxième anomalie la plus fréquente, le plus souvent dans les formes progressives de LLC et associée à un mauvais pronostic [30].

Récemment, une nouvelle notion est apparue : la lymphocytose B monoclonale (MBL). Elle est définie par quatre critères : **1.** la mise en évidence d'une population B clonale ; **2.** la présence d'un phénotype caractéristique de LLC (CD5+, CD23+) ; **3.** un nombre absolu de cellules B inférieur à $5 \times 10^9/l$; **4.** Aucun autre signe de maladie auto immune ou de désordre lymphoprolifératif. Certains patients ont une MBL avec un phénotype de type LLC atypique (CD5+, CD23-), d'autres ont un phénotype non LLC (CD5-), sans signe d'évolution de la maladie. La MBL est présente chez 3,5% de la population générale et l'incidence augmente avec l'âge. Elle est plus fréquemment retrouvée chez les apparentés des patients présentant une LLC [31].

2. Le lymphome du manteau :

Le lymphome du manteau est individualisé dans les classifications internationales des hémopathies lymphoïdes malignes. Il est défini par la présence de cellules de taille petite à moyenne possédant un noyau avec des contours irréguliers et caractérisé par la translocation du gène CCND1 [32].

Au niveau clinique, certains patients se présentent sans syndrome tumoral avec uniquement une atteinte médullo-sanguine et plus ou moins une splénomégalie. A l'inverse, on observe des formes tumorales avec une évolution plus agressive. La diffusion sanguine est

fréquente (50-80%), et l'hyper-lymphocytose est présente chez seulement 30-50% des patients [33].

Le diagnostic de lymphome du manteau repose sur une combinaison de critères morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques. Les cellules tumorales sont de petite taille ou de taille moyenne, avec un noyau irrégulier (noyau clivé), une chromatine fine et condensée et un cytoplasme étroit (figure 9).

L'immunophénotypage de la forme classique de LM montre une prolifération tumorale CD20 et CD5 positive, CD10 et CD23 négative, exprimant à la fois des immunoglobulines de type IgM et IgD avec une restriction isotypique des chaînes légères kappa ou lambda. Outre cette forme typique, il existe des variantes possibles, tant sur le plan morphologique que phénotypique. Dans le cas d'une prolifération diffuse ou de cellules rondes de petite taille ou de grandes cellules blastoïdes, le diagnostic de lymphome du manteau est porté sur la positivité du CD5 et/ou la présence d'une translocation (11;14) (q13;q32).

Une hyper-expression de la cycline D1 est retrouvée dans 90 à 100 % des cas [34].

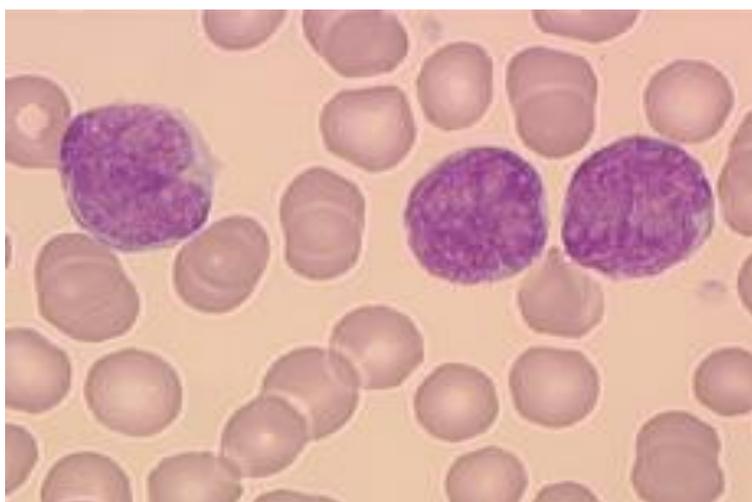


Figure 9. Forme classique du lymphome du manteau [3].

3. Lymphome de la zone marginale :

Le lymphome de zone marginale (MZL) est une entité générale qui regroupe plusieurs sous types de lymphomes initialement décrits séparément. Les différentes formes de lymphomes sont les suivantes :

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

- 10% : lymphomes de la zone marginale ganglionnaire (NMZL) sans splénomégalie ou d'infiltration du MALT.

La dissémination sanguine par les cellules lymphomateuse est rare dans le lymphome des tissus associés aux muqueuses et le lymphome de la zone marginale ganglionnaire par contre le lymphome de la zone marginale splénique est caractérisé par l'infiltration de la moelle et le sang (83 à 100%) [35].

Le diagnostic de ce lymphome est basé sur la combinaison de différents critères qui incluent la morphologie, l'immunophénotypage des lymphocytes, les anomalies génétiques, et l'histologie de moelle osseuse. Dans 75% des cas de LZMS, une splénomégalie et une lymphocytose chronique supérieure à 4 G/L sont présentes [36].

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

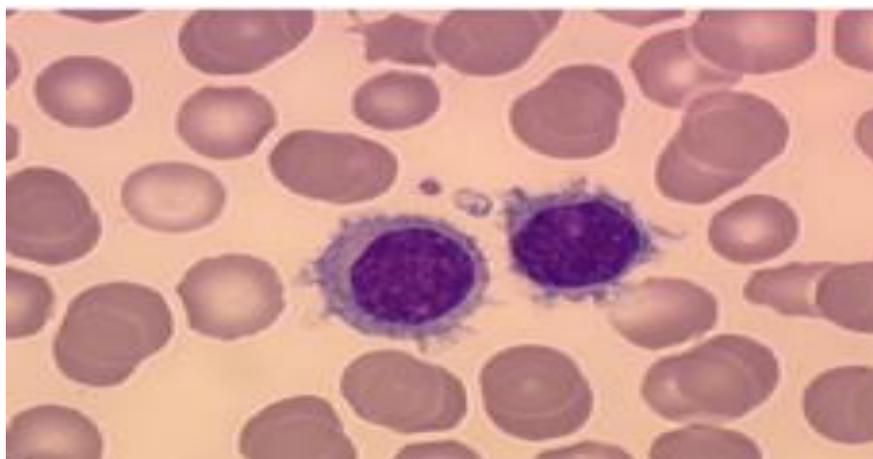


Figure 10. Cellule d'aspect monocytoïde du LZMS [3].

L'immunophénotypage lymphocytaire objective une population lymphoïde monotypique avec expression des marqueurs B. le score de Matutes est inférieur à 2.

Concernant les anomalies génétiques, il n'y a pas de signature génétique du SMZL mais des anomalies évocatrices. Les aberrations cytogénétiques les plus fréquemment retrouvées

sont des gains du 3q et 12q ainsi que des délétions 7q. Il est particulièrement important de combiner tous les éléments biologiques dont l'immunophénotypage pour aboutir au diagnostic de SMZL et ainsi éliminer les diagnostics différentiels.

4. La leucémie à tricholeucocytes :

La leucémie à tricholeucocytes (LT) est une hémopathie en générale indolente, dont le diagnostic repose sur la mise en évidence de tricholeucocytes dans le sang, la moelle ou la rate. L'hémogramme montre une pancytopénie, parfois une neutropénie, une thrombopénie ou une anémie discrètement macrocytaire. La présence d'une monocytopenie contraste avec l'analyse des automates qui identifient les tricholeucocytes comme des monocytes [37].

Sur le frottis, les tricholeucocytes, parfois peu nombreux, sont des cellules de grande taille avec un cytoplasme étendu, faiblement et irrégulièrement basophile présentant de fines projections cytoplasmiques (Figure 11). Des inclusions cytoplasmiques "granulo-lamellaires" ayant l'aspect de bâtonnets discrètement basophiles à zone centrale claire sont parfois détectées. Le rapport nucléo-cytoplasmique est bas et le noyau souvent excentré. Ovale ou arrondi, il peut être parfois réniforme. La chromatine nucléaire a un aspect finement dispersé et le nucléole, peu ou pas visible, est de petite taille et souvent unique [38].

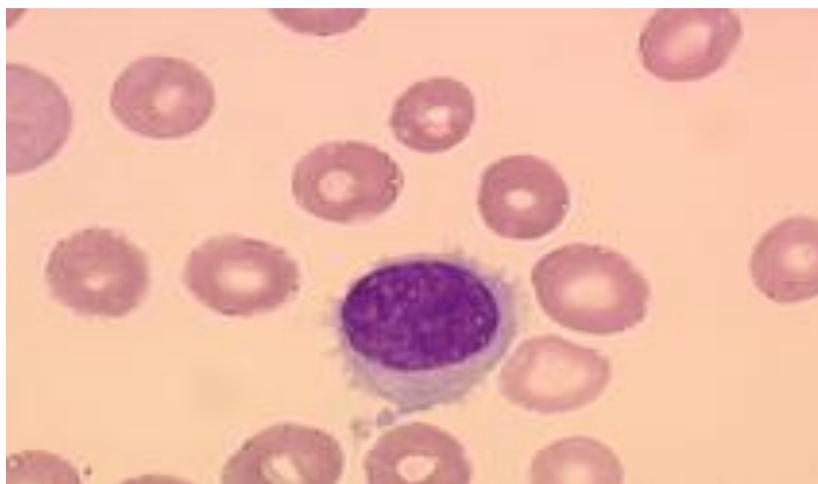


Figure 11. Aspect cytologique de leucémie a tricholeucocyte [3]

L'atteinte médullaire est constante. La présence d'une fibrose réticulinique rend l'aspiration médullaire difficile. La biopsie médullaire peut être nécessaire dans certains cas pour affirmer le diagnostic. L'immunophénotypage lymphocytaire par CMF montre la présence de cellules lymphoïdes B clonales CD19+, CD20+. Un score immunologique, comme le score de Matutes utilisé dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), a été développé pour le

diagnostic de la LT. Ce score est basé sur l'expression de quatre marqueurs ; CD103, CD11c, CD25 et CD123. Un point est attribué pour une expression positive et 0 point pour une expression négative. 98 % des cas de LT ont un score à 3 ou 4 [39].

Concernant les données génétiques, les gènes des IGVH ont subi des hypermutations somatiques dans 85% des cas. La mutation BRAFV600E est retrouvée dans toutes les LT et absente des autres SLP-B, ce qui en fait une mutation spécifique de la LT.

5. Le lymphome folliculaire :

Le lymphome folliculaire est un néoplasme des cellules B du centre germinatif des follicules. Ce lymphome a une forte prédominance ganglionnaire, mais la rate, la moelle osseuse (40 à 70% des cas) et le sang peuvent être infiltrés. Les cellules lymphomateuses observées dans le sang sont généralement des centrocytes. Ils ont un noyau un peu plus grand que celui d'un lymphocyte normal, présentent une encoche étroite et profonde, parfois réduite à un simple coup d'angle, et une chromatine très compacte mais non mottée, sans nucléole visible. Le cytoplasme est faiblement basophile et très peu abondant, parfois visible uniquement dans l'échancrure du noyau (figure 12).



Figure 12. Centrocytes du lymphome folliculaire [8]

Au niveau ganglionnaire, le lymphome folliculaire est typiquement composé de deux types de cellules B retrouvés dans les centres germinatifs. Les cellules de taille petite à moyenne avec un noyau angulaire, allongé, clivé avec un très discret nucléole et un cytoplasme pâle sont des centrocytes. Les cellules larges avec un noyau rond ou ovale, mais occasionnellement réniforme ou multilobé avec une chromatine vésiculée contenant un à trois nucléoles périphériques et un cytoplasme à bord étroit sont des centroblastes.

L'immunophénotypage rappelle celui des cellules des centres germinatifs normaux : CD19+, CD20+, CD22+, CD79a+, immunoglobuline de surface positive, CD10+ qui s'exprime souvent de manière plus intense dans le follicule que dans les cellules lymphomateuses interfolliculaires [8].

Tous les lymphomes folliculaires ont des anomalies cytogénétiques. La plus fréquente est la translocation t(14;18) (q32;q21), présente dans 80 à 90 % des cas. Dans cette translocation, un des gènes BCL2 localisé sur le chromosome 18 est juxtaposé aux séquences régulatrices du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines sur le chromosome 14 et forme le réarrangement BCL2/JH, avec dérégulation du gène BCL2.

Quatre-vingt-dix pour-cent des lymphomes folliculaires ont d'autres anomalies chromosomiques, le plus souvent des pertes chromosomiques concernant les chromosomes 1p, 6q, 10q, 13q, 17p ou des gains sur les chromosomes X, 1q, 2q, 7q, 7, 12q, 18q [40].

6. Leucémie à prolymphocyte -B :

La leucémie à prolymphocytes (LPL-B) est définie par un taux sanguin de prolymphocytes supérieur à 55%. Les patients se présentent avec une splénomégalie et des adénopathies périphériques minimales. Le taux de lymphocytes sanguins est généralement très élevé et souvent supérieur à 100 G/L, accompagné d'une anémie et d'une thrombopénie dans 50% des cas qui reflètent le degré d'infiltration médullaire. Le clone tumoral envahit principalement la moelle osseuse, le sang et la rate [19].

Le diagnostic cytologique montre la présence de prolymphocytes, cellule de grande taille (environ deux fois plus grand qu'un petit lymphocyte) avec un noyau rond, une chromatine modérément condensée et un nucléole prédominant central. Le rapport nucléocytoplasmique est élevé, le cytoplasme est clair, abondant et faiblement basophile (Figure 13).

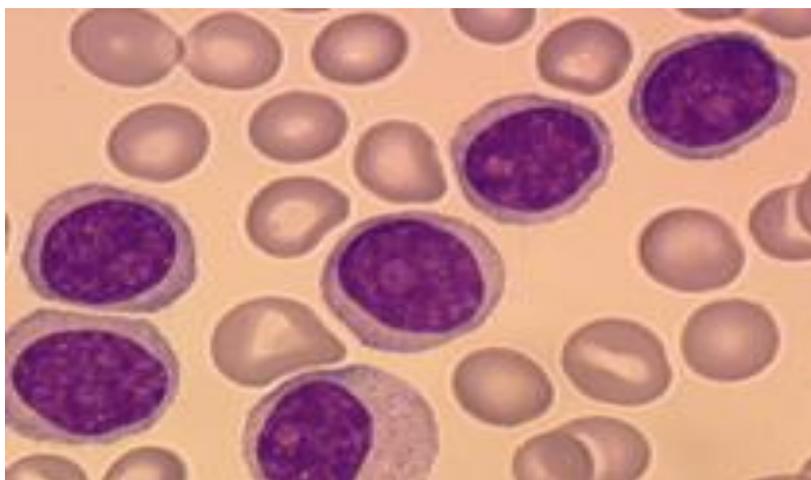


Figure 13. Leucémie à prolymphocyte [3]

L'immunophénotypage permet de confirmer la présence d'une prolifération B avec restriction monotypique kappa ou lambda. Les cellules polyclonales malignes expriment des antigènes B : CD19, CD20, CD22, CD79a et b, FMC7, ainsi que des immunoglobulines de surface. Le diagnostic de la LPL-B est basé principalement sur la morphologie et l'immunophénotypage.

Peu d'études systématiques du statut mutationnel des gènes des immunoglobulines ont été effectuées dans les LPL-B. Il semblerait que dans une majorité des cas les gènes soient mutés [7].

7. Lymphome lymphoplasmocytaire ou maladie de Waldenström :

La macroglobulinémie de Waldenström (MW) est actuellement définie comme une infiltration lymphoplasmocytaire envahissant la moelle osseuse (MO) associée à un pic monoclonal sérique d'isotype IgM. Au sein de la classification WHO, la Maladie de Waldenström appartient à la classe des hémopathies lymphoïdes de bas grade de phénotype B, de type lymphomes lymphoplasmocytaires [41].

Lors du second International workshop on Waldenström macroglobulinemia, les critères suivants ont été validés pour définir la MW (Tableau 3) : présence d'une immunoglobuline sérique de type IgM de taux variable, infiltration de la MO par des lymphocytes présentant une différenciation plasmocytaire ou plasmacytoïde, appelées lymphoplasmocytes, infiltration intertrabéculaire de la moelle osseuse à la biopsie ostéoméduleuse (BOM) et des critères immunophénotypiques [9].

Tableau 3. Critères diagnostiques de la maladie de Waldenström

- Composant monoclonal sérique d'isotype IgM quelle que soit la concentration sérique.
- Infiltration de la moelle osseuse par une population clonale de lymphoplasmocytes constituée de lymphocytes, de lymphoplasmocytes à différenciation plasmocytaires ou plasmacytoïdes et de plasmocytes.
- Infiltration intertrabéculaire sur la biopsie de la moelle osseuse.
- Expression des marqueurs de surface : IgM+, CD19+, CD20+, CD22+, FMC7+, mais aussi : CD38+ (pas systématique), CD25+, CD27+, CD5 ± , CD23 ± , CD10-, CD103, CD138-

Environ 15 à 30% des patients ont une splénomégalie, une hépatomégalie et des adénopathies. L'hémogramme montre dans 60 % des cas une hémoglobine inférieure à 12 g/dl. L'anémie est le plus souvent normochrome, normocytaire. Une neutropénie n'est observée que chez 3% des patients lors du diagnostic. Une hyperlymphocytose peut être présente, mais les leucocytes dépassent rarement 15 G/L. Dans la majorité des cas, la formule leucocytaire est normale [9].

La richesse de la moelle osseuse peut être normale ou diminuée, avec une infiltration par un clone lymphoplasmocytaire constitué de lymphocytes, de lymphoplasmocytes à différenciation plasmocytaires ou plasmacytoïdes et de plasmocytes caractérise la MW. La morphologie médullaire est similaire à celle retrouvée dans le sang (figure 14). Parfois le clone tumoral est retrouvé dans les organes lymphoïdes et dans les sites extra-ganglionnaires. La présence de rouleaux d'hématies sur le frottis sanguin est fréquemment observée. Une Biopsie Ostéo Médullaire (BOM) est recommandée pour poser le diagnostic de MW mais chez de nombreux patients la BOM n'est pas faite (âge, au refus du patient, absence de traitement envisagé). Pour ces patients, la réalisation du myélogramme couplé à un immunophénotypage constitue une étape importante dans la démarche diagnostic de la MW.

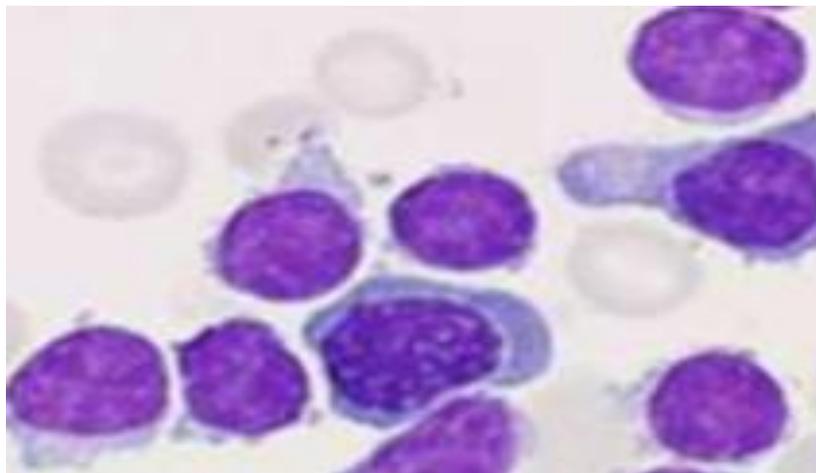


Figure 14 . Lymphome lymphoplasmocytaire [41]

L'immunophénotypage des cellules de MW en cytométrie en flux ou en immunohistochimie sur la BOM caractérise la nature lymphoïde B et la clonalité des cellules tumorales [42]. Une expression modérée à forte des Ig de surface est observée, ainsi que des marqueurs pan-B. Le score de Matutes est dans la majorité des cas inférieur à 3. Les marqueurs CD5, CD23 et le CD10 sont rarement exprimés. Une hétérogénéité intraclonale immunophénotypique a été rapportée dans la MW. Dans environ un tiers à deux tiers des cas, le CD38 est faiblement exprimé par les cellules B dans le MW. Le composant plasmocytaire du clone peut présenter un phénotype aberrant (CD38+, CD19+, CD56-, CD45+ et parfois CD20+) [9].

Concernant la génétique, il n'y a pas d'anomalie chromosomique et/ou oncogénique spécifique identifiée [9].

En Résumé :

Ces différentes pathologies ont des événements oncogéniques différents qui entraînent une variation de l'expression d'antigènes membranaires (ou intracellulaire) sur le clone lymphomateux. Ces différents antigènes pourront être étudiés en cytométrie en flux. Confronté aux multiples difficultés de diagnostics différentiels tant sur le plan clinique, que morphologique, la réalisation d'un immunophénotypage sanguin est utile et contribue par son interprétation précise à la classification des différents SLPC-B. Le phénotypage reste une investigation indispensable, associé à l'étude morphologique sanguine. Il affirme la monotypie et oriente le diagnostic.

IV. La stratégie thérapeutique :

1. Bilan d'extension :

Le bilan d'extension de la maladie est nécessaire pour décider du traitement et permet également de déterminer le pronostic de la maladie.

1.1. Biologie :

- Biopsie ostéo-médullaire, généralement complétée par un myélogramme (recherche d'une atteinte médullaire).
- Ponction lombaire éventuelle avec analyse cytologique et biochimique du LCR (recherche d'une atteinte méningée pour certains lymphomes agressifs).
- L'immunophénotypage permet de rechercher des marqueurs pronostiques de la maladie, comme le CD38 ou l'expression de ZAP70 dans la LLC. Il détaille également les intensités d'expression des antigènes physiologiques et aberrants. Il peut influencer sur les traitements thérapeutiques du patient, notamment lors de l'utilisation d'anticorps monoclonaux comme l'anti-CD20 (Rituximab) ou anti-CD52 (Alemtuzamab) [43].

1.2. Imagerie :

- Tomodensitométrie (TDM) abdominale et pelvienne ;
- TEP-scanner
- selon les cas : radiographie thoracique et échographie abdominale et pelvienne, IRM.

2. Classification de LNH :

2.1. Classification d'Ann Arbor :

L'étendue de la maladie est appréciée selon la classification d'Ann Arbor (excepté pour les lymphomes cutanés) (Tableau 4) :

Tableau 4. Classification d'Ann Arbor 2018 [44]

Stade I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire sous diaphragmatique
Stade II	Atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme
Stade III	Atteinte ganglionnaire de part et d'autre du diaphragme
Stade IV	Atteinte viscérale à distance d'un groupe ganglionnaire

Le stade est complété de:

- La lettre A : en l'absence de signes généraux d'évolutivité (fièvre $>38^{\circ}$ durant au moins une semaine, hypersudation nocturne abondante, amaigrissement de plus de 10% en six mois) ;
- La lettre B : si présence d'au moins un signe général ;
- La lettre E : si atteinte extra-ganglionnaire contiguë à une atteinte ganglionnaire.

2.2. Classification de Binet (1981) :

Pour la LLC, la classification la plus utilisée est celle de Binet pour apprécier le pronostic et participer aux indications thérapeutiques [45].

Celle-ci distingue trois stades :

- **Stade A** : moins de trois aires lymphoïdes superficielles atteintes.
- **Stade B** : au moins trois aires lymphoïdes superficielles atteintes.
- **Stade C** : anémie avec hémoglobine $< 10\text{g/l}$ et/ou thrombopénie avec plaquettes $< 100\text{ G/l}$ quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes superficielles atteintes.

3. Thérapie :

3.1. Lymphomes non hodgkiniens agressifs :

Les LNH agressifs nécessitent l'introduction d'un traitement quel que soit leur stade au moment du diagnostic. Les options thérapeutiques comprennent:

- la chimiothérapie
- l'immunothérapie
- la radiothérapie
- la greffe de cellules souches hématopoïétiques

Le traitement de référence repose sur une immunochemiothérapie de première intention.

Une intensification de traitement par une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est indiquée chez les patients de mauvais pronostic (en fonction de l'âge) [46].

3.2. Lymphomes non hodgkiniens indolents :

Les lymphomes indolents évoluent le plus souvent sur plusieurs années mais sont difficilement curables. Ils peuvent se transformer en lymphomes agressifs de type variable. Les options thérapeutiques sont décidées en fonction de la masse tumorale (faible ou forte), du retentissement clinique et biologique du lymphome ainsi que de l'état général du patient.

Elles comprennent :

- L'abstention thérapeutique
- La chimiothérapie
- L'immunothérapie
- La radiothérapie

En dehors de protocoles de recherche, les patients asymptomatiques et avec une faible masse tumorale (20 à 30 % des patients) relèvent habituellement d'une abstention thérapeutique avec surveillance régulière de l'évolution de la maladie et de la masse tumorale. Lorsqu'un traitement s'avère nécessaire, le traitement de référence repose sur une immuno-chimiothérapie. Elle associe une polychimiothérapie à un anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab), En cas de rechute, un traitement de consolidation par une greffe de cellules souches hématopoïétiques doit être discuté par l'équipe spécialisée [46].

4. Immunothérapie et Cytométrie en Flux :

Le profil biologique de chaque tumeur oriente la décision thérapeutique vers un traitement de plus en plus personnalisé (Médecine personnalisée).

4.1. Cibles potentielles des anticorps monoclonaux dans les hémopathies malignes lymphoïdes B :

En hématologie, ce sont principalement des structures membranaires appelées CD (Cluster of Differentiation), portées par les cellules hématopoïétiques [47].

CD20 : (rituximab) Anticorps chimère contenant une région constante humaine de type IgG1 et une région murine variable dirigée contre le CD20.

Le rituximab est capable de lyser les cellules exprimant le CD20 en induisant une réponse des cellules effectrices contre ces cellules par l'intermédiaire du fragment Fc de l'anticorps (ADCC) ou par l'activation de la cascade du complément (CDC) [48,49]. Il peut aussi induire l'apoptose des cellules CD20+ [50].

CD22 : L'épratuzumab est un anticorps humanisé de type IgG1 dirigé contre le CD22, le seul qui soit intériorisé dans la cellule quand il est lié à l'anticorps ce qui le rend une cible intéressante pour l'immunothérapie [51].

CD23 : L'anti-CD23 (lumiliximab) est un anticorps humanisé chimère de type IgG1 [52].

CD40 : L'anticorps humanisé anti-CD40 (CHIR-12.12) est bloquant et conduit ainsi à l'apoptose des cellules leucémiques [53].

CD80 : Galiximab (IDEC-114) est un anticorps monoclonal qui se lie à CD80 exprimé par les lymphomes provoque ainsi l'apoptose des cellules surexprimé, et inhibe leurs prolifération et participe à l'induction de l'ADCC [54].

Le CD 52 est fortement exprimé dans la LLC et certains LNH indolents. L'Alemtuzumab (Campath-IH) est un anticorps humanisé recombinant dirigé contre la molécule CD52. Il s'agit d'un anticorps chimère de type IgG1 kappa dont la partie la plus variable est d'origine murine [55] Le mécanisme d'action de cet anticorps a été moins étudié. La littérature suggère une association d'ADCC, de CDC et d'apoptose de la cellule cible [56].

4.2. Thérapie par des Lymphocytes T génétiquement modifiés:

Les lymphocytes T sont des acteurs majeurs du microenvironnement ; les méthodes de stimulation et d'amplification des lymphocytes T font partie des nouvelles voies thérapeutiques.

4.2.1. Concepts et principes des CAR-T Cells :

Le développement de nouvelles approches d'immunothérapies anti-tumorales est en plein essor. Les avancées de la biologie moléculaire et le développement d'outils variés de manipulation génétique permettent de « reprogrammer » les lymphocytes T afin de leur faire exprimer un récepteur chimérique incluant la partie variable d'une immunoglobuline capable de reconnaître un antigène tumoral associée à l'expression de molécules induisant l'activation des lymphocytes T. Les lymphocytes T ainsi génétiquement modifiés, appelés « CAR (Chimeric Antigen Receptor)-T cells », ont permis d'obtenir des résultats cliniques impressionnants dans le traitement des hémopathies lymphoïdes B en rechute ou réfractaires aux traitements [57].

4.2.2. Activation des CAR-T :

Dans le cadre de la réponse immune adaptative médiée par les LT, l'activation et la prolifération lymphocytaire ne peut être assurée que par l'association de 3 signaux. D'abord la reconnaissance du complexe antigène/CMH par le TCR, puis l'interaction des molécules de co-stimulation et la réception de signaux cytokiniques. Le récepteur chimérique des cellules CAR-T porte quant à lui l'ensemble des signaux d'activation, via le domaine de signalisation CD3 et l'expression des molécules de co-stimulation. Ces signaux sont déclenchés dès la reconnaissance directe de la cible antigénique par le fragment variable (scFv) de l'immunoglobuline reconnaissant spécifiquement l'antigène cible. Les signaux de co-stimulation induisent l'activation du lymphocyte CAR-T après reconnaissance de l'antigène conduisant à la production de cytokines et l'expression de récepteurs de cytokines tel que CD25 sur le CAR-T activé, mimant le signal 3 cytokinique d'activation lymphocytaire T conventionnelle et permettant la prolifération des CAR-T cells. L'activation des CAR-T cells est par ailleurs potentiellement amplifiée par la libération de cytokines inflammatoires liée à la lyse tumorale et l'activation des CPA et des monocytes/macrophages (syndrome de relargage cytokinique) [57].

4.2.3. Sélection de la cible des CAR :

Le choix de la cible est essentiel pour obtenir la meilleure efficacité avec une toxicité acceptable. Idéalement, la cible doit être exprimée de façon uniforme, importante et sélective sur les cellules tumorales. Ce critère n'est pas l'unique déterminant de l'efficacité des CAR-T cells, l'hétérogénéité d'expression antigénique sur les différents clones tumoraux de certaines tumeurs et la sélection clonale peuvent concourir à l'échappement aux CAR-T cells. Inversement, le choix de la cible va conditionner la toxicité des CAR-T cells par l'induction d'un effet « on-target/off-tumor » qui est lié à la destruction de tissus sains par les CAR-T cells en cas d'expression partagée de la cible antigénique en dehors du tissu tumoral. De nombreux antigènes cibles ont été sélectionnés dans les hémopathies malignes et les tumeurs solides [58]. En onco-hématologie, le succès des CAR-T cells dirigées contre le CD19 dans les hémopathies lymphoïdes B est lié à l'expression habituelle de cette cible par les clones B tumoraux alors que le CD19 n'est pas exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques. Il est cependant exprimé par les lymphocytes B non tumoraux et la persistance des CAR-T cells est associée à une aplasie B et une hypogammaglobulinémie profonde. D'autres cibles sont en cours de développement dans les hémopathies lymphoïdes matures : CD20, CD22, CD23 pour les lymphomes/leucémie lymphoïde chronique (qui auront les mêmes conséquences que la cible CD19 sur la lymphopoïèse B) [57].

5. Maladie résiduelle minimale et CMF :

La maladie résiduelle est définie par la persistance dans le tissu examiné de cellules malignes en dessous du seuil de détection par les techniques conventionnelles, au terme d'une séquence thérapeutique à visée éradicatrice [59]. L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) chez les patients avec hémopathies malignes est l'élément essentiel pour la prise en charge thérapeutique. Les techniques de biologie moléculaire sont très sensibles mais longues et coûteuses. Le développement de techniques simples, rapides et très sensibles comme la cytométrie en flux multicolore a permis, d'étudier de grandes séries de patients traités par différentes stratégies thérapeutiques. Il a été montré que la persistance de cellules leucémiques résiduelles dans le sang et/ou dans la moelle augmente le risque de rechute. La CMF permet l'évaluation de la réponse thérapeutique par la quantification de la maladie résiduelle minimale et apporte ainsi aux cliniciens des arguments prédictifs d'une rechute ou d'une longue survie sur lesquels ils peuvent se baser pour des prises de décisions thérapeutiques. L'étude de la MRD en cytométrie en flux est basée sur l'identification de marqueurs immunophénotypiques sur les cellules leucémiques qui expriment de façon aberrante certains marqueurs, créant ainsi un immunophénotype aberrant spécifique du clone leucémique. Ces immunophénotypes aberrants sont retrouvés dans la littérature sous le terme de « Leukemia-Associated Aberrant

Immunophenotypes » ou LAIP [60].

On distingue 4 catégories de LAIP:

- Les LAIP de type surexpression antigénique.
- Les LAIP de type diminution ou perte d'expression d'un marqueur (trou phénotypique).
- Les LAIP de type asynchronisme : (exemple CD34/CD15) la co-expression d'antigènes spécifiques de cellules immatures comme le CD3 intracytoplasmique avec des antigènes de cellules matures de la même lignée comme le CD5, alors que le CD3 de surface est absent, est évocatrice de leucémie (CD5+/cCD3+/sCD3-).
- Les LAIP de type infidélité de lignée.

La quantification de la MRD dans les hémopathies malignes par CMF consiste à définir le nombre de cellules résiduelles présentant le LAIP parmi les cellules totales. Sa sensibilité dépendra de la spécificité de l'immunophénotypage et du nombre de cellules disponibles pour l'analyse. Une MRD indétectable après traitements est associée à un risque de rechute très bas. Il semble que l'étude de la cinétique de la MRD mesurée à différents moments du traitement permettrait d'augmenter sa valeur pronostique. L'intérêt de la mesure de la MRD est de pouvoir renforcer le traitement plus tôt avant la survenue d'une rechute ou de pouvoir éventuellement l'alléger si le risque de rechute est très bas [61].

B. IMMUNOPHENOTYPAGE LYMPHOCYTAIRE DES SLPC-B PAR CMF :

I. PRINCIPE :

1. Définition :

La CMF est définie par la mesure des cellules dans un flux. Ces mesures peuvent être faites par des méthodes optiques et électriques. L'instrument fondamental a été développé il y a environ une quarantaine d'années, mais son application de diagnostic clinique s'est étendue seulement dans les vingt dernières années. Le trait le plus attractif de la CMF est sa capacité d'analyse rapide et précise des cellules individuelles [62].

La CMF est une technique dite, multiparamétrique, qui permet d'analyser le phénotype des cellules afin de sonder le système hématopoïétique/immunitaire. De plus, outre la détection de marqueurs de surface, elle permet de cibler des composantes intracellulaires telles que les phosphoprotéines qui sont largement explorées en recherche et qui commencent à faire partie des éléments diagnostics et pronostics de routine en hématologie.

2. Historique de la CMF:

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

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

Durant les années 1970, l'utilisation des photomultiplicateurs permet d'améliorer la quantification des signaux lumineux. Les cytographes et cytofluorographes sont les premiers appareils équipés d'une source laser, le fluorocytographe permet d'ailleurs de mesurer la taille de la cellule via la collection des signaux diffusés aux petits angles « forward scatter » et la mesure des fluorescences verte et rouge. En 1972, HERZENBERG développe un nouvel appareil, le « fluorescence activated cell sorter » (FACS) qui permet de séparer et de trier les populations cellulaires. Ce concept est repris par la société BECTON DICKINSON qui commercialise une version de cet instrument (FACS II). Jusqu'aux années 1980, les cytomètres expérimentent plusieurs types de laser avec l'utilisation d'un nombre croissant de fluorochromes différents. L'arrivée des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules lymphoïdes du sang a révolutionné la pratique de la cytométrie en flux, en passant du stade de recherche à la pratique en routine de ces analyses, ce qui a amené à rechercher de nouveaux

fluorochromes utilisables en cytométrie de routine. Depuis les années 1980, le traitement des informations est réalisé par des systèmes informatiques et le nombre de couleurs analysées ne cessent d'augmenter. Les nouveaux analyseurs peuvent combiner jusqu'à 16 paramètres simultanément, et analyser les cellules à la vitesse de 100 000 événements par seconde [43. 63].

3. Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux :

La CMF repose sur l'analyse de cellules en suspension marquées par des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Les cellules sont injectées dans un flux laminaire continu et vont passer les unes derrière les autres devant plusieurs lasers. Leurs irradiations provoquent l'excitation des fluorochromes qui vont émettre leurs fluorescences respectives. Ces signaux sont captés par des détecteurs spécifiques et amplifiés par des photomultiplicateurs puis intégrés informatiquement pour étudier les différentes populations cellulaires de l'échantillon. Après l'analyse, les cellules peuvent être ensuite triées en fonction des différents paramètres analysés [64].

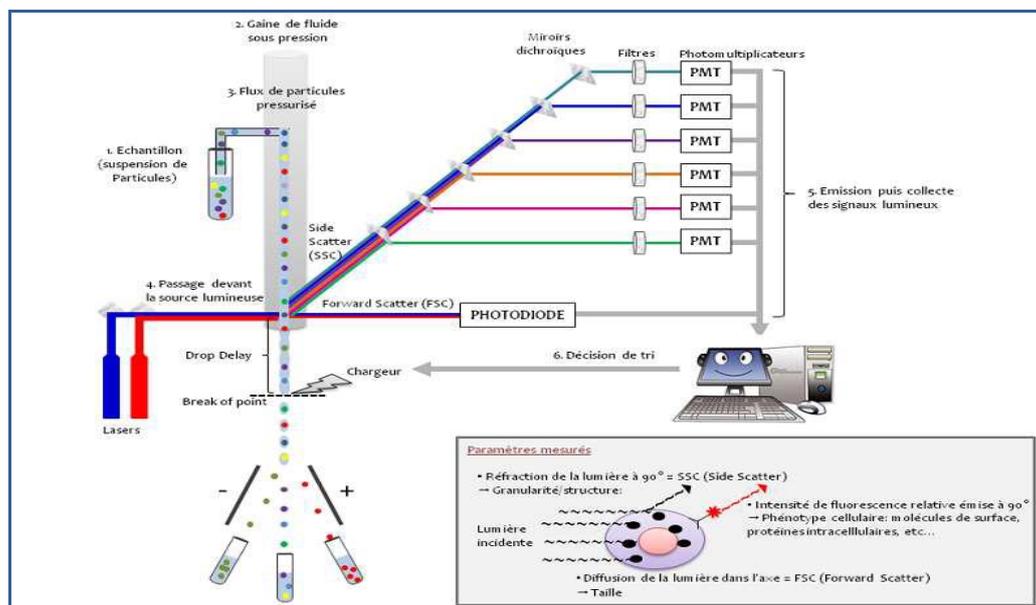


Figure 15. Représentation schématique du fonctionnement d'un cytomètre de flux
(BFA - Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative - CNRS UMR 8251)

3.1. Système fluide :

Le but de la focalisation hydrodynamique est de faire passer des cellules en suspension, les uns derrière les autres, à très grande vitesse, devant une source laser afin de les analyser séparément. Ceci est réalisable grâce aux propriétés des fluides. Il y a deux composants liquides principaux, le liquide de gaine (qui forme le manteau à l'intérieur duquel les cellules circulent) et l'échantillon contenant des cellules en suspension (Figure 16). Trois paramètres permettent d'expliquer la focalisation hydrodynamique : la pression, la vitesse et la densité [43.65].

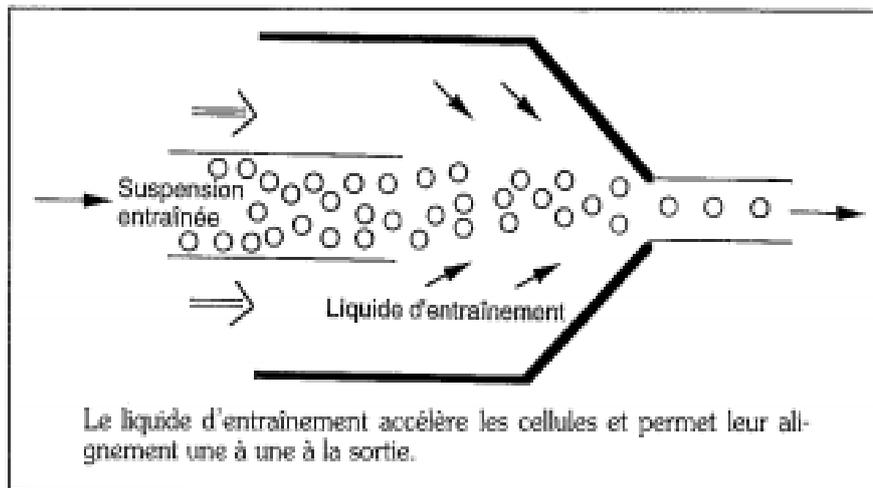


Figure 16. Représentation schématique de la focalisation hydrodynamique [66].

L'échantillon est injecté avec une certaine pression au milieu d'une buse, à l'intérieur de laquelle le liquide de gaine est lui aussi amené avec une certaine pression. C'est la pression du liquide de gaine qui définit la vitesse du flux cellulaire, et donc la vitesse d'analyse des cellules. La sortie de la buse étant un petit orifice, le liquide de gaine sera accéléré à la sortie de la buse. Ce dernier sort de la buse sous forme de jet dont le diamètre correspond à celui de l'orifice. La structure de la buse et de l'orifice permettent d'obtenir un flux laminaire à l'intérieur duquel les cellules sont attirées et sont forcées de circuler les unes derrière les autres, permettant ainsi une analyse individuelle.

Deux conditions sont nécessaires pour permettre la création d'un flux :

- ❖ Une pression doit être appliquée sur le liquide de gaine et sur l'échantillon.
- ❖ La pression doit être plus grande sur le liquide de gaine que sur la suspension cellulaire (différentiel positif).

Si le différentiel de pression était négatif, le liquide de gaine serait refoulé vers l'injecteur et donc vers l'échantillon également. En cas de pression identique sur le liquide de gaine et sur l'échantillon, ce dernier n'aurait pas la possibilité de s'insérer dans le flux.

Comme dit précédemment, la pression du liquide de gaine influence la vitesse de défilement cellulaire, mais il y a aussi la pression de l'échantillon qui influence le flux.

L'utilisateur a la possibilité de changer la pression différentielle appliquée sur l'échantillon et donc de modifier la vitesse de défilement des cellules. Cependant, en augmentant le différentiel de pression, la vitesse est accélérée mais le diamètre du jet cellulaire est lui aussi agrandi. Cette dernière modification entraîne une influence négative sur la précision de l'analyse. En effet, le diamètre étant élargi, la vitesse de défilement augmente mais le centrage des cellules dans le flux diminue et pèjore la qualité de l'analyse. Lorsque les cellules ne passent pas toutes au même endroit devant le laser, il se crée alors des variations entre les cellules. La fluorescence des cellules n'est alors pas le reflet exact de leur charge en fluorescence, et les résultats sont moins précis. Pour intensifier la vitesse d'analyse, il est donc préférable d'appliquer une pression qui permet de garder cette précision de centrage des cellules, et plutôt d'augmenter la concentration cellulaire de l'échantillon.

En ce qui concerne la densité, c'est aussi un élément important de la focalisation hydrodynamique. Il est préférable de choisir les liquides de gaine ayant une densité inférieure ou identique à celle de l'échantillon, afin de prévenir les effets de réflexion qui peuvent entraîner une perte du signal. Évidemment, chaque appareil est différent. Les réglages faits sur un appareil ne seront pas les mêmes sur un autre appareil de CMF. Chaque paramètre doit être adapté. Par exemple, certains appareils de CMF analysent 1'000 à 2'000 cellules/seconde alors que d'autres sont capables de lire 30'000 cellules/seconde.

3.2. L'excitation lumineuse :

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

Les appareils de cytométrie peuvent être équipés d'un ou de plusieurs lasers pour élargir le panel de fluorochromes détectables et donc augmenter le nombre de paramètres analysables (jusqu'à 16 paramètres). Plusieurs types de laser peuvent être utilisés comme source d'excitation lumineuse. En cytométrie, les plus couramment utilisés sont des lasers Argon qui fournissent plusieurs raies d'excitations.

3.3. Système optique :

Le système optique d'un appareil de CMF se compose de plusieurs éléments :

- Une cellule de lecture
- Une succession de filtres et miroirs
- Des détecteurs.

3.3.1. La cellule de lecture :

Le point de rencontre entre le laser et les cellules constitue la cellule de lecture.

Au moment où le laser frappe les cellules qui se présentent devant lui, plusieurs informations sont obtenues :

- La taille de la cellule (forward scatter à 0 degré)
- La complexité de la cellule (side scatter à 90 degrés)
- Les différentes intensités de fluorescence émises par la cellule (90 degrés).

Forward scatter (diffusion aux petits angles) :

Le forward scatter donne une indication sur la taille de la cellule (figure 17). Ce signal correspond à la lumière diffractée. Cette dernière est recueillie à 0 degré par rapport à l'axe du laser.

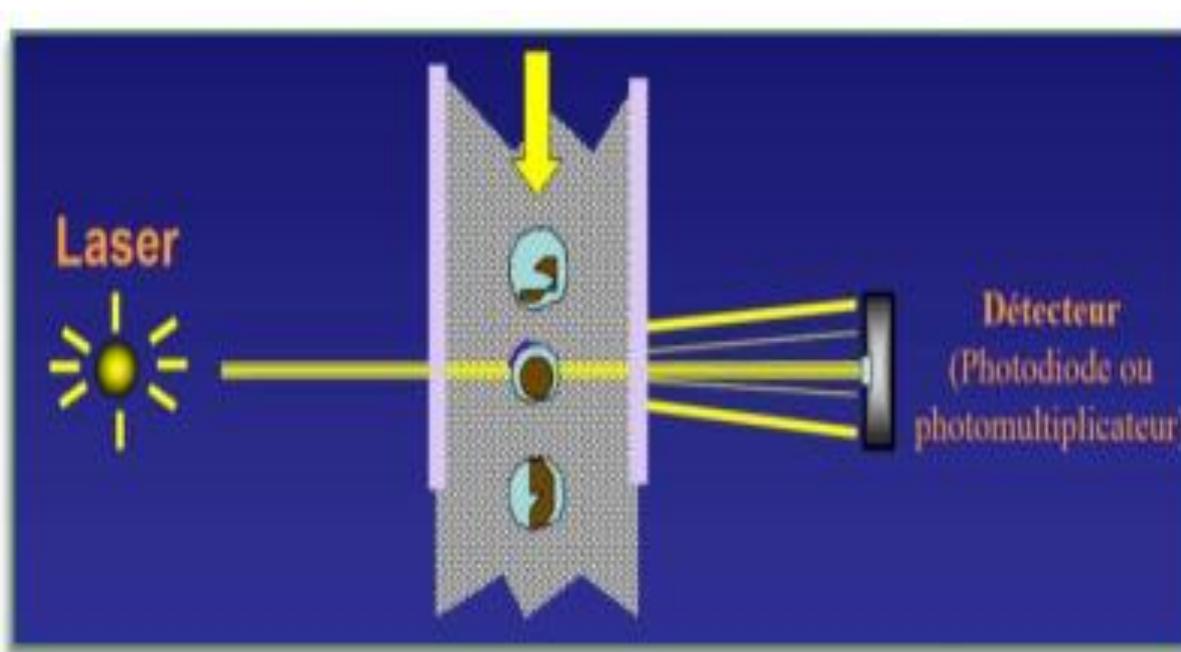


Figure 17. Forward scatter [67].

Side scatter (diffusion aux grands angles) :

Le side scatter donne une indication sur la complexité de la cellule (granularité et noyau). Ce signal correspond à un mélange de lumière diffusée, réfléchie et réfractée, recueillie à 90 degrés par rapport à l'axe du laser (figure 18).

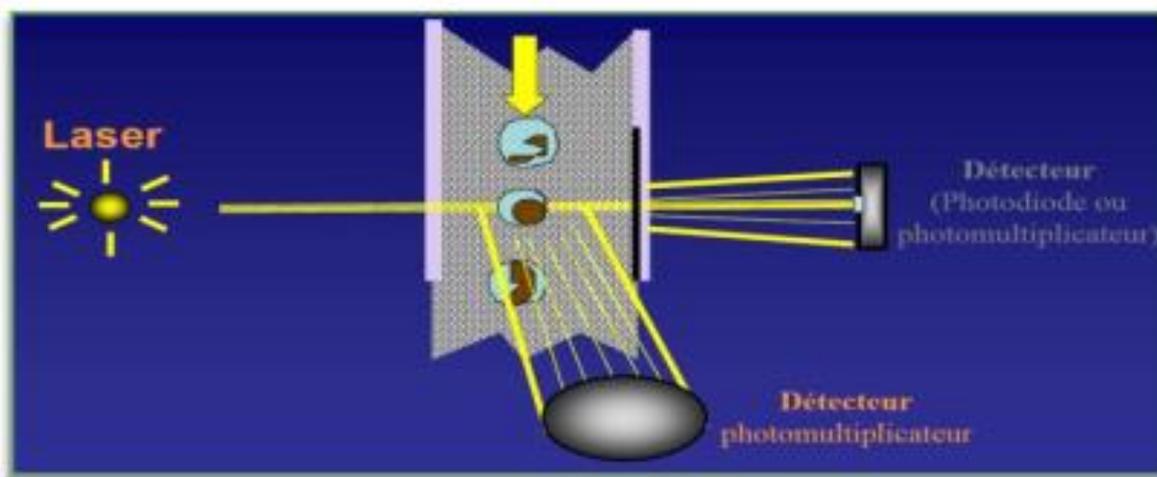


Figure 18. Side scatter [67]

Fluorescence émise par les cellules:

A 90 degrés, on recueille également la fluorescence émise par les cellules. Une cellule émet de la fluorescence pour autant qu'elle ait été préalablement marquée par un anticorps lié à un fluorochrome (figure 19). La fluorescence doit finalement être acheminée vers des détecteurs.

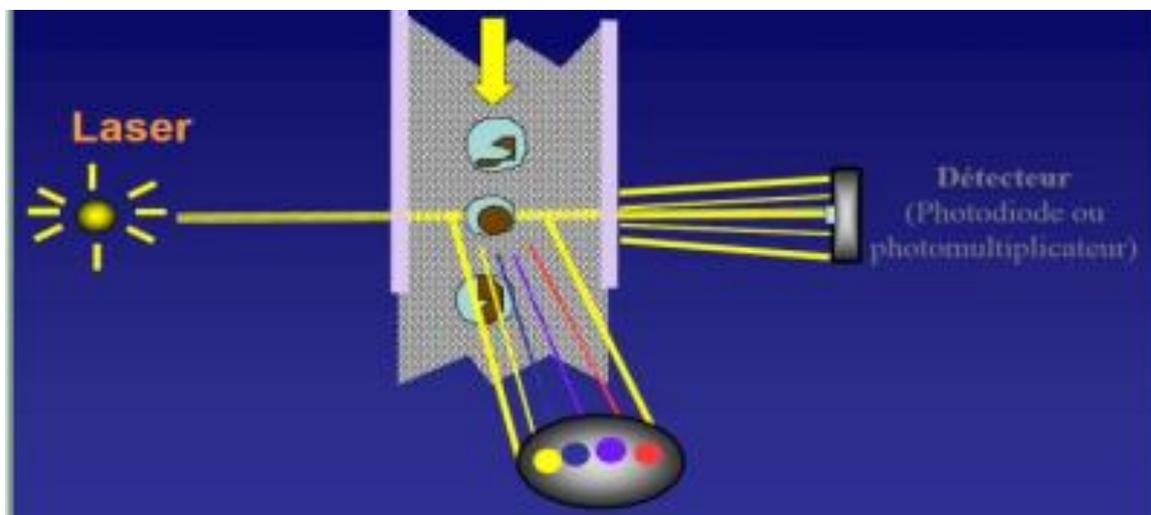


Figure 19. Fluorescence [67]

3.3.2. Filtre et miroir :

Le rôle des filtres et des miroirs est de conduire la fluorescence vers un détecteur et également de définir la « partie » de la fluorescence à transmettre afin que chaque détecteur ne reçoive finalement que les longueurs d'ondes qui lui sont appropriées.

3.3.3. Détecteurs :

La détection du signal en CMF s'effectue grâce à des photodétecteurs. Le rôle d'un photodétecteur est de convertir les photons en photon-électrons, ce qui a la particularité de créer un courant électrique. Il existe deux types de photodétecteurs dans un appareil de CMF : les photodiodes et les photomultiplicateurs (PMT).

Les photodiodes : sont généralement utilisés pour détecter des signaux d'intensité élevée. On les utilise notamment pour la détection du signal du forward scatter.

Les photomultiplicateurs : Les PMT sont habituellement utilisés pour détecter des signaux de plus faible intensité (comme le Side Scatter). On les utilise également pour la détection de la fluorescence des éléments marqués.

3.4. Digitalisation du signal :

Après la photodétection, on obtient ce que l'on appelle une impulsion. Grâce à cette valeur, l'étape de conversion d'un voltage en une valeur numérique est réalisable. Cette étape s'appelle la digitalisation du signal. Pour sa réalisation, des convertisseurs analogiques-numériques sont nécessaires. Aujourd'hui, chaque firme possède un système de traitement du signal un peu différent [68].

4. Préparation et analyse des échantillons :

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

La lyse des globules rouges (éléments mille fois plus représentés que les leucocytes) permet de les éliminer et de limiter les interférences pendant l'analyse. La centrifugation du prélèvement sur un gradient de densité enrichit la population d'intérêt en isolant les cellules mononuclées [69].

Le lavage des échantillons dans un tampon isotonique est recommandé pour éliminer les immunoglobulines naturelles circulantes qui interfèrent avec l'étude des chaînes légères Kappa/Lambda ou des chaînes lourdes des immunoglobulines. L'étude des cellules avec un taux élevé de récepteurs aux fragments Fc (ex : lymphocytes B) est difficile, la saturation des récepteurs par du sérum (animal ou humain) peut éviter un marquage non spécifique. Le marquage des cellules est réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome, à concentration saturante après une incubation d'environ 15 à 30 minutes dans l'obscurité. Des perméabilisants de membranes sont utilisés pour permettre le marquage d'antigènes intracellulaires [43].

5. La notion de CD :

La plus importante avancée technologique pour l'aide à l'identification des cellules immunitaires a été le développement des anticorps monoclonaux par C. Milstein en 1975 (Kohler and Milstein, 1975; Milstein, 1999). Les anticorps monoclonaux sont de très puissants réactifs spécifiques d'un antigène particulier, qui indique par leur liaison (ou leur absence de liaison), que l'antigène en question est exprimé (ou absent) de la surface des cellules analysées. De plus en plus utilisés et commercialisés par différentes sociétés sous différents noms, une confusion s'est rapidement installée pour savoir quel anticorps reconnaissait tel ou tel antigène. Un comité international a rapidement été formé pour tester tous les anticorps connus, et établir une nomenclature standard pour les antigènes reconnus par ces anticorps [70].

Un « CD » fait référence à un groupe d'anticorps monoclonaux réagissant avec un antigène particulier. Par exemple, les lymphocytes T auxiliaires exprime l'antigène CD4, et donc tous les anticorps qui reconnaissent l'antigène CD4 sont simplement appelés « anticorps anti-CD4 ».

Depuis 1982, date du premier Workshop on human leucocyte differentiation antigens ayant eu lieu à Paris, les CD ou clusters de différenciation, sont regroupés dans une classification internationale [71]. On compte actuellement 371 CD.

Tableau 5. Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B [72].

Marqueurs	Expression normale	Intérêt dans les SLPC-B
CD5	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	CLL , MCL
CD10	Lymphocytes B et T immatures	FL
CD11c	Quelques lymphocytes B et T	HCL , parfois faible expression dans CLL,LPL,MZL,SLVL
CD19	Lymphocytes B et plasmocytes	Marqueurs de la lignée B
CD20	Lymphocytes B	Marqueurs de la lignée B, faible intensité dans CLL
Chaines légère κ /λ	Lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
CD22	Lymphocytes B	Marqueurs de la lignée B, faible expression dans CLL
CD23	Faiblement positif dans les lymphocytes B matures, expression augmenté lors de l'activation	Diagnostic différentiel entre CLL et les autres SLPC CD5+
CD24	Expression intermédiaire sur les précurseurs B et T	MZL
CD25	Lymphocytes B et T activés	HCL en combinaison avec CD103, CD11c, rares LPL ,MZL,MCL,MW
CD27	Marqueurs d'activation des lymphocytes T, Lymphocytes B mémoire	CLL, SLVL ,MZL ,MW
CD38	Cellules centrofolliculaires, cellules T immatures, plasmocytes.	Différenciation plasmocytaire, marqueurs pronostique dans CLL
CD43	Lymphocyte T et minorité de lymphocytes B	Expression aberrante dans CLL, rares MCL et ZML
CD45	Marqueurs panleucocytaire	Interet pour la distinction entre les hémopathies matures et immatures
CD49d	Lymphocytes B,T, NK ,monocytes ,plasmocytes	Marqueurs pronostic dans CLL
CD79b	Précurseurs B, Plasmocytes, expression variable sur lymphocytes B	Marqueurs de la lignée B, faible intensité d'expression dans CLL
CD81	Lymphocytes B et T	Intérêt diagnostique dans le MM , rôle MRD CLL
CD103	Minorité de lymphocytes B	HCL et rares MZL
CD200	Macrophages, cellules dendritiques, mastocytes , lymphocytes	Diagnostic différentiel CLL/MCL, intérêt diagnostique dans MM
FMC7	Lymphocytes B matures	Diagnostic différentiel CLL/MCL et autres syndromes lymphoprolifératifs CD5+
Bcl-2	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	FL
ZAP-70	Lymphocytes T, NK , précurseurs B	Marqueurs pronostique dans CLL
CD160	Lymphocytes NK et TCD8	HCL

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

6. Fluorochromes :

Lorsque l'on irradie une substance, les photons impliqués provoquent le déplacement de certains électrons du cortège électronique de la molécule, vers un niveau d'énergie supérieur. Cet état d'énergie est instable et, plus ou moins rapidement, les électrons reviennent à leur niveau d'énergie original. L'excès d'énergie peut alors être dissipé sous différentes formes, en particulier la chaleur. Dans le cas des fluorochromes, une partie de cette énergie est dissipée sous la forme de lumière.

La fluorescence se définit donc comme la luminescence émise par certaines molécules (fluorochromes), résultant de l'absorption de lumière à une certaine longueur d'onde, et ré-émission presque instantanée de lumière à une longueur d'onde plus grande.

L'ensemble du phénomène est schématisé dans le diagramme de Jablonski [73].

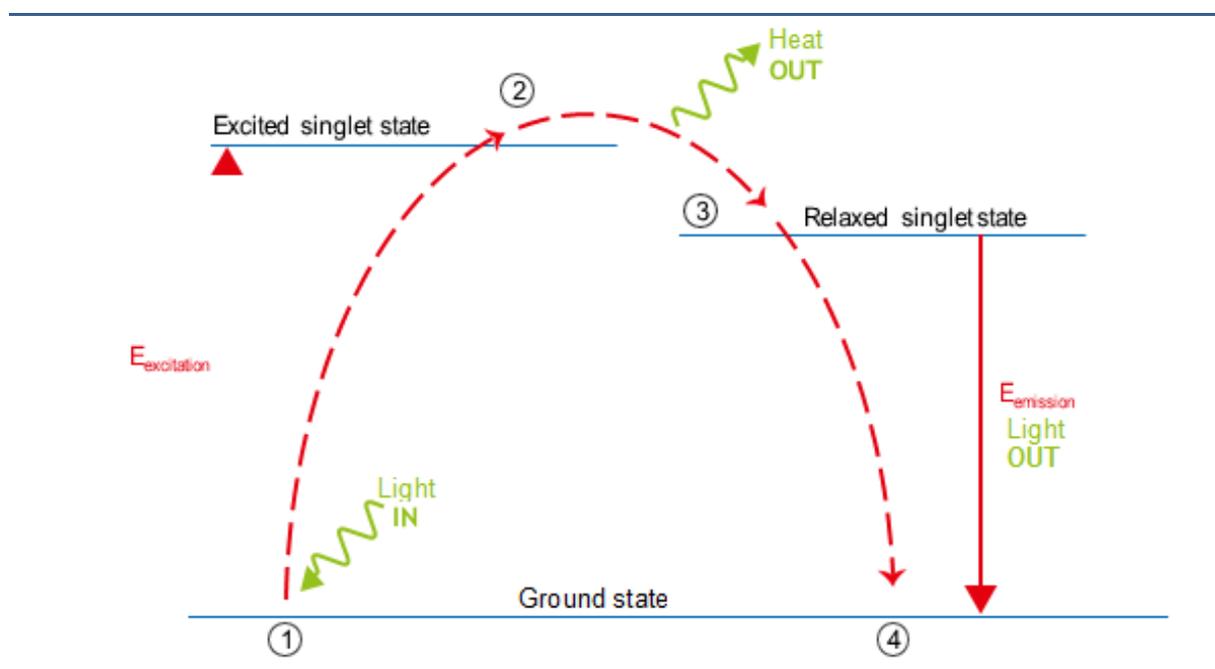


Figure 20. Diagramme de Jablonski

1. Absorption d'énergie lumineuse par une molécule
2. Passage à l'état de molécule excitée
3. Relaxation partielle avec perte de chaleur par échange avec le milieu ambiant
4. Retour à l'état fondamental avec émission lumineuse

6.1. Caractéristiques spectrales :

On retiendra que l'intensité de la fluorescence est directement liée à l'intensité de l'excitation, mais également aux capacités d'absorption du fluorochrome à la longueur d'onde choisie.

Chaque fluorochrome est caractérisé par un spectre d'absorption (ou d'excitation) et un spectre d'émission de fluorescence. C'est en se référant à ces spectres que l'utilisateur va pouvoir choisir d'une part la raie laser la plus efficace pour l'excitation, autrement dit celle située de plus près possible du pic du spectre d'absorption, et d'autre part le filtre le mieux adapté pour une collection spécifique de sa fluorescence [43].

Le FITC (isothiocyanate de fluorescéine), par exemple, absorbe la lumière dans la plage allant de 400 à 550 nm, mais plus la longueur d'onde est proche de 490 nm (son pic ou son maximum), plus l'absorbance est grande. À son tour, plus le nombre de photons absorbés est élevé, plus l'émission de fluorescence est intense.

6.1.1. Spécificité :

La spécificité est la caractéristique principale des fluorochromes, qui permet la détection d'un constituant cellulaire particulier.

Tableau 6. Exemple de spécificité de fluorochrome [43].

Organites	Marqueurs
ADN	Bromure d'éthilium, Iodure de propidium, DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Acridine orange, Mytramincine
ARN	Pyronine Y, Acridine Orange
Mitochondries	Acridine orange 10-nonyl bromide, Rhodamine 123, MitoTracker Red , MitoTracker green
Protéines (conjugaison à des anti-corps)	FITC , TRITC, Texas Red, Phycoerythrine, Cyanine 3, Cyanine 5

6.1.2. Accessibilité :

A l'exception des fluorochromes dits (vitaux), la plupart d'entre eux est incapable de pénétrer dans des cellules vivantes. C'est pourquoi une étape de fixation est souvent requise préalablement au marquage de cibles intracellulaires. Suivant le type de fixateur utilisé, une étape de perméabilisation est parfois nécessaire.

6.1.3. Toxicité :

Dans le cas d'étude de cellules vivantes, il est fondamental de prendre en compte les effets toxiques éventuels des fluorochromes utilisés. Ils peuvent entraîner des perturbations fonctionnelles de la cellule, immédiates ou à plus long terme.

Les effets sur la viabilité et le cycle cellulaire sont parmi les plus couramment décrits et sont généralement liés à la concentration extracellulaire et intracellulaire du fluorochrome, au temps de marquage et à la durée de rétention dans la cellule.

6.1.4. Photo-destruction :

L'excitation d'un fluorochrome n'est pas sans conséquence pour la molécule. Le phénomène excitation/ émission induit par le rayonnement provoque une usure de la molécule qui progressivement, en fonction de la quantité d'énergie absorbé, ne sera plus capable de réagir, autrement dit d'émettre une fluorescence. Ce phénomène est connu sous le nom de photoblanchiment (photobleaching ou fading). Cependant, contrairement à la microscopie de fluorescence ou il peut nuire à une observation de longue durée, il n'a pas de conséquence en CMF ou le temps d'exposition est infime (quelques microsecondes).

6.1.5. Transfert d'énergie (tandems de fluorochromes) :

Dans le cas d'une analyse multiparamétrique, on cherche à mesurer simultanément plusieurs protéines ou compartiments subcellulaires. Pour cela, il est nécessaire que ces différents éléments se distinguent par des émissions de fluorescence différentes.

Un tandem est composé de 2 molécules fluorescentes attachées de manière covalente, l'une servant de donneur et l'autre d'accepteur, quand la molécule donneuse est excitée, elle transfère son énergie à la molécule accepteuse qui émet de la fluorescence. Le tandem se comporte alors comme un fluorochrome unique avec les propriétés d'excitation du donneur et les propriétés d'émission de l'accepteur (tableau 7).

Tableau 7. Exemple de tandems [43]

Fluorochromes associés	Excitation (nm)	Emission (nm)
Phycoérythrine / Texas red	488	618
Phycoérythrine/ Cyanine 5	488	660-670
Phycoérythrine/ Cyanine 7	488	>750
Allophycocyanine/ Cyanine 7	633	>750

6.2. Compensation de fluorescence :

Une considération à prendre en compte lors de la réalisation d'études de fluorescence multicolore est la possibilité d'un chevauchement spectral. Lorsque deux fluorochromes ou plus sont utilisés au cours d'une même expérience, il est possible que leurs profils d'émission coïncident, ce qui rend difficile la mesure de la fluorescence réelle émise par chaque fluorochromes. Cela peut être évité en utilisant des fluorochromes à des extrémités très différentes du spectre, par exemple. Alexa Fluor® 405 et Phycoérythrine; Cependant, ce n'est pas toujours pratique.

Il est donc indispensable de corriger cette fuite spectrale afin de pouvoir mesurer la fluorescence spécifique de la molécule d'intérêt. Dans ce cas, une soustraction mathématique est possible grâce à l'utilisation de matrices de compensation, aujourd'hui automatisable avec la nouvelle générations des cytomètres. Cette étape indispensable et cruciale dans le réglage du cytomètre requiert des échantillons contrôles adaptés, appelés « mono-marqués », qui permettent d'évaluer cette fuite spectrale sur chaque détecteur.

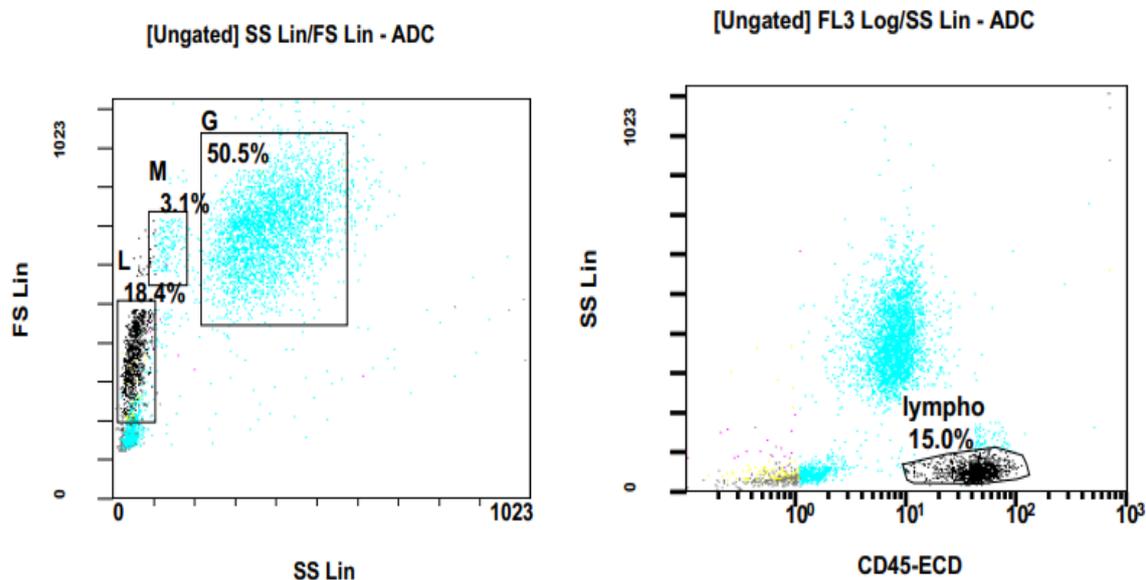
6.3. Principaux fluorochromes utilisés :

Tableau 8. Principaux fluorochromes utilisés [74].

Fluorochrome	Excitation	Émission	Fluorescence
FITC (Isothiocyanate de fluorescéine)	468-505	504-541	
PE (Phycoérythrine)	468-575	568-590	
ECD (Energy Coupled Dye ou Phycoérythrine Texas Red)	468-575	610-635	
PC5 (Phycoérythrine Cyanine 5)	468-575	660-680	
PC7 (Phycoérythrine Cyanine 7)	468-575	735-775	
APC (Allophycocyanine)	633-635	650-680	

7. Interprétation des résultats :

Une fois que les signaux optiques sont convertis de façon proportionnelle en signaux électroniques puis en chiffres, les données sont stockées dans l'ordinateur sous forme de fichier FCS (flow cytometry standard). Le fichier représente une liste de valeurs numériques de chaque paramètre étudié pour chaque cellule analysée (Figure 21).



File:- 119662control 271.LMD												
Gate:- Ungated												
Compensation:- Advanced												
Filename:- 119662control 271.LMD												
Mean Calculation Method:-LOG-LOG												
Region	Abs Count	Number	%Total	%Gated	X-Median	X-Mean	X-CV	X-HPCV	Y-Median	Y-Mean	Y-CV	Y-HPCV
ALL	9043	12182	100.00	100.00	330	347	84.93	0.00	586	547	39.15	0.00
ALL	9043	12182	100.00	100.00	8.95	90.7	0.00	0.04	330	347	84.93	0.00
ALL	9043	12182	100.00	100.00	8.95	90.7	0.00	0.04	586	547	39.15	0.00
CAL	988	1331	10.93	10.93	671	677	0.00	0.04	477	488	11.07	0.23
G	4567	6152	50.50	50.50	373	380	19.72	2.72	698	696	13.39	0.17
L	1662	2239	18.38	18.38	52	54.6	30.26	26.57	347	345	25.15	0.88
lympho	1355	1825	14.98	14.98	43.2	44.7	0.00	0.54	53	56	30.88	19.07
M	281	378	3.10	3.10	132	134	16.97	1.23	639	639	7.95	0.14

Figure 21. Exemple de fichier FCS et représentation graphique correspondante

Les données peuvent être représentées sous forme :

- l'histogramme FS/SS
- l'histogramme SS/ α -CD45
- les histogrammes monoparamétriques
- les histogrammes biparamétriques.

L'histogramme FS/SS : Sur cet histogramme, les cellules sont réparties selon leur granularité en abscisse (SS) et selon leur taille en ordonnée (FS).

Il permet une visualisation de la répartition des différents types de leucocytes (Figure 22).

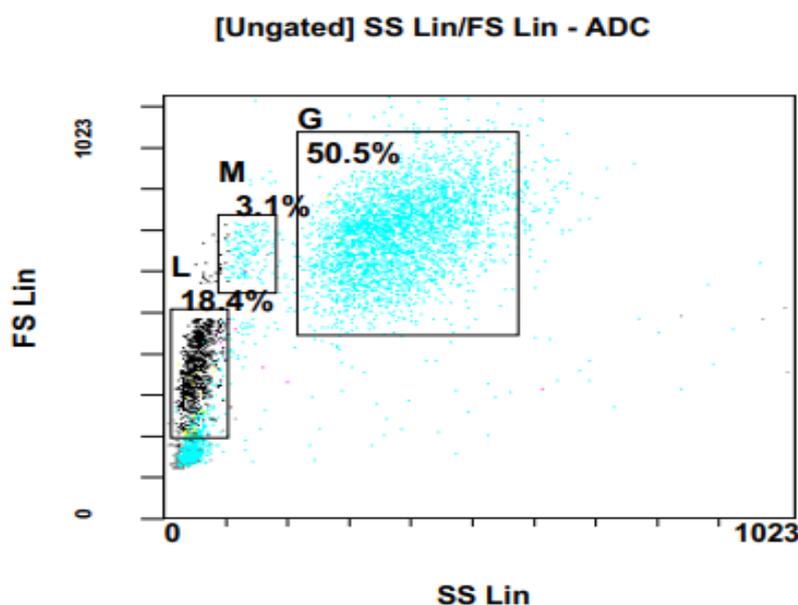


Figure 22. répartition des différents types leucocytaires FS/SS

L : Lymphocytes M : Monocytes G : Granulocytes

L'histogramme SS/CD45:

Cet histogramme s'établit selon deux paramètres, la granularité de la cellule (SS) et l'intensité de la fluorescence des cellules à CD45 (Figure 23).

L'axe des ordonnées correspond au SS avec une échelle linéaire, celui des abscisses à la fluorescence de CD45 marqué au Krome orange (ECD)

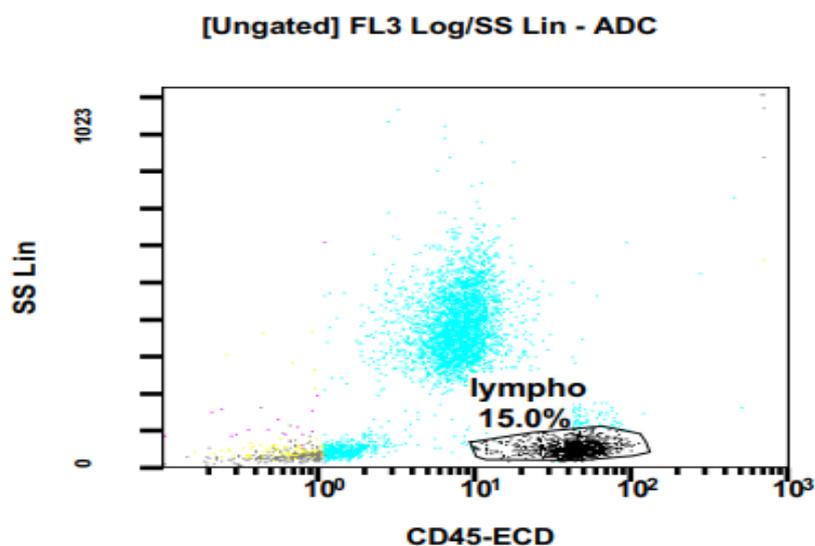


Figure 23. Représentation bi-paramétrique SS/CD45

Le « gating » ou fenêtrage des leucocytes :

Toutes les cellules hématopoïétiques expriment le CD45 au cours de leur développement. L'expression du CD45 va persister sur les leucocytes tout au long de leur vie à l'exception des plasmocytes tandis que les érythrocytes et les plaquettes perdent l'expression de ce marqueur au cours de leur différenciation [75].

En regardant le niveau d'expression du CD45 en association avec le SS, les différentes lignées cellulaires peuvent être identifiées (figure 23) ;

- Les lymphocytes sont caractérisés par l'intensité la plus forte du CD45 et le signal le plus faible en SSC.
- La lignée érythrocytaire est caractérisée par la négativité du CD45 et un faible signal en SSC
- Les monocytes montrent une expression du CD45 un peu plus faible que celle des lymphocytes et des caractéristiques intermédiaires en SSC entre les lymphocytes et les cellules myéloïdes.
- Enfin, les cellules granuleuses sont caractérisées par les signaux les plus intenses en SSC et une expression faible du CD45.

Sur la base des histogrammes FS/SS et SS/CD45 (Figure 22 ,23), l'utilisateur peut décider d'effectuer un gating. Ce dernier cible la population à analyser.

Après un « gating », il est possible de conditionner les graphiques afin que les résultats obtenus ne portent que sur la population sélectionnée. Des gating successifs peuvent être réalisés (figure 24).

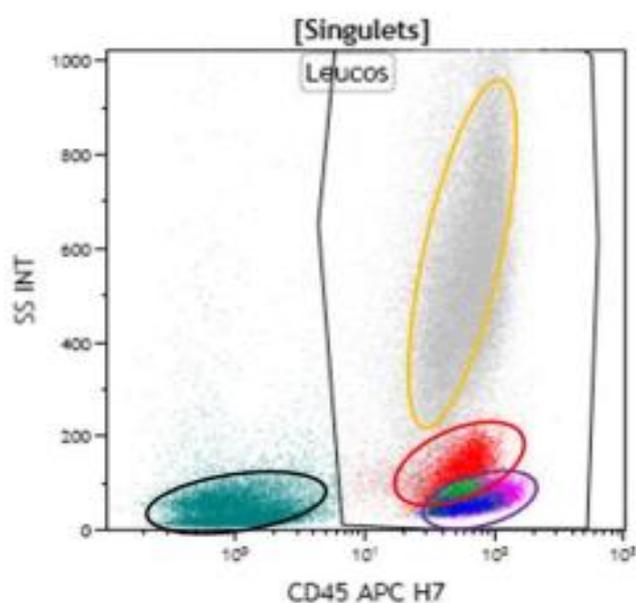


Figure 24. Gating des différents éléments dans le sang total

Jaune : cellules granuleuses

Rouge : monocytes

Violet : lymphocytes

Noir : érythrocytes et débris

Les histogrammes monoparamétriques :

Les histogrammes monoparamétriques donnent une information sur un seul paramètre. Sur l'axe des abscisses se trouvent l'intensité de la fluorescence (échelle logarithmique) et sur l'axe des ordonnées se trouvent le comptage cellulaire. Chaque cellule analysée est ensuite répartie dans différents canaux. Les histogrammes monoparamétriques donnent une représentation de la population.

L'image ci-dessous est un exemple d'histogramme monoparamétrique. Sur ce dernier, on s'intéresse au CD43 (figure 25). Pour cela, on a utilisé un CD43 couplé au fluorochrome FITC, 100% de la population cellulaire testée est positive au CD43. Sur l'image, le trait horizontal AW définit la « zone positive ». Cette dernière commence à l'endroit où s'arrête la « zone négative », fixée au début de l'analyse grâce au contrôle isotypique.

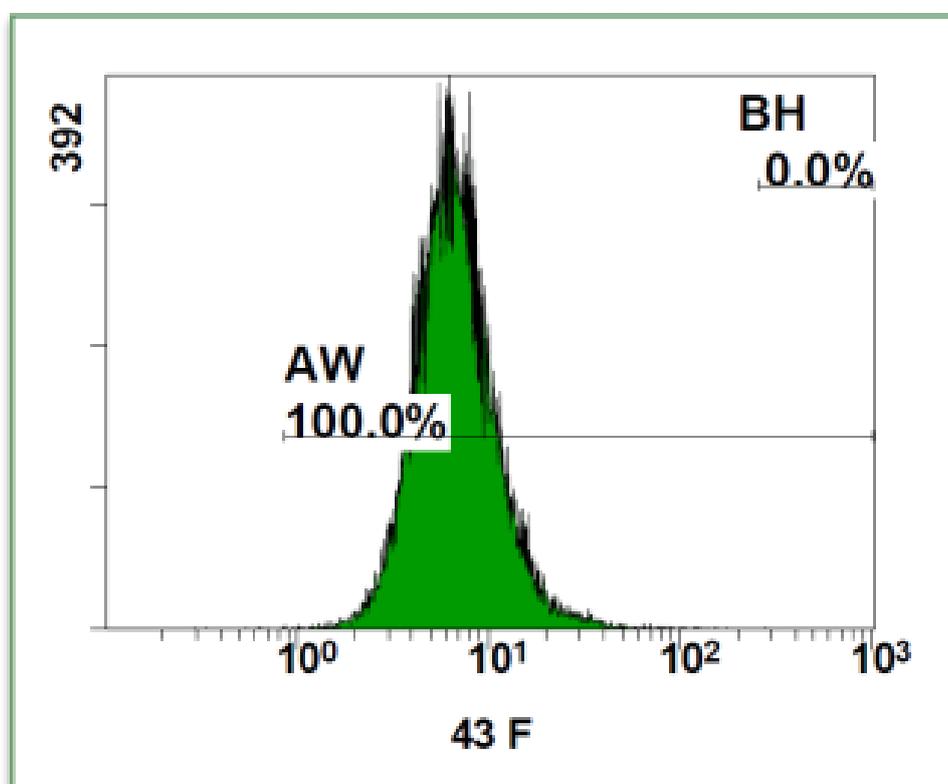


Figure 25. Représentation monoparamétrique

Les histogrammes biparamétriques :

Les histogrammes biparamétriques renseignent sur deux paramètres. Sur l'axe des abscisses se trouve l'intensité de fluorescence de l'un des 2 paramètres étudiés et sur l'axe des ordonnées, l'intensité de fluorescence du second paramètre étudié. Ces histogrammes biparamétriques sont très utiles car ils permettent d'analyser la co-expression cellulaire de deux marqueurs. Un histogramme biparamétrique n'est en fait que la « combinaison » de deux histogrammes monoparamétriques.

L'interprétation d'un histogramme biparamétrique se fait de la manière suivante : Les éléments se trouvant dans le carré en bas à gauche sont négatifs pour les 2 paramètres testés. A l'inverse, les éléments se trouvant dans le carré en haut à droite sont doublement positifs. Dans les carrés en haut à gauche et en bas à droite, les éléments sont positifs pour l'un des deux paramètres uniquement. Par exemple, si l'on se réfère à la (Figure 26), 94.8% des cellules testées sont positives uniquement pour le CD19.

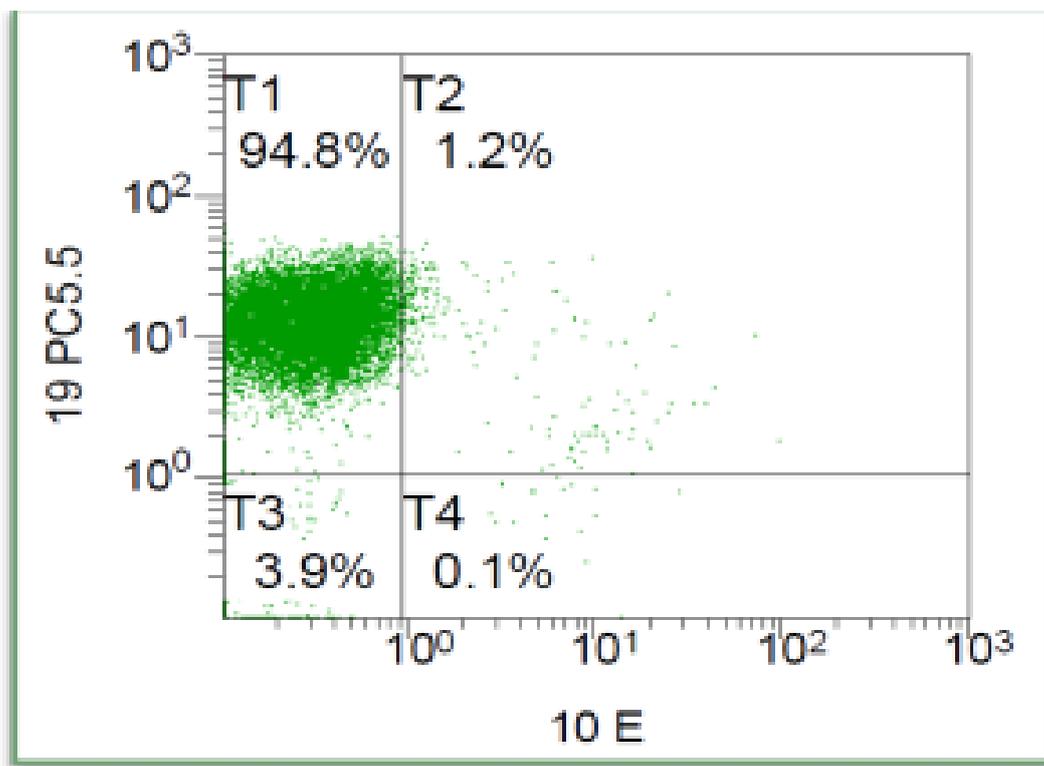


Figure 26. Représentation bi paramétrique

C. Application de la cytométrie en flux en hématologie :

L'intérêt de la cytométrie en hématologie réside dans l'analyse des cellules hématopoïétiques : elle permet d'identifier les principales lignées et, au sein de ces lignées, de reconnaître et de compter différentes sous-populations caractérisées par leurs niveaux de maturation, d'activation ou leurs propriétés fonctionnelles [76]. Elle représente donc un outil fondamental, en routine diagnostique ou en recherche, pour l'étude de l'hématopoïèse normale et pathologique.

1. Rôle de la cytométrie en flux dans le diagnostic des SLPC-B

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

L'analyse des lymphocytes B par CMF, commence par l'identification de la population lymphocytaire B (CD19+), l'affirmation de la clonalité et enfin la caractérisation détaillée de la population pathologique.

2. Etudes de la population B clonale par CMF

2.1. Repérage des lymphocytes B matures :

Le CD20 est la première molécule historiquement décrite et utilisée dans la caractérisation des lymphocytes B. La découverte de plusieurs antigènes pan-B comme le CD19, CD22, CD79a et le CD79b a permis de mieux cerner la population des lymphocytes B [77].

La plupart des cellules B matures expriment le CD20. L'expression du CD20 est plus restrictive que celle du CD19. En effet, le CD19 est présent tout au long de la maturation du lymphocyte B à partir du lymphoblaste jusqu'au plasmocyte et met en évidence les lymphocytes B immatures. Malheureusement, certaines hémopathies B expriment faiblement le CD20 ou le CD19, ce qui rend difficile leur identification d'appartenance de lignée et nécessite la présence d'autres marqueurs de malignité pour aboutir au diagnostic. Par exemple, le CD19 est faiblement exprimé dans le lymphome folliculaire alors que le CD20 est fortement exprimé. Inversement le CD20 est faiblement exprimé dans la LLC. La détermination de valeurs de référence d'intensité est donc un prérequis pour l'interprétation phénotypique. L'utilisation du CD19 reste la plus courante pour fenêtrer la population lymphocytaire B [78.79].

Le marqueur CD19 est spécifique des lymphocytes B. Il n'est pas présent sur les lymphocytes T ou NK, ni sur les autres leucocytes.

Les valeurs usuelles des populations lymphocytaires dans le sang périphérique de l'adulte sont :

- 70% de lymphocytes T (CD3+) soit 500 à 2500/ μ l, dont :
 - 45% de lymphocytes T CD4+ soit 500 à 1200/ μ l
 - 25% de lymphocytes T CD8+ soit 230 à 900/ μ l
- 15% de lymphocytes B (CD19+) soit 100 à 600/ μ l
- 15% de lymphocytes NK (CD16/56+) soit 140 à 700/ μ l

Tableau 9. Marqueurs de différenciation lymphoïdes B [43]

STADE	Précurseur B			Lymphocyte B				Plasmocyte
	Pro-B Précoce	Pro-B tardive	Pré-B	B Immature	B Naïf	B activé	B mémoire	
CD34								
HLA-DR								
CD19								
CD40								
CD79								
CD22								
CD20								
CD21								
CD10								
IGM								
IGD								
A ou G								
K ou λ								
CD38								
CD27								
CD138								

2.2. Restriction isotypique des chaînes légères :

Physiologiquement deux tiers des lymphocytes B présentent une immunoglobuline de surface composée d'une chaîne légère Kappa et un tiers d'une chaîne légère Lambda. Ce ratio κ/λ est constant et ne varie pas en cas d'hyperlymphocytose réactionnelle.

Contrairement aux populations de lymphocytes B normales ou réactionnelles, les clones de SLPC B matures sont caractérisés par une restriction isotypique (Kappa ou Lambda). On suspecte la présence d'un clone de lymphocytes B avec des chaînes kappa si le rapport kappa /lambda est supérieur à 3 et un clone de lymphocytes B avec des chaînes lambda s'il est inférieur à 1.

L'étude de la restriction des chaînes légères doit être corrélée à un antigène de lignée cellulaire B comme le CD19 ou CD20, et nécessite un lavage préalable de l'échantillon afin d'éliminer les immunoglobulines circulantes qui pourraient interférer avec l'analyse. L'utilisation de ce seul caractère de restriction des chaînes légères peut être insuffisante en cas d'un faible clone circulant. Le paramètre de taille par exemple est intéressant dans ce sens, car certains cellules malignes se différencient clairement des cellules normales par leur taille, cette même approche peut s'utiliser en ciblant une population sur des critères phénotypique tels que la combinaison avec des marqueurs aberrants de lignée lymphoïde B comme le CD5 qui permet de mettre en évidence de petites populations clonales qui se détachent de la population normale lymphocytaire B. Ceci est utile notamment dans la détection de clone qui exprime très faiblement les chaînes légères, les marqueurs CD20, CD22, CD79b dans la LLC, qui sont probablement causées par une faible densité de récepteurs B à la surface membranaire. Dans la leucémie à tricholeucocytes, les cellules malignes sont souvent très rare et ne modifient pas le rapport kappa /lambda des lymphocytes B, il est préférable alors de les rechercher par leur phénotype spécifique (CD19+CD103+CD25+CD11c+) [43].

2.3. Marqueurs aberrants de la population clonale :

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

L'expression du CD5 est souvent associée un phénotype aberrant, mais dans de rares cas il existe des personnes porteuses de maladies auto-immunes qui développent des cellules B non tumorales porteuses du CD5. L'expression du CD5 doit donc être interprétée en présence

d'autres marqueurs, en particulier la restriction des chaînes légères et les intensités anormales des CD20, CD22 et CD79b.

L'immunophénotypage permet également de :

- Rechercher des marqueurs pronostiques de la maladie, comme le CD38 ou l'expression de ZAP70 dans la LLC [78].
- L'utilisation de différents marqueurs de maturation qui permet de déterminer le stade de maturation du clone pathologique. Le plus important est le CD10 qui est exprimé par les cellules B immatures et les lymphocytes B de la zone folliculaire du centre germinatif des ganglions, d'où l'expression forte du CD10 dans les Lymphome Folliculaire. Les cellules B matures ont une faible expression du CD10.

3. Immunophénotypage des SLPC-B par CMF :

Plusieurs groupes nationaux et internationaux travaillent sur l'élaboration de recommandations, concernant aussi bien le choix des antigènes à rechercher que les méthodes de standardisation inter-laboratoires (Groupe d'étude immunologique des leucémies ou GEIL, ELN, Euroflow, etc.) de nombreux marqueurs pouvant être utilisés pour le diagnostic des SLPC-B [80].

La construction du panel d'anticorps d'exploration des SLPC-B est complexe. En général, un premier panel composé de quelques anticorps permet la mise en évidence d'une éventuelle population clonale (« tube d'orientation »). Si la recherche s'avère positive, un panel étendu est élaboré, permettant de rechercher le stade maturation, la présence d'aberrations phénotypiques et de révéler des expressions caractéristiques d'une entité. L'analyse morphologique de la population lymphocytaire reste indispensable et doit être simultanée à la réalisation de l'immunophénotypage. Cette étude morphologique doit être réalisée par un cytologiste expérimenté, car elle peut également orienter le panel d'anticorps du fait de la présence de cellules caractéristiques comme les tricholeucocytes. L'interprétation conjointe de la cytologie et de l'immunophénotypage est indispensable, car elle permet de détecter les résultats faussement négatifs obtenus en CMF causés par un fenêtrage incorrect des données cytométriques.

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

- CD5+ / CD10- : représenté majoritairement par la LLC et le LM ;
- CD5- / CD10+ : plus souvent pour le LF ;
- CD5- / CD10- : majoritairement représenté par le LMZ, LT ;
- CD5+ / CD10+ : co-expression rare.

Cette séparation en quatre groupes se rapproche de la pratique quotidienne d'interprétation des phénotypes des SLP-B, mais l'addition de marqueurs supplémentaires ainsi que l'étude cytologique, génétique, et anatomopathologique conduisent à un diagnostic plus précis [78].

3.1. Caractéristique immunophénotypique des SLPC-B CD5+/CD10- :

3.1.1. Leucémie lymphoïde chronique :

La LLC est un des SLPC-B le mieux défini en CMF, notamment par la présence de score de Matutes (Tableau 2). Il permet d'éliminer les diagnostics des autres SLPC-B quand celui-ci est supérieur ou égal à 4. Il se base sur cinq marqueurs : CD5, CD23, FMC7, CD79b et l'expression des immunoglobulines de surface.

Les faibles niveaux d'expression du CD20, CD79b et des Ig de surface par rapport aux lymphocytes B normaux sont caractéristiques et en faveur de la LLC. Le CD5 et le CD23 est quasiment toujours exprimé (environ 95%) dans les LLC [81.82.83].

Les cas de LLC avec un Score de Matutes à 3 points sont soit des LLC avec un profil immunologique atypique, soit un autre SLP-B. Ils nécessitent donc des investigations complémentaires comme l'ajout de nouveaux marqueurs comme le CD200, CD180 [84].

Certains marqueurs complémentaires ayant un impact pronostique peuvent être réalisés comme le CD38 et le ZAP70 même si leur interprétation en cytométrie reste délicate car il n'existe pas de valeur seuil d'expression et par le manque de standardisation de la méthode de détection [72. 74. 85].

Le CD23 est une glycoprotéine transmembranaire qui peut être clivée en fragments solubles et dosée en CMF. Un taux élevé de CD23 solubles serait lié à un mauvais pronostic, et associé à des infiltrations médullaires et à un temps de doublement de la lymphocytose court [74.86].

3.1.2. Le lymphome du manteau :

Les cellules du LM expriment les antigènes B pan-cellulaires CD19, CD20, CD22 (expression forte ou moyenne). Elles sont positives pour le CD5 (90% des cas) [74], le FMC7 avec des Ig de surface d'expression moyenne ou forte et généralement négative pour le CD23 et le CD10. Le LM a un phénotype plus variable contrairement à la LLC et nécessite des études complémentaires morphologiques et génétiques afin de mettre en évidence la translocation t (11;14).

Une étude récente a démontré la présence de LLC « atypiques » (LLC-a) ayant un immunophénotypage « typique » de LM. Selon cette étude, 32% des phénotypes de LM ne comportaient pas de translocation t (11;14) et présentaient des caractéristiques génétiques

généralement retrouvées dans les LLC-a. Ces cas de LLC-a avaient une expression forte de CD20 et des Ig de surface [87].

3.1.3. La leucémie prolymphocytaire :

Le phénotype des prolymphocytes est celui d'une cellule B mature, CD22 /CD79b+, CD23/CD10- . Le CD5 est exprimé dans 20 à 30 % des cas et le CD23 dans 10 à 20% avec une expression faible, le CD11c et le CD25 plus rarement [88].

Le CD79b et l'expression des chaînes légères seraient les marqueurs les plus discriminants pour différencier la LPL-B du LM et de la LLC.

3.2. Caractère immunophénotypique des SLPC-B CD5- /CD10+ :

Cette catégorie est la plus représentée par le LF, le CD10 est quelque fois présent dans d'autres SLPC-B mais de façon très rare comme dans la LT.

3.2.1. Le lymphome folliculaire :

La présence du CD10 est caractéristique du LF et dans la majorité des cas le CD5, le CD23 et le CD43 sont négatifs et permettent d'éliminer une LLC. Les cellules du LF sont typiquement CD10+, CD5-, FMC7+, mais il existe de rares cas de LF exprimant le CD5 [89].

3.3. Caractère immunophénotypique des SLPC-B CD5- /CD10- :

3.3.1. La leucémie à tricholeucocytes :

Les tricholeucocytes ont un profil phénotypique spécifique qui permet une caractérisation aisée par CMF. Classiquement, ce sont des cellules B matures caractérisées par un profil immunophénotypique distinct : CD20+, CD22+, CD11c+, CD25+, CD103+, CD123+, FMC7+ et des Igs de surface d'expression moyenne à forte. Le CD5, le CD23 et le CD10 sont le plus souvent négatifs.

L'immunophénotypage de la LT est caractérisé par quatre marqueurs positifs : CD11c, CD25, CD103 et CD123 qui permettent de la distinguer des autres hémopathies ayant des cellules villeuses ou chevelues comme la LTV ou le SLVL.

Les recommandations de SFH préconisent de tester les CD11c, CD25, CD103 en première intention puis si un de ces marqueurs est négatif il faut ajouter le CD123 afin de calculer le score associé aux LT [90].

3.3.2. Le lymphome de la zone marginale :

Les différentes entités regroupées sous le terme de lymphome de la zone marginale (LZM) ont des caractéristiques phénotypiques communes mais n'ont pas de marqueur spécifique. Les cellules lymphomateuses sont généralement fortement positives pour les marqueurs pan-B et peuvent exprimer le CD11c et le CD103 mais 'intensité plus faible que les

tricholeucocytes [91]. Elles sont le plus souvent CD5/CD23-. Cependant, il existe des formes CD5+ ce qui peut rendre le diagnostic particulièrement difficile.

3.3.3. Lymphome lymphoplasmocytaire :

Dans les cas de MW avec un clone B circulant, le phénotypage met en évidence une expression forte des Ig de surface ainsi que des marqueurs pan-B CD19, CD20, CD22 (faible), CD79b, FMC7. Le score de Matutes est, dans la majorité des cas, inférieur à 3. Le CD5 est d'expression variable (5 à 10%) mais le plus souvent négatif. Le phénotype CD5-, CD23- et CD10- est observé dans 60 à 80% des cas. Le CD25 est exprimé dans la majorité des cas, et le CD11c dans 30% des cas. Contrairement aux plasmocytes du myélome, les cellules n'expriment ni le CD38, ni le CD56 [42. 92].

Tableau 10. Profil immunophénotypique dans la maladie de Waldenström [9].

Marqueurs	Protéines	%	Remarque
Clonalité	IgM Surface+++	100	Expression élevé
	Chaîne légère Ig		K > λ
Phénotype B	CD19/CD20	100	
	CD22	100	Faible intensité
	CD79	100	
	FMC7	> 85	
	CD5/CD19	10 à 27	Faible intensité
	CD23	14 à 33	Faible intensité
	CD10	<10	
Plasmocyte	CD38	0 à 60	Variabilité importante selon les études
	CD138	<10	
Lymphocyte mémoire	CD27	42	
Autres	CD25	90 à 100	Expression homogène
	CD103	0	Constamment négatif
	CD11c	0 à 31	Faible niveau d'expression
	CD52	100	Constamment positif

3.4. Caractère immunophénotypique des SLPC-B CD5+ / CD10+ :

La coexpression du CD5 et du CD10 est rare, elle est plus souvent associée à une expression aberrante d'un des deux CD. La morphologie ainsi que la cytogénétique apportent des informations complémentaires afin de différencier ces entités.

4. Revue de littérature sur l'expression des différents marqueurs selon chaque entité:

4.1.Principales caractéristiques phénotypiques des SLPC-B :

Tableau 11. Caractéristiques phénotypiques des SLPC-B [74]

	LLC	LPL-B	LCM	FL	LZM	LT	SLVL	MW
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	±	+	-	-/+	-	-/+	-
CD23	+	-	-	-/+	-	-	-/+	-
Igs	Faible ou -	++	++	++	++	+++	+++	Faible à moyenne
CD43	++	-	-/+	-	-	-/+	-	-
FMC7	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	±
CD22	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	+
CD10	-	-/+	-	±	-	-/+	-	-
CD103	-	-	-	-	-/+	+	+	-
CD11c	-/+	-	-	-	±	+	-	-
CD25	-/+	-	-	-	±	+	+	-
CD79b	Faible ou -	+	+	+	+	+	++	+
CD20	Faiblement +	+	+	+	+	++	++	+

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

4.2. Récapitulatif d'immunophénotypage et classification des SLPC-B:

Tableau 12. Classification des SLPC-B [72]

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

Partie II :
Diagnostic immunophénotypique des
SLPC-B par CMF

A. Caractéristique clinico-biologique des SLPC-B :

1. Objectif :

La caractérisation du clone en CMF répond à plusieurs objectifs, le premier étant sa classification selon les critères de L'OMS. D'autres antigènes sont recherchés parce qu'ils représentent des marqueurs pronostics ou parce qu'ils sont importants dans les choix thérapeutiques ; enfin, certaines caractéristiques phénotypiques sont spécifiques des cellules tumorales et représentent un outil d'identification lorsque ces cellules sont rares au sein de lymphocytes normaux.

2. Matériels et méthodes :

Il s'agit d'une étude de validité diagnostic avec un recrutement rétro-prospective à propos de 126 cas, réalisé au laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès. Cette étude concerne tous les patients chez qui un SLPC-B a été diagnostiqué entre **le premier septembre 2015 et le premier janvier 2020**.

Une fiche d'exploitation pour chaque patient permet la recherche des données épidémiologiques, essentiellement l'âge et le sexe, les données cliniques (syndrome tumoral) et les données biologiques qui comportent essentiellement le taux d'hémoglobine et la numération leucocytaire dont le taux de lymphocytes par la réalisation d'hémogramme suivi d'une coloration au May-Grunwald Giemsa pour étudier la morphologie cellulaire au microscope et pour orienter le panel d'anticorps préconisé pour le diagnostic des SLPC-B.

L'immunophénotypage lymphocytaire est réalisé sur un cytomètre de flux FC500 BECKMAN COULTER, 5 couleurs (figure 26), qui est capable d'analyser simultanément jusqu'à 7 paramètres, par marquage direct après l'étape de préparation des échantillons pour isoler la population d'intérêt.



Figure 27. Cytomètre en flux FC500 BECKMAN COULTER

2.1. Protocole d'analyse cytométrique des SLPC-B :

2.1.1. Prélèvement :

a. Sang périphérique :

Le prélèvement est obligatoirement effectué sur anticoagulant, par ponction veineuse : EDTA et héparinate de lithium sont recommandés pour l'immunophénotypage. Il est important de vérifier la qualité du prélèvement avant toute technique, en particulier l'absence de caillot. Celui-ci doit être analysé dans les 24 heures pour des résultats optimaux, et conservé à température ambiante.

b. Moelle osseuse :

Le prélèvement est réalisé par aspiration au trocart au niveau du sternum ou de la crête iliaque : il est recommandé de ne conserver que les premiers millilitres pour limiter l'hémodilution. Les grains qu'on y trouve habituellement doivent être dissociés doucement avec une pipette afin de récupérer les cellules hématopoïétique qu'ils contiennent. Les conditions de recueil et de transport sont identiques à celles utilisées pour le sang.

2.1.2. Préparation de l'échantillon :

En dehors du sang total et de la moelle osseuse totale, il est habituel de laver les échantillons, en particulier pour concentrer les cellules et éliminer les débris cellulaires.

Le traitement du tube avec lavage :

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

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.

Marquage des lymphocytes B:

Le marquage se fait par incubation des cellules prétraité (50 µL) dans chaque tube, avec l'anticorps monoclonaux (10 µL) pendant 15 à 30 minutes, à température ambiante et à l'obscurité.

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, CD20, CD22, CD43, CD38 et CD25
- en cas de suspicion d'une leucémie à tricholeucocytes : CD11c, CD25, CD103 et CD123

Lyse érythrocytaire:

Tous les tubes subissent une lyse érythrocytaire :

- 2mL de solution de lyse (Versalyse) puis mélange par agitation rotative ;
- Incubation de 10 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- Centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes puis élimination du surnageant ;

- Reprise du culot avec 2mL de PBS puis mélange par agitation rotative ;
- Centrifugation à 1200 tours/minute pendant 5 minutes puis élimination du surnageant ;
- Reprise du culot avec 2mL de PBS puis mélange par agitation rotative.

Technique d'analyse de la monoclonalité kappa /lambda : voire annexe 1

L'étude de la restriction isotypique est nécessaire pour définir la présence d'un clone malin, par la mise en évidence d'une prolifération monoclonal type kappa ou lambda.

Techniquement, l'analyse des chaînes légères des immunoglobulines nécessite quelques précautions car la recherche d'une restriction isotypique est réellement l'élément clé de l'identification du caractère homogène d'une population.

2.2. Aquisition et traitement de données :

Les cellules sont généralement passées avec un seuil en FSC éliminant les cellules mortes, les plaquettes et les stromas d'hématies, mais il peut être positionné sur n'importe quel autre paramètre (par exemple sur un marqueur CD45 ne sauvegarder que les leucocytes). Les informations cytométriques sont traitées et analysées par le logiciel CXP software.

Le tube d'orientation permet de mettre en évidence la présence d'un clone lymphocytaire B via la répartition des chaînes légères Kappa et Lambda (monotypie) et la présence d'un clone CD5 positif. Le panel lymphocytaire complémentaire complète l'immunophénotypage du clone.

3. Résultats :

3.1. Aspect épidémiologique des SLPC-B :

- **Répartition des SLPC-B selon le type :**

Cent vingt-six cas de SLPC-B ont été retenus. Le score de Matutes supérieur à 4 permet de poser le diagnostic de la Leucémie lymphoïde chronique (LLC) chez 91 patients. Un score inférieur à 3 avec expression du CD5+ et la non expression du CD10 permet de poser le diagnostic du lymphome du manteau (LM) chez 12 cas, leucémie à prolymphocyte B (LPL-B) chez 5 cas. La non expression de CD5 et l'expression du CD10 sont retrouvées dans 3 cas du lymphome folliculaire (LF). La double négativité CD5, CD10 permet le diagnostic de 5 cas de leucémie à tricholeucocytes (LT), 2 cas de lymphomes de la zone marginale (LZM) et un cas de leucémie lymphoplasmocytaire (LLP). Trois cas de LLC atypique avec un score de Matutes égal à 3, et 4 cas difficile à diagnostiqués.

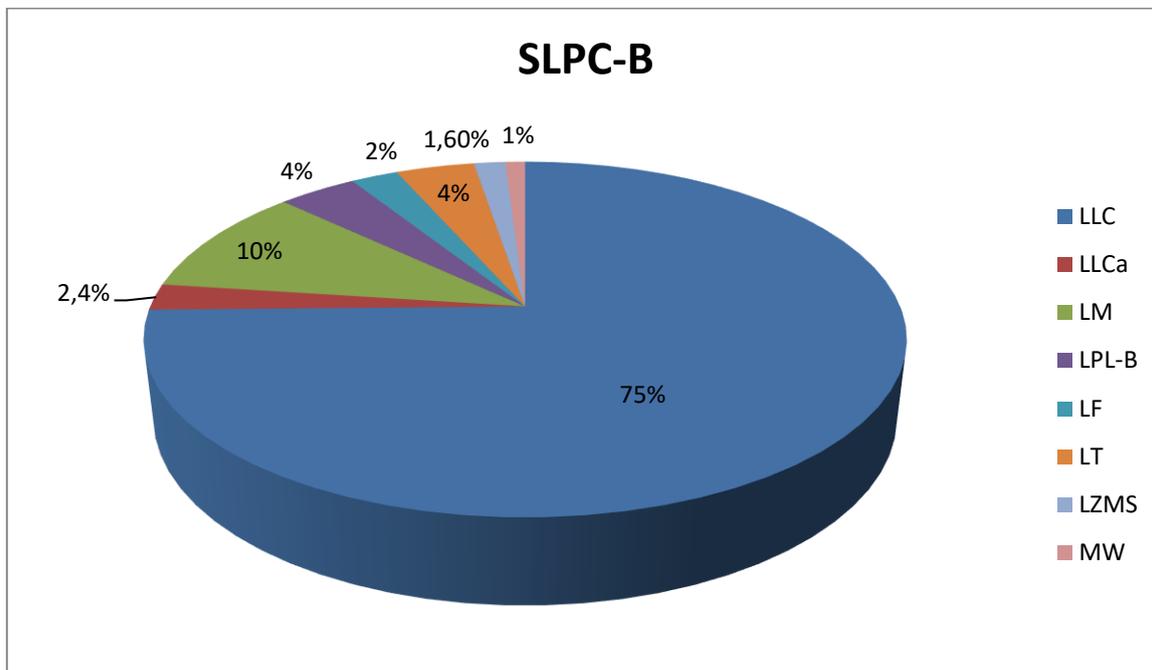


Figure 28. Répartition des syndromes lymphoprolifératifs chroniques selon le type.

- **Répartition selon l'âge :**

L'âge moyen était de 62 ans avec des extrêmes allant de 41 à 87 ans (Tableau I).

Tableau 13. Répartition des syndromes lymphoprolifératifs chroniques selon l'âge.

Maladie	Moyenne d'âge (ans)	Extrêmes d'âge (ans)
LLC n= 91	69	45-87
LLC atypique n= 03	67	62-71
LM n= 12	59	49-77
LPL-B n= 05	71	63-78
LF n= 03	57	52-65
LT n= 05	51	41-67
LZMS n= 02	70	68-72
LW n= 01	52	-
SLPC-B	62	41-87

- **Répartition selon le sexe :**

L'étude de la répartition par sexe retrouve que 76 patients étaient de sexe masculin, soit 62% des cas, contre 38% de sexe féminin (46 cas) (Figure 2). Le sexe ratio est de 1,65.

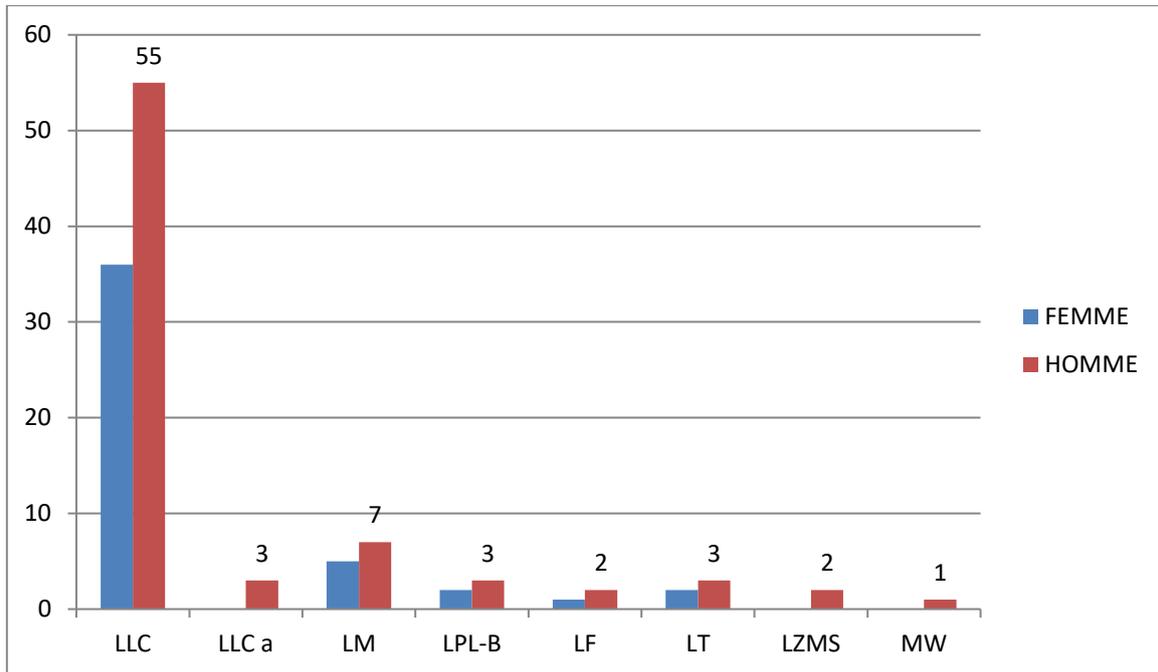


Figure 29. Répartition des syndromes lymphoprolifératifs chroniques selon le sexe.

3.2. Aspect clinico-biologique des SLPC-B :

Tableau 14. Répartition des SLPC-B selon des critères clinico-biologique

	LM	LPL-B	LF	LZMS	LT	MW	LLC	LLC a
Nombre de cas	12	05	03	02	05	01	91	03
Présentation clinique								
adénopathie	0/12 0%	1/5 20%	3/3 100%	0/2 0%	0/5 0%	0/1 0%	65/91 71%	3/3 100%
splénomégalie	3/12 25%	4/5 80%	1/3 33%	2/2 100%	5/5 100%	1/1 100%	21/91 23%	1/3 33%
hépathomégalie	0/12 0%	0/5 0%	0/3 0%	0/2 0%	0/5 0%	1/1 100%	17/91 19%	0/3 0%
Présentation biologique								
lymphocytose	7/12 58%	5/5 100%	3/3 100%	0/2 0%	0/5 0%	1/1 100%	91/91 100%	3/3 100%
thrombopénie	0/12 0%	5/5 100%	0/3 0%	2/2 100%	5/5 100%	0/1 0%	17/91 19%	0/3 0%
anémie	2/12 17%	5/5 100%	2/3 67%	2/2 100%	5/5 100%	1/1 100%	71/91 78%	3/3 100%
Immunophénotypage des lymphocytes B								
CD5+	12/12 100%	3/5 60%	0/3 0%	0/2 0%	0/5 0%	0/1 0%	91/91 100%	2/3 67%
CD23+	0/12 0%	0/5 0%	0/3 0%	0/2 0%	0/5 100%	0/1 0%	91/91 100%	1/3 33%
IgM	H.I 12/12 100%	H.I 4/5 80%	H.I 3/3 100%	H.I 2/2 100%	H.I 5/5 100%	H.I 1/1 100%	91/91 FN 100%	3/3 FN 100%
FMC7+	2/12 16%	4/5 80%	3/3 100%	2/2 100%	5/5 100%	0/1 0%	0/91 0%	1/3 33%
CD79b	H.I 12/12 100%	H.I 4/5 80%	H.I 3/3 100%	M.I 2/2 100%	H.I 5/5 100%	0/1 0%	87/91 FN 95%	3/3FN 100%
CD22	M.I 12/12 100%	H.I 5/5 100%	M.I 3/3 100%	M.I 1/2 50%	H.I 5/5 100%	0/1 0%	91/91 FN 100%	3/3 100%
CD20+	10/12 83%	5/5 100%	3/3 100%	2/2 100%	5/5 100%	1/1 100%	91/91 FN 100%	3/3 100%
CD43+	11/12 92%	0/5 0%	0/3 0%	0/2 0%	1/5 20%	0/1 0%	88/91 97%	3/3 100%
CD25+	0/12 0%	2/5 40%	2/3 67%	1/2 50%	5/5 100%	0/1 0%	NF	2/3 67%
CD103+	0/12 0%	0/5 0%	0/3 0%	1/2 50%	5/5 100%	0/1 0%	NF	0/3 0%
CD11c+	0/12 0%	3/5 60%	1/3 33%	2/2 100%	5/5 100%	1/1 100%	NF	1/3 33%
CD10+	0/12 0%	0/5 0%	3/3 100%	0/2 0%	0/5 0%	0/1 0%	0 /91 0%	0/3 0%
CD38+	11/12 92%	NF	NF	NF	NF	1/1 100%	91/91 100%	3/3 100%
KAPPA	2/12 17%	2/5 40%	0/3 0%	1/2 50%	2/5 40%	1/1 100%	61/91 67%	3/3 100%
LAMBDA	10/12 83%	3/5 60%	3/3 100%	1/2 50%	1/5 20%	0/1 0%	30/91 33%	0/3 0%

4. DISCUSSION :

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 anti-coagulés et traités rapidement (24H max après le prélèvement). 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.

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B) constituent un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par une expansion clonale de lymphocytes B matures. Ils regroupent un grand nombre d'entités, qui touchent les personnes âgées avec une incidence qui croît avec l'âge, et préférentiellement de sexe masculin [93].

Les circonstances de découverte et les présentations cliniques, peuvent être schématisées comme suit:

La constatation d'anomalies sur un hémogramme (hyperlymphocytose, lymphocytes atypiques au frottis),

Le diagnostic étiologique d'une adénopathie ou d'une splénomégalie,

Le diagnostic de douleurs osseuses,

La découverte d'une tumeur viscérale lymphoïde,

La découverte fortuite d'une immunoglobuline monoclonale sérique ou urinaire.

L'analyse cytologique du frottis sanguin, orientée par la clinique et les données de la NFS, peuvent parfois apporter le diagnostic, comme dans la LLC typique. Cependant et dans la majorité des cas, il est nécessaire de compléter par des techniques d'immunophénotypage.

La recherche d'une restriction isotypique est réellement l'élément clé de l'identification du caractère homogène d'une population. La première précaution est de laver abondamment les échantillons car ils sont susceptibles de contenir des Ig solubles qui vont consommer les anticorps anti-isotype, neutralisant ainsi leur fixation sur les lymphocytes B qui apparaîtront alors dépourvus d'Ig membranaire.

L'utilisation de ce seul caractère de restriction des chaînes légères peut être insuffisant en cas d'un faible clone circulant. La combinaison avec des marqueurs aberrants de lignée lymphoïde B comme le CD5 permet de mettre en évidence de petites populations clonales qui se détachent de la population normale lymphocytaire B, le paramètre de taille est aussi intéressant dans ce sens car certaines cellules malignes se différencient clairement des cellules normales par leur taille.

Le panel d'anticorps d'exploration des SLPC-B comprend les marqueurs suivants : CD5, CD22, CD20, CD23, CD10, FMC7, CD103, CD25, CD79b, CD38, IgM, CD43, CD11c,

et les chaînes légères des immunoglobulines. Dans notre étude la caractérisation du clone se fait systématiquement en couplant avec le CD19.

On peut séparer ces différents syndromes en quatre groupes en fonction de leur expression du CD5 et du CD10. Cette séparation en quatre groupes se rapproche de la pratique quotidienne d'interprétation des phénotypes des SLPC-B.

Parmi les SLPC-B CD5+CD10- on retrouve La LLC dont le diagnostic se base sur le score de Matutes /Moreau : Il comporte cinq points de valeur 1 ou 0. Un point est attribué en cas de positivité des molécules membranaires CD5 et CD23, de négativité du FMC7 et d'une expression faible des Immunoglobulines de surface et du CD22 ou du CD79b [3], (Tableau 2). Devant un score de 5 ou 4, le diagnostic de LLC est le plus probable. Pour un score de 3, il est possible mais rare. Dans notre étude, 97% des cas de LLC diagnostiqués ont un score \geq à 4 et un score de 3 est retrouvé chez 3 % de LLC atypique avec une faible expression du CD20 (marqueur dont l'intensité d'expression est plus faible à la surface des cellules de LLC que sur les cellules normales et la diminution d'expression des immunoglobulines de surface de type IgM qui reflète la diminution de la densité antigénique du récepteur B à l'antigène (BCR) par rapport aux cellules B normales, qui est une caractéristique de cette maladie) [74], (Tableau 14).

Le LM est peu fréquent (7 % des lymphomes) ; son aspect cytologique est hétérogène et parfois difficile à distinguer des autres SLPC-B [81]. Les cellules du manteau expriment une immunoglobuline de surface IgM souvent associée à une IgD, plus souvent λ que k . Elles expriment les marqueurs pan-B CD19, CD20, CD22, CD79b, de même que le CD5 et le CD43, et n'exprime pas le CD10 et le CD23 [94, 6]. Dans notre série d'étude, le LM représente 10 % des autres SLPC-B, caractérisé par une monotypie λ chez 10 patients. Une expression modérée à forte du CD22 et CD79b, une expression du CD5 et du CD43, et une absence d'expression du CD10 et du CD23 sont retrouvées chez 12 cas (Tableau 14). Ces résultats permettent le diagnostic différentiel avec la LLC qui est CD23+ et CD79b de faible intensité.

Le LPL-B est une hémopathie rare caractérisée par une prolifération de forte intensité des immunoglobulines de membrane. L'expression des molécules de différenciation de la lignée B en particulier le FMC7 et le CD22, et l'absence d'expression dans la plupart des cas du CD5, du CD23 et du CD25 [95]. Dans notre étude, on retrouve l'expression du CD5 chez 60% des cas de LLP-B et l'absence d'expression du CD10 et le CD23 chez 100% des cas. Le CD79b et l'expression des chaînes légères qui sont de forte intensité chez 4 cas seraient les marqueurs les plus discriminants pour différencier la LPL-B du LM et de la LLC en transformation prolymphocytaire, car les LLC en transformation peuvent avoir une diminution de l'expression du CD5, une augmentation de l'expression du CD20 et une acquisition du

FMC7 [72]. Un cas le LPL-B a été diagnostiqué et a conservé le même immunophénotypage que la LLC de départ même après transformation (Tableau 14).

Les SLPC-B CD5-CD10+ représentés par LF, qui est CD5-CD23-/CD43-CD11c-FMC7+ et positive pour les antigènes de surface associé aux cellules B : CD19+CD20+CD22+CD79a+IgM+ avec expression quasi constante du CD10 [8]. Dans notre série d'étude les marqueurs pan-B (CD19+CD20+CD22+CD79a+) sont positifs et on note une expression intense du CD10, et la négativité du CD5, CD23, CD43 chez 3 patients. Des cas de LF CD10- sont rarement décrits dans la littérature et posent un problème diagnostique d'où la nécessité de compléter l'analyse avec la cytogénétique qui démontrera la présence de t(14;18) et des études anatomopathologiques pour rétablir le diagnostic [78].

Les LZM, LT et LLP représentent la majeure partie des SLPC-B CD5-CD10-. Parmi les différents LZM, nous avons traité principalement le lymphome de la zone marginale splénique (SMZL) qui dissémine majoritairement au niveau sanguin. Les cellules lymphomateuses du SMZL sont généralement fortement positives pour les marqueurs pan-B et peuvent exprimer le CD11c et le CD103 mais d'intensité plus faible que la LT. Elles sont le plus souvent CD5-/CD23- [80]. Cependant, il existe des formes CD5+ et CD23+ ce qui peut rendre le diagnostic particulièrement difficile. La présence d'une différenciation plasmocytaire, ou de cellules villeuses permet d'éliminer une LLC ; la négativité du CD43 permet de les distinguer des LM. Dans notre expérience, le score de matutes est inférieur ou égal à 2, avec l'absence d'expression du CD5, CD23, et CD10, CD43 pour les 2 patients, le CD103 est faiblement exprimé chez un seul patient tandis que le CD11c est positif pour les 3 patients (Tableau 14).

La LT se caractérise par la forte expression des immunoglobulines de surface et les marqueurs B (CD19, CD20, CD22). En revanche, ces cellules n'expriment ni le CD5 ni le CD23 (diagnostic différentiel avec la leucémie lymphoïde chronique B) [10]. Les cellules malignes sont souvent très rares et ne modifient pas le rapport κ/λ des lymphocytes B. Il est préférable alors de les chercher par leur phénotype spécifique : un score immunologique a été développé pour le diagnostic de la LT. Ce score est basé sur l'expression de quatre marqueurs: CD103, CD11c, CD25 et le CD123. Un point est attribué pour une expression positive et 0 point pour une expression négative [37].

Selon la littérature, 98% des cas de LT ont un score supérieur ou égale à 3, c'est le cas dans notre étude ou Le score est calculé à 3 chez 5 patients (100%) avec une forte expression du CD11c, CD103, et une expression modérée du CD25. Une restriction isotypique est retrouvée chez 3 cas, le déséquilibre k/λ est absent chez 2 cas. Ce marquage permet d'aider au diagnostic différentiel avec le LZMS à lymphocytes villeux (l'expression positive du CD103

dans certains cas et un score habituellement de 0 à 1) et la LPL-B (les cellules tumorales sont CD25 et CD103 négatifs) [37].

Les LLP-B se caractérisent par une prolifération polymorphe de petits lymphocytes, lymphoplasmocytes et plasmocytes, envahissant habituellement la moelle.

Les cellules tumorales peuvent disséminer dans le sang, le plus souvent en faible quantité [80]. L'immunophénotypage par cytométrie en flux caractérise la nature lymphoïde B et la clonalité des cellules tumorales. Une expression modérée à forte des Immunoglobulines de surface est observée, ainsi que des marqueurs pan-B. Le score de Matutes est dans la majorité des cas inférieur à 3 [9]. Le CD5 est d'expression variable, le CD23 et le CD10 sont rarement exprimés, contrairement aux CD25, CD22 et CD38. Cependant, aucun marquage spécifique n'a été formellement identifié [80]. Le profil immunophénotypique du cas de LPL est CD5-, CD23-, CD10-, CD25- et l'expression aberrante du CD38. Le score de matutes est calculé à 2 devant une expression de forte intensité d'immunoglobuline de surface de type IgM et l'absence d'expression du CD79b, CD22 et FMC7 (Tableau 14).

La co-expression du CD5 et du CD10 est rare, retrouvée chez 4 cas de notre série, difficile à diagnostiquer. La morphologie ainsi que la cytogénétique apportent des informations complémentaires afin de différencier ces entités. Un des nouveaux marqueurs peut aider à différencier le LM et la LLC : le CD200. Il est exprimé fortement dans la LLC et négative dans le LM [96].

B. Etudes de la répartition des différents marqueurs et l'Etablissement des valeurs seuils du panel des SLPC-B

1. Objectif :

L'objectif principal est d'étudier les niveaux d'expression par les cellules lymphomateuses (IMF : intensité moyenne de fluorescence) pour chaque marqueurs afin de déterminer leur utilité dans le diagnostic différentiel des SLPC-B.

La connaissance précise des valeurs d'IMF 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.

2. Matériels et méthodes :

En fonction de la conclusion de l'immunophénotypage, des données cliniques, et de la cytologie, nous avons pu classer rétro-prospectivement les différents SLPC-B.

Les LLC ont été retenues sur un score de Matutes supérieur ou égal à 4.

Cette sélection d'échantillons nous a permis d'étudier 118 cas : 91 cas de LLC, 12 cas de LM, 5 cas de LPL-B, 3 cas de LF, 5 cas de LT, 2 cas de LZMS.

L'analyse statistique est réalisée par le logiciel SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), et EXCEL

3. Méthodologie d'analyse :

3.1. Validation technique :

Pré-analytique, réactif, technique du marquage et d'analyse : Voir matériel et méthodes partie I

3.2. Analyse statistique :

3.2.1. Exploitation statistique des IFM des différents marqueurs :

Les différentes mesures d'intensité de fluorescence des CD testés en fonction du diagnostic donnés par le logiciel CXP du cytomètre, sont introduites dans un tableau excel afin de déduire des profils type immunphénotypique qualitatifs permettant l'orientation du diagnostic.

3.2.2. Courbe ROC des différents marqueurs en fonction du diagnostic:

La courbe ROC (Receiver Operating Characteristics) est la représentation graphique de toutes les paires sensibilité-spécificité correspondant à tous les seuils possibles, mais la courbe porte en fait en ordonnée la sensibilité du test (la proportion de vrais positifs), et en abscisse 1 moins la spécificité (1-Sp) du test (la proportion de faux positifs). Ainsi, le point de la courbe le plus proche de l'angle supérieur gauche désigne la valeur du seuil pour laquelle la proportion de résultats corrects (vrais positifs et vrais négatifs) est la plus élevée. Cependant, il faut se

souvenir que ce n'est pas forcément le seuil donnant la proportion globale de résultats corrects la plus élevée qui est toujours le plus pertinent à l'utilisation du test. En effet, les objectifs du diagnostic et les conséquences des résultats sur la prise en charge du patient peuvent conduire à favoriser soit la sensibilité (peu de faux négatifs), soit la spécificité du test (peu de faux positifs) [97].

Avant l'établissement de la courbe ROC pour chaque marqueur versus SLPC-B, on a recensé les IFM des différents marqueurs du panel diagnostic des SLPC-B sur un tableau Excel selon un codage approprié, des données qui seront analysés par le logiciel SPSS sous forme de courbes pour mieux dégager les marqueurs discriminants. 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 [98].

3.2.3. Etude du pouvoir discriminant et l'évaluation du score de Matutes :

Soulevé les marqueurs discriminant de tous les SLPC-B de notre série d'étude :

L'étude de l'expression de chaque marqueur en fonction du diagnostic, permet de rechercher les marqueurs les plus discriminants pour chaque SLPC-B, essentiel pour l'affirmation du diagnostic.

Déterminer les valeurs seuils selon une meilleure spécificité pour la LLC :

Pour étayer une hypothèse diagnostique le clinicien utilise fréquemment des symptômes et signes cliniques ainsi que des examens complémentaires. Ces tests devraient idéalement donner une réponse univoque à la question diagnostique : maladie ou condition présente si le test est positif, absente s'il est négatif. Malheureusement, dans la pratique, il y a peu de signes cliniques ou de tests pouvant être interprétés de façon univoque. Certains patients présentent en effet un signe ou un test positifs, sans pour autant souffrir de la maladie recherchée ; d'autres, au contraire, bien que porteurs de la maladie recherchée, ne présentent pas ce signe clinique ou présentent un test négatif. Ainsi, le clinicien doit-il pouvoir disposer des caractéristiques d'un test lui permettant d'en interpréter les résultats et d'appliquer ces derniers à son patient : ce sont les qualificatifs de sensibilité, spécificité et valeurs prédictives.

La **sensibilité** d'un test est la probabilité que le test soit positif si la personne est atteinte de la maladie. C'est le nombre de vrais positifs (tests positifs chez des personnes atteintes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes atteintes de la maladie ($a/a+c$). Plus un test est sensible moins il comporte de faux négatifs (tests négatifs chez des personnes atteintes de la maladie) et mieux il permet, s'il est négatif, d'exclure la maladie [99].

La **spécificité** d'un test est la probabilité que le test soit négatif si la personne testée est

indemne de la maladie. C'est le nombre de vrais négatifs (tests négatifs chez des personnes indemnes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes indemnes de la maladie ($d/b+d$). Plus un test est spécifique, moins il occasionne de faux positifs (tests positifs chez des personnes indemnes de la maladie) et mieux il permet, s'il est positif, d'affirmer la maladie [99].

Dans la littérature, les auteurs tentent de définir les situations dans lesquelles la sensibilité ou la spécificité sont à privilégier :

On privilégie la sensibilité d'un test quand :

- Le but de la démarche diagnostique est d'exclure la maladie.
- La maladie est d'autant plus curable que le traitement est plus précoce.
- Un résultat faussement positif n'a pas de conséquence sérieuse.
- La maladie est rare et l'on se trouve dans une situation de dépistage.

On privilégie la spécificité quand :

- Le but de la démarche diagnostique est d'affirmer ou de confirmer le diagnostic.
- Le risque d'un résultat faussement positif est grave et n'est pas acceptable.
- La maladie est incurable.

La réalité est plus complexe dans ce choix de privilégier sensibilité ou spécificité. L'augmentation de la sensibilité ne peut pas se faire sans tenir compte du coût de diminution simultanée de la spécificité. Le choix de privilégier l'un ou l'autre doit se faire en tenant compte des conséquences de ce choix [100. 101].

Pour notre cas et en combinaison avec plusieurs tests aux propriétés complémentaires dans une stratégie diagnostic des SLPC-B on va privilégier la spécificité afin de minimiser le risque de faux positifs.

Couplage des marqueurs discriminant :

Coupler les marqueurs présentant un intérêt diagnostique car ayant un pouvoir discriminant, afin d'augmenter la puissance du test par l'amélioration des paramètres sensibilité/spécificité.

Calcul de la VPN et VPP pour mieux cerner notre population d'études :

La **valeur prédictive positive (VPP)** d'un test est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif. C'est le nombre de vrais positifs (tests positifs chez des personnes atteintes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes dont le test est positif ($a/a+b$). La formule de Bayes permet de calculer la VPP d'un test en fonction de sa sensibilité (SE), de sa spécificité (SP) et de la prévalence de la maladie (P) [99].

La **valeur prédictive négative (VPN)** d'un test est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif. C'est le nombre de vrais négatifs (tests négatifs chez des

personnes indemnes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes dont le test est négatif (d/ c+d) [99].

Evaluation du score du Matutes selon nos valeurs seuils :

On retient le diagnostic de LLC devant un score supérieur ou égal à 4, un score qu'on va évaluer selon nos propre valeur seuils en tenant compte de plusieurs paramètres 'technique dépendante' (choix de l'anticorps, du fluorochrome, du type de cytomètre et de ses calibrations, techniques de marquage, pré-analytique, température, population...).

4. Résultats :

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 20% ou plus des cellules analysées.

Les valeurs d'IMF étudiées pour chacun des marqueurs, correspondent aux IMF de l'ensemble de la population lymphocytaire B (CD19+).

I. Exploitation statistique des résultats obtenus pour les IFM des différents CD au cours des 91 LLC, 12 LM ,5 LPL-B, 3LF ,2 LZMS, 5 LT :

Tableau 15. Les IFM des différents CD au cours de la LLC

Marqueurs	LLC N=91				
	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart Type
CD5	502	8234	3813,6923	3056	2506
CD23	512	11234	4470,16484	4001	2995
CD79b	302	2101	976,21978	873	540
FMC7	42	450	156,197802	127	95
KAPPA	331	3077	1676,18681	1677	849
LAMBDA	211	2976	1444,01099	1304	846
CD43	567	5007	2399,17582	2111	1351
CD25	39	694	244,934066	151	173
CD11c	43	288	103,087912	89	54
CD103	27	210	92,7362637	89	42
CD10	23	311	117,384615	95	72
CD22	350	3221	1486,95604	1320	823
CD38	1002	7409	4197,49451	4507	2096

Tableau 16. Les IFM des différents CD au cours du LM

	LM N=12				
	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart Type
CD5	2089	5218	3401	3509	1095
CD23	146	1607	626	484	480
CD79b	502	2812	1068	755	760
FMC7	1398	12340	8089	8956	3565
KAPPA	5311	43200	21409	18861	13697
LAMBDA	764	2509	1474	1460	579
CD43	129	802	494	545	245
CD25	55	512	194	130	153
CD11c	33	161	86	78	39
CD103	93	541	290	243	163
CD10	1644	13023	7079	7261	4263
CD38	1322	28008	13311	11530	10170
CD22	5201	40991	21173	20352	11718

Tableau 17. Les IFM des différents CD au cours de la LPL-B

	LPL-B				
	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart Type
CD5	154	601	420	477	173
CD23	27	100	63	66	30
CD79b	5017	33801	18138	18561	10969
FMC7	1722	3011	2240	2002	564
KAPPA	27101	51944	38983	39404	10428
LAMBDA	12021	41022	25304	20122	12960
CD43	22	117	77	77	38
CD25	28	316	115	71	116
CD11c	213	1501	777	618	494
CD103	31	209	91	78	71
CD10	47	233	133	123	73
CD38			NF		
CD22	986	2763	1654	1304	760

Tableau 18. Les IFM des différents CD au cours du LF

	LF				
	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart Type
CD5	755	2109	1458	1509	678
CD23	216	2799	1107	307	1466
CD79b	10122	45012	26078	23101	17635
FMC7	13001	30011	22708	25112	8756
KAPPA	415	13203	6940	7201	6398
LAMBDA	543	9202	3819	1713	4698
CD43	233	3120	1744	1880	1448
CD25	117	1023	580	600	453
CD11c	322	2407	1246	1009	1063
CD103	105	1222	549	321	592
CD10	911	3007	1798	1477	1084
CD38	907	2013	1547	1722	573
CD22			NF		

Tableau 19. Les IFM des différents CD au cours de la LT

	LT				
	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart Type
CD5	312	1716	983	1022	533
CD23	311	2201	1156	987	752
CD79b	10123	67122	39300	41045	20791
FMC7	2710	55120	31371	37012	20677
KAPPA	1044	4600	2532	2104	1349
LAMBDA	559	4011	2435	2700	1372
CD43			NF		
CD25	1901	22110	8644	3204	8779
CD11c	19011	41201	26219	23661	8961
CD103	10135	67100	39657	39617	21490
CD10	445	2201	1138	1022	702
CD38			NF		
CD22	16226	43901	27308	22101	11112

Tableau 20. Les IFM des différents CD au cours du LZMS

	LZMS				
	Minimum	Maximum	Moyenne	Médiane	Ecart Type
CD5	763	2901	1832	1832	1512
CD23	313	2109	1211	1211	1270
CD79b	5440	22130	13785	13785	11802
FMC7	1251	2451	1851	1851	8487
KAPPA	10213	22017	16115	16115	8347
LAMBDA	1101	1409	1012	1012	218
CD43	315	1708	854	854	985
CD25	518	1190	1889	1889	475
CD11c	673	3104	22284	22284	1719
CD103	2556	42012	1057	1057	27900
CD10	901	1212	19617	19617	220
CD38	878	10121	5500	5500	3388
CD22	17201	22012	19617	19617	6536

Ces tableaux permettent d'illustrer les différentes mesures d'intensité de fluorescence des CD testés en fonction du diagnostic.

La moyenne à l'inconvénient d'être influencée par des valeurs qui sont très inférieures ou supérieures au reste des valeurs. C'est pourquoi on va comparer les médianes des IMF car la médiane est une meilleure mesure centrale pour les cas où un petit nombre de valeurs aberrantes peut considérablement fausser la moyenne.

On constate :

- CD5 : IFM LPL-B < IFM LT<LF<LZMS et forte expression dans le LM et la LLC
- CD23 : Forte expression dans la LLC par rapport aux autres entités
- CD79b : IFM LZMS, LF, LT, LPL-B >> IFM LLC et LM
- FMC7 : IFM très faible dans la LLC (max < 450) à la différence d'une expression forte dans les autres entités IFM LZMS<LPL-B< LM<LF<LT
- Chaines légères kappa et lambda : Expression dans les six entités avec une IFM faible dans la LLC.
- CD43 : IFM LPL-B <LM <LZMS <LF <LLC.
- CD25 : IFM faible dans la LLC, LM, LPL-B, LF, LZMS et forte expression dans la LT
- CD11c : forte expression dans le LZMS et la LT, les autres entités présente des IFM faible.
- CD103 : IFM très forte dans la LT par rapports aux autres entités
- CD10 : IFM LLC< LPL-B<LT<LF<LM<LZMS
- CD38 : Forte expression dans le LM
- CD22 : IFM LPL-B<LLC<LZS<LM<LT

Interprétation des résultats :

L'IMF du CD5 est plus marquée dans la LLC (3056) et le LM (3509) que dans le MZLS ,LPL-B, LF, LT (1832 ,477, 1509, 1022 respectivement), La LLC exprime davantage le CD23 et CD43 (4001, 2111respectivement) que le LM (484, 545respectivement) , le LZMS (1211, 854 respectivement), LPL-B (66, 77 respectivement) , LF (307 ,1880 respectivement) et la LT(987,NF) . Le CD22 est exprimé au niveau de toutes les unités avec une IMF importante dans le LZM et la LT (19617,22101 respectivement) par rapport à la LLC et la LPL-B (1320,1304 respectivement).

Les IMF des marqueurs, CD79b, FMC7 sont plus fortement exprimées dans le MZL (13785, 1851 respectivement), la LT (41045, 37012 respectivement), le LF (23101, 25112) et la LPL-B (18561, 2002) par rapport à la LLC (873, 127respectivement). L'IMF du CD38 est très forte dans le LM (11530) et plus intense que dans la LLC (4507) et le LZMS (5500). L'IMF du CD10 est très faible dans la LLC, et la LPL-B (95,123 respectivement) et plus forte dans le LZMS, LM, LF (19617,7261, 1477). IMF des chaines légères des immunoglobulines kappa et

lambda est très faible dans la LLC (1677,1304) par rapport aux autres entités. Les IFM des marqueurs CD103, CD25, CD11c sont fortement exprimées dans la LT (39617, 3204, 23661 respectivement).

Suite à ces résultats, des profils types immunophénotypiques semi-quantitatifs peuvent être déduit pour ces six entités

Tableau 21. Profil immunophénotypique des SLPC-B selon IFM de chaque marqueur

	LLC	LM	LPL-B	LF	LT	LZMS
CD5	++	++	-	-	-	-/+
CD23	++	-	-	-	-	-/+
CD79b	-	-	+	++	++	+
FMC7	-	++	+	++	++	+
KAPPA	-	++	++	+	+	++
LAMBDA	-	-	++	-	+	+
CD43	++	-	-	+	NF	-
CD25	-	-	-	+	++	++
CD11c	-	-	+	+	++	++
CD103	-	-	-	-	++	+
CD10	-	++	-	++	-	++
CD22	+	++	+	NF	++	+
CD38	+	+	NF	-	NF	++

Légende : + : forte intensité ; ++ : très forte intensité ; - : faible intensité ; NF : non fait

II. Exploitation statistiques des IMF sous forme de courbes :

Objectif :

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

1. Marqueurs pour LLC :

Courbe 1 : IMF du CD5 dans la LLC

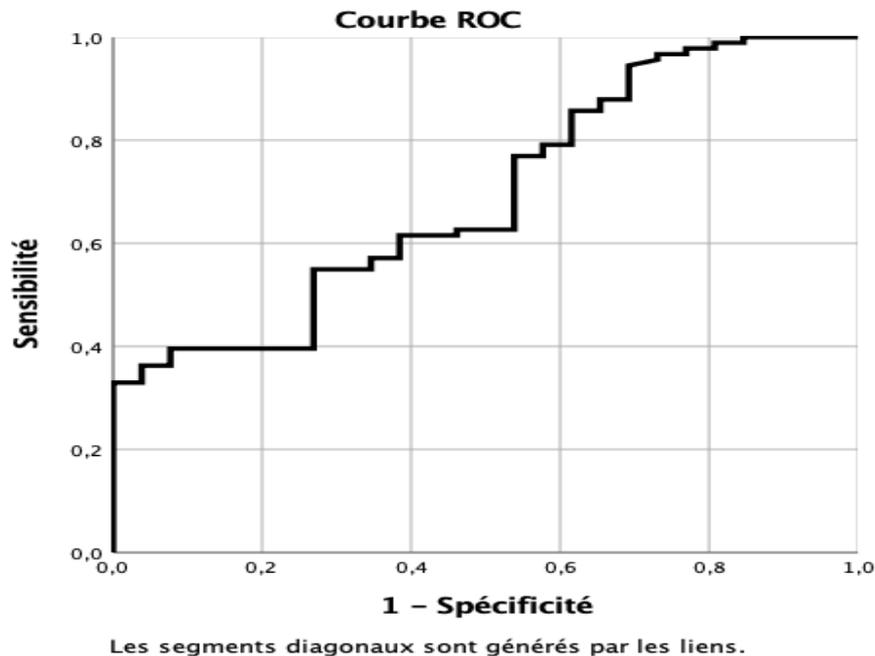


Figure 30. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF de CD5 ; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.

Tableau 22. Variable(s) de résultats tests: CD5 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,693	,583	,802

Une valeur de IMF du CD5 supérieure à 5224 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 100% ; AUC = ,693 ; IC à 95% [0.583 : 0.802].

Courbe II : IMF du CD23 dans la LLC

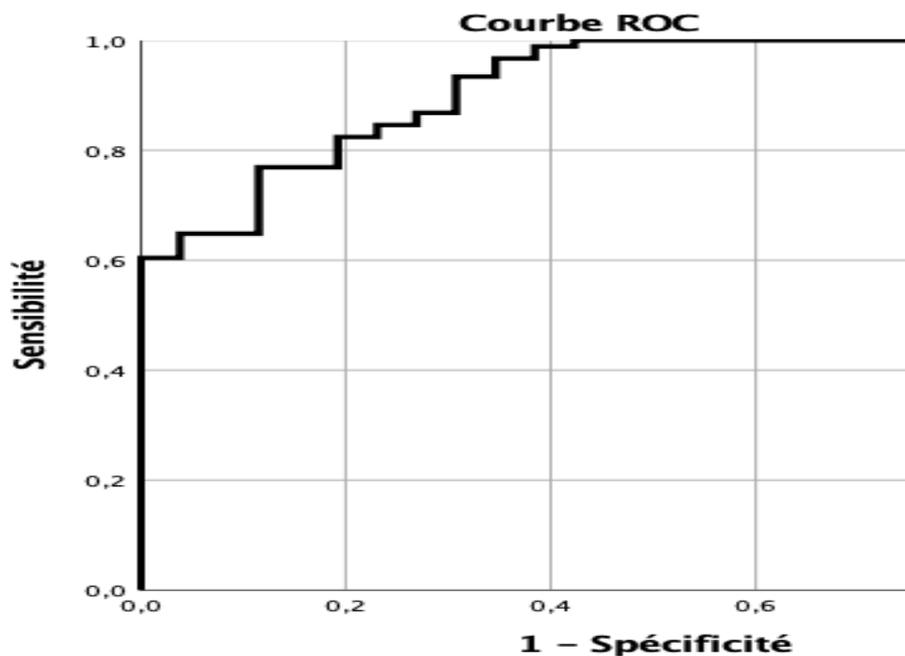


Figure 31. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF de CD23 ; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.

Tableau 23. Variable(s) de résultats tests: CD23 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,918	,863	,973

Une valeur de IMF du CD23 supérieure à 2838 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 60% et une spécificité de 96% ; AUC = 918 ; IC à 95% [0.863 : 0.973].

Courbe III : IMF du CD79b dans la LLC

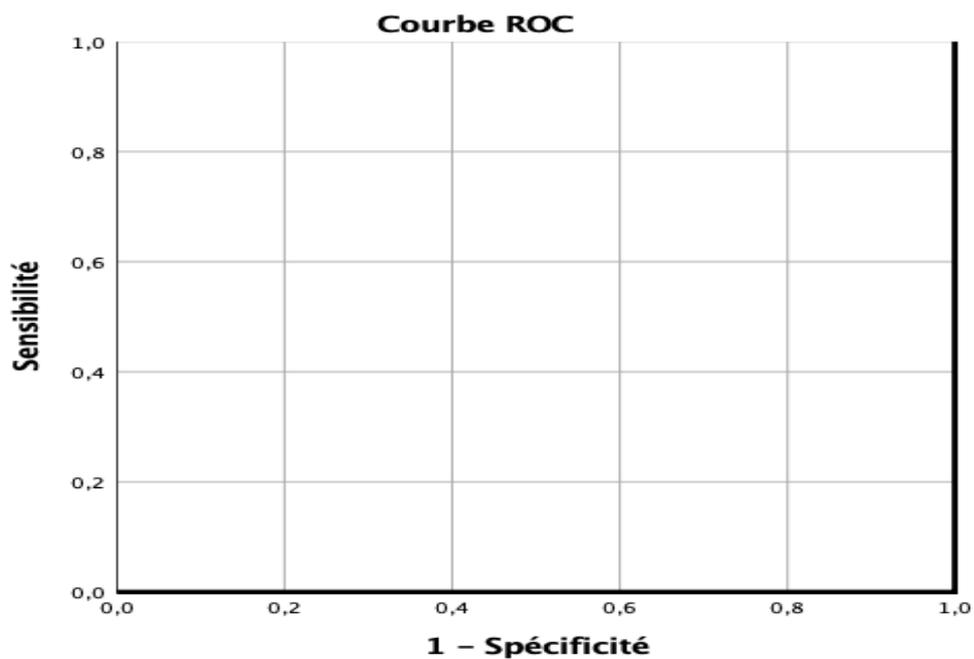


Figure 32. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF de CD79b ; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.

Tableau 24. Variable(s) de résultats tests: CD79b /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,000	,000	,000

Une valeur de IMF du CD79b supérieure à 56661 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 96% ; AUC = 000 ; IC à 95% [0.000 : 0.000].

Courbe IV : IMF du FMC7 dans la LLC

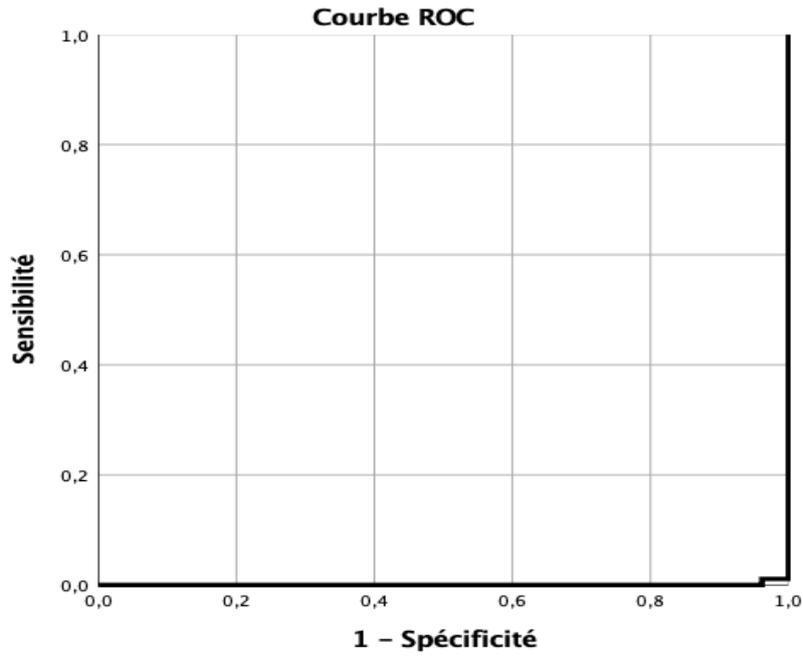


Figure 33. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du FMC7; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.

Tableau 25. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,000	,000	,002

Une valeur de IMF du FMC7 inférieur à 2911,50 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 77% ; AUC = 000 ; IC à 95% [0.000 : 0.002].

Courbe V : IFM du Kappa/Lambda dans la LLC

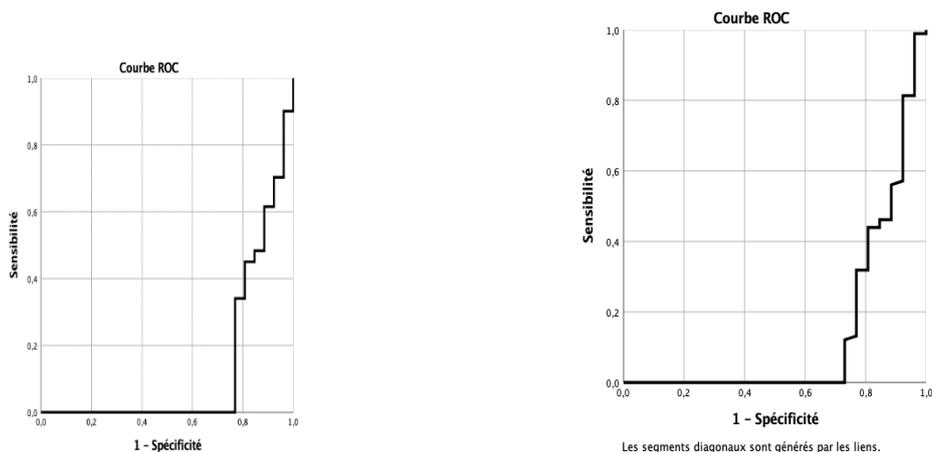


Figure 34. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour CLL versus non LLC dans les SLPC-B.

Tableau 26. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LLC & Lambda/LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %		Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur		Borne inférieur	Borne supérieur
,134	,032	,237	,143	,036	,250

Une valeur de IMF du KAPPA supérieure à 49033 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 96%. IMF, LAMBDA supérieur à 42111 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 96%.

AUC kappa = .134 et AUC lambda = .143 ; IC à 95% [0.032 : 0.237], [0.036 : 0.250] respectivement.

Courbe VI : IMF de CD43 dans la LLC

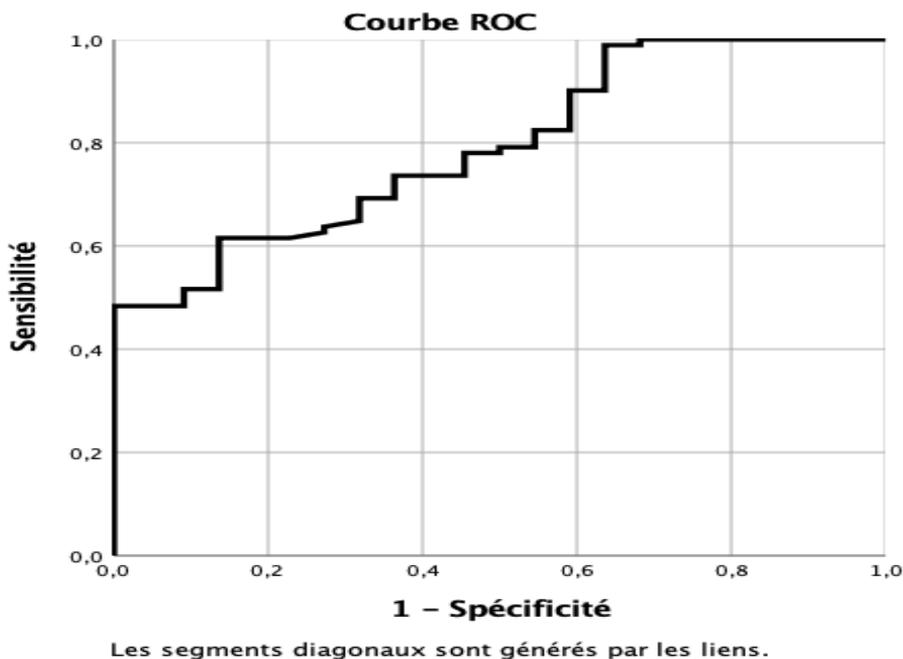


Figure 35. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.

Tableau 27. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,792	,699	,885

Une valeur de IMF du CD43 supérieure à 2544,5 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 48% et une spécificité de 95% ; AUC = 792 ; IC à 95% [0.699 : 0.885].

Courbe VII : IMF de CD38 dans la LLC

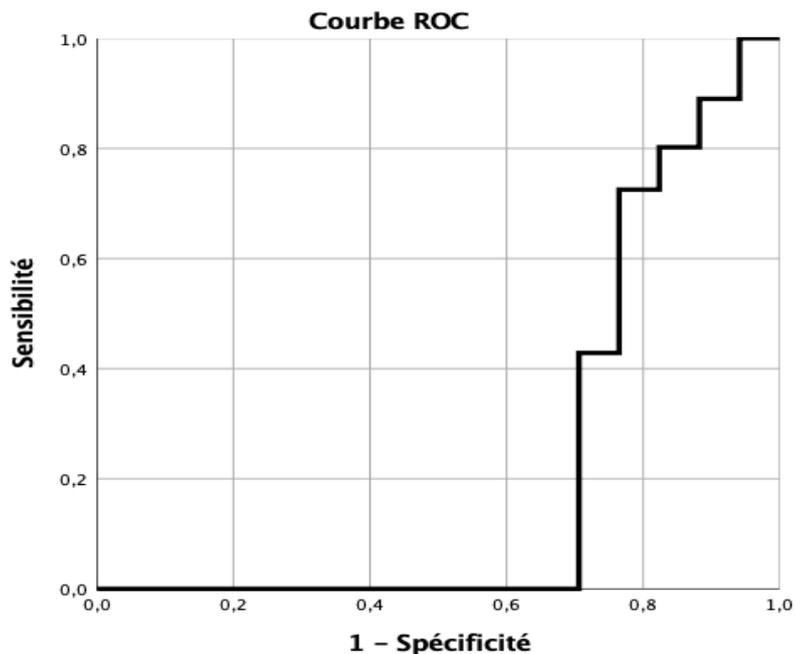


Figure 36. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD38; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.

Tableau 28. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,226	,051	,401

Une valeur de IMF du CD38 supérieure à 30012 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 100% ; AUC = ,226 ; IC à 95% [0.051 : 0.401].

Courbe VIII : IMF de CD25 dans la LLC

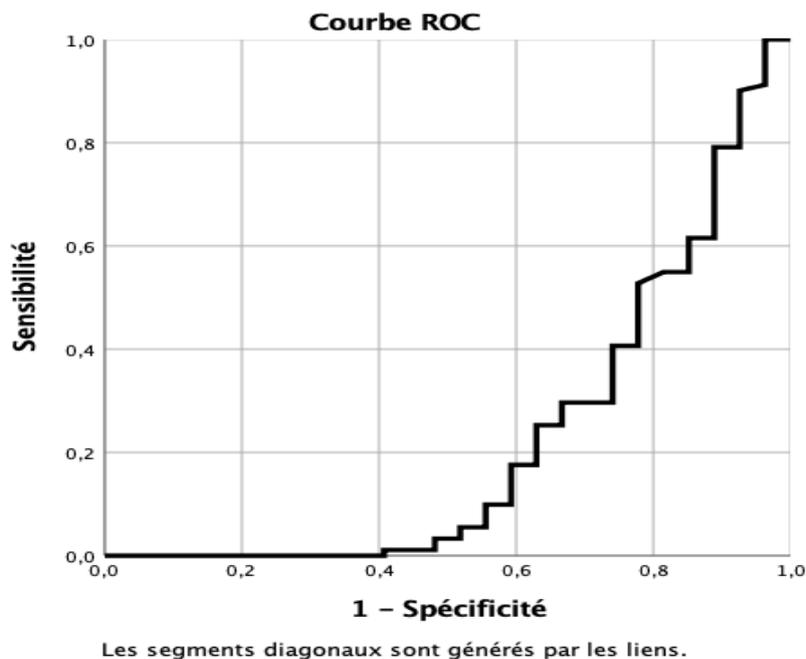


Figure 37. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD25; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.

Tableau 29. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,224	,104	,343

Une valeur de IMF du CD25 supérieure à 22111 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 100% ; AUC = 224 ; IC à 95% [0.104 : 0.343].

Courbe I X: IMF de CD11c dans la LLC

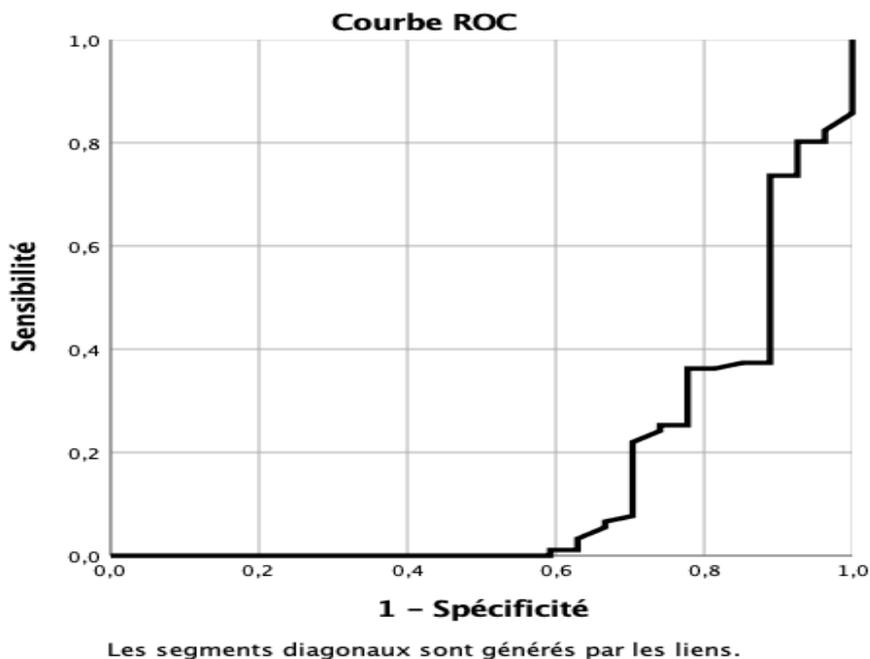


Figure 38. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD11c; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.

Tableau 30. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,152	,051	,252

Une valeur de IMF du CD11c supérieure à 41202 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 100% ; AUC = 152 ; IC à 95% [0.051 : 0.252].

Courbe X : IMF de CD103 dans la LLC

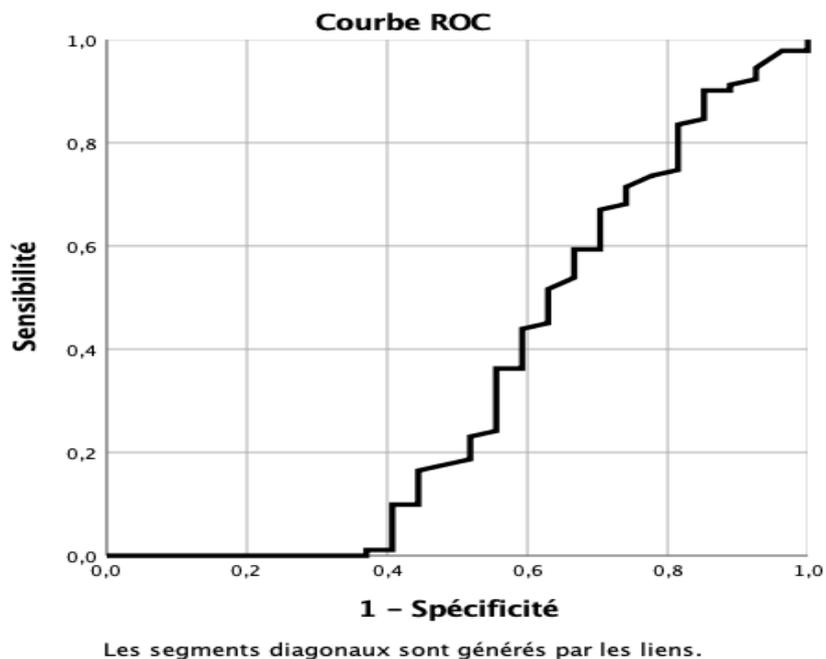


Figure 39. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD103; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.

Tableau 31. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,347	,205	,489

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 591516 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 96% ; AUC = 347 ; IC à 95% [0.205 : 0.489].

Courbe XI : IMF de CD10 dans la LLC

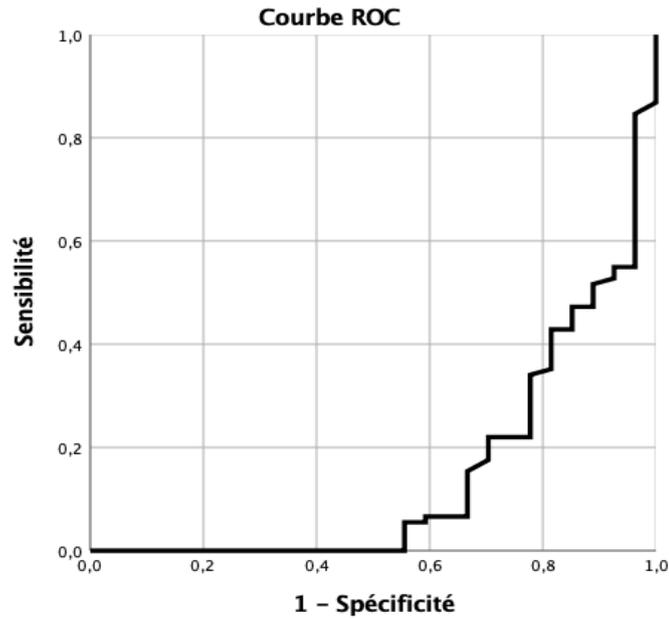


Figure 40. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD10; pour LLC versus non CLL dans les SLPC-B.

Tableau 32. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,147	,057	,237

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 2203 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 100% ; AUC = 147 ; IC à 95% [0.057 : 0.237].

Courbe XII : IMF de CD22 dans la LLC

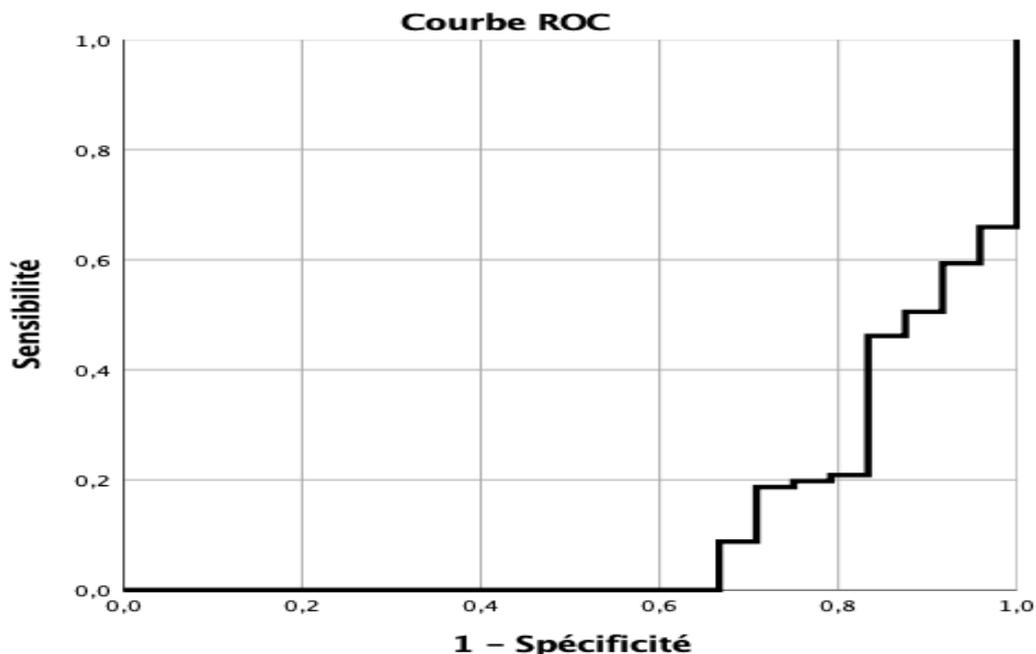


Figure 41. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD22; pour LLC versus non LLC dans les SLPC-B.

Tableau 33. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LLC

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,121	,034	,208

Une valeur de IMF du CD22 supérieure à 43902 permet d'évoquer une LLC avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 100% ; AUC = 121 ; IC à 95% [0.034 : 0.208].

Courbe XIII : Récapitulatif de traitement des observations

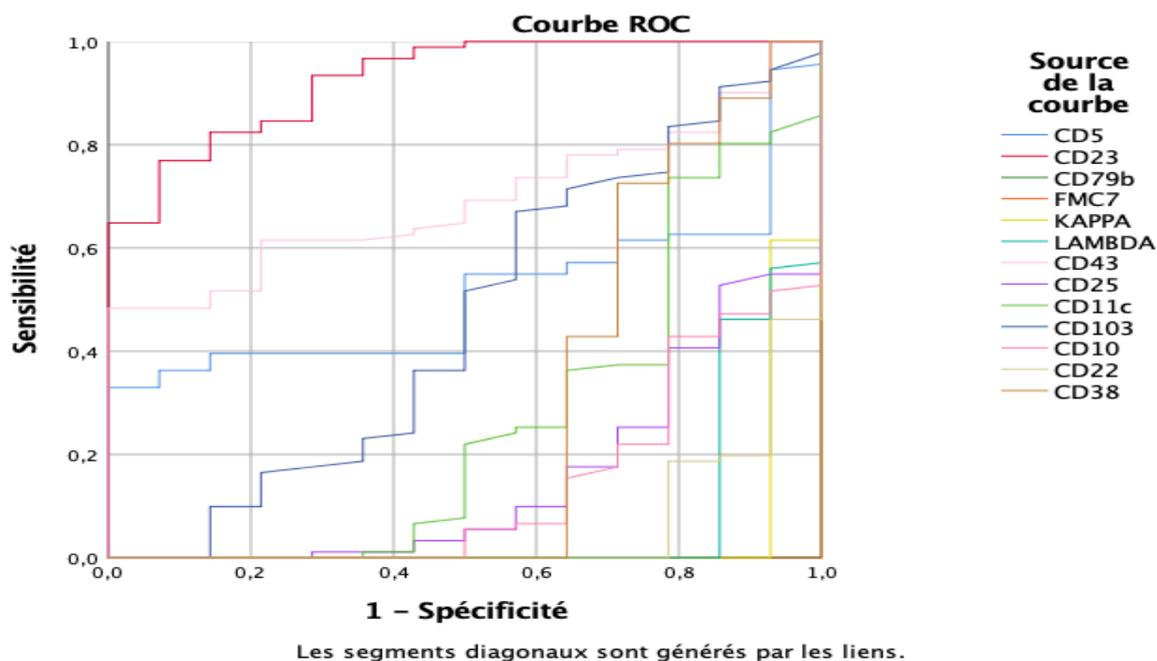


Figure 42. Récapitulatifs des marqueurs

Tableau 34. Variables de résultats tests les plus discriminants CD5/CD23/CD43

Variable(s) de résultats tests	Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
		Borne inférieur	Borne supérieur
CD5	693	539	779
CD23	918	882	989
CD43	792	699	885

Les valeurs les plus grandes de la ou des variables de résultats tests indiquent une probabilité plus élevée pour un état réel positif.

2. Marqueurs de LM :

Courbe I : IFM de CD5 dans la LM

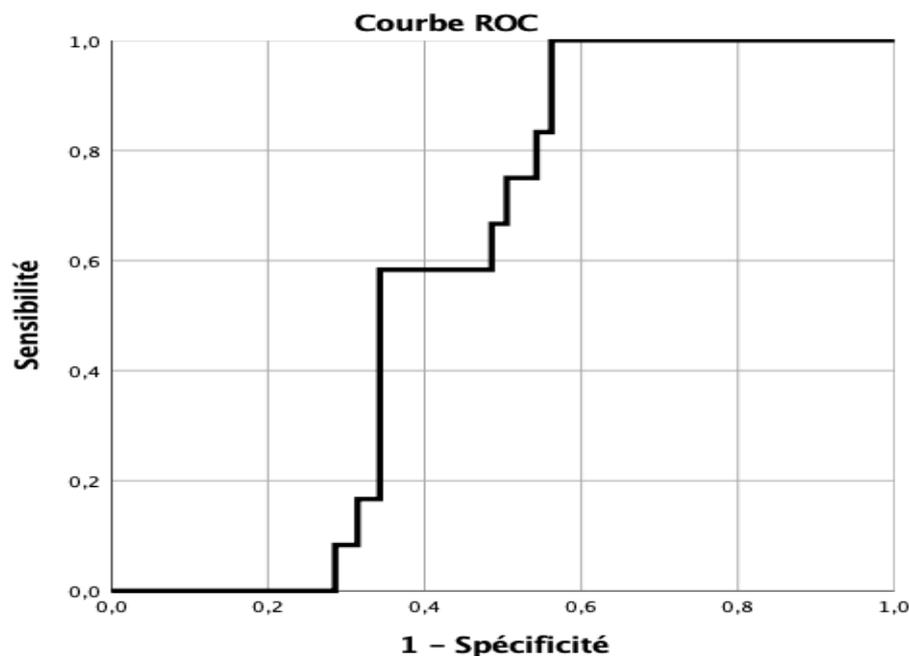


Tableau 35. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,586	,484	,687

Une valeur de IMF du CD5 supérieure à 5213 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 8% et une spécificité de 71% ; AUC = 586 ; IC à 95% [0.484 : 0.687].

Courbe II : IFM de CD23 dans la LM

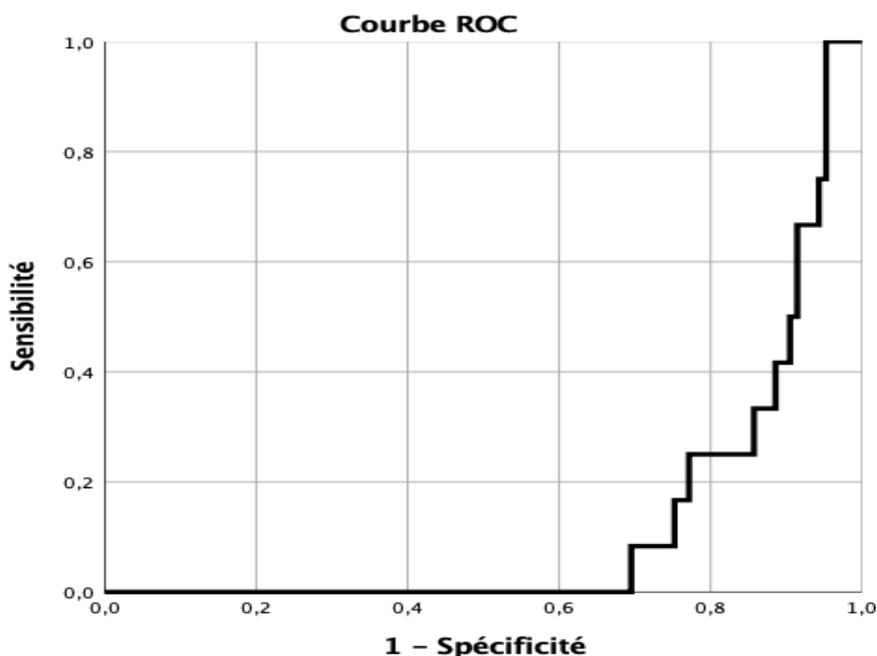


Figure 44. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD23; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 36. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,125	,056	,194

Une valeur de IMF du CD23 supérieure à 10672 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 99% ; AUC = 125 ; IC à 95% [0.056 : 0.194].

Courbe III : IFM de CD79b dans la LM

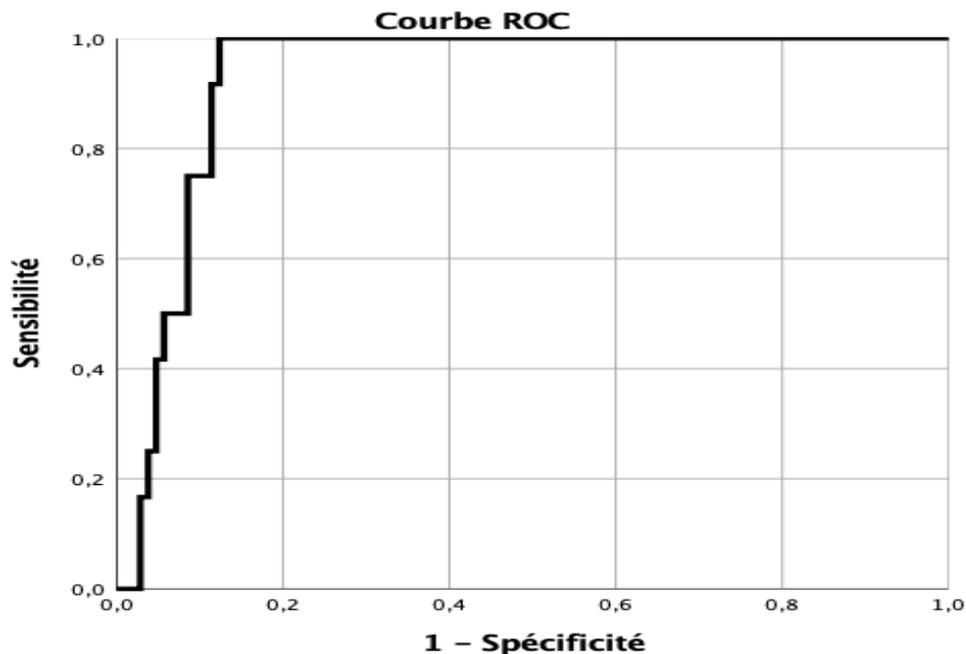


Figure 45. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD79b; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 37. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,929	,882	,975

Une valeur de IMF du CD79b supérieure à 3490 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 16% et une spécificité de 97% ; AUC = 929 ; IC à 95% [0.882 : 0.975].

Courbe IV : IFM de FMC7 dans la LM

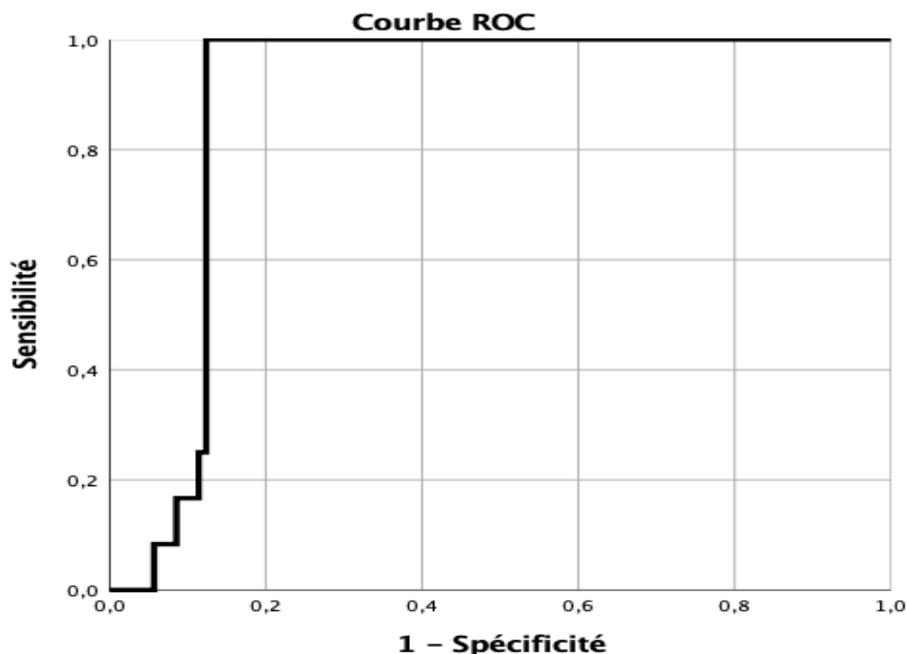


Figure 46. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du FMC7; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 38. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,886	,826	,945

Une valeur de IMF du FMC7 supérieure à 1461 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 88% ; AUC = 886 ; IC à 95% [0.826 : 0.945].

Courbe V : IFM de Kappa /Lambda dans le LM

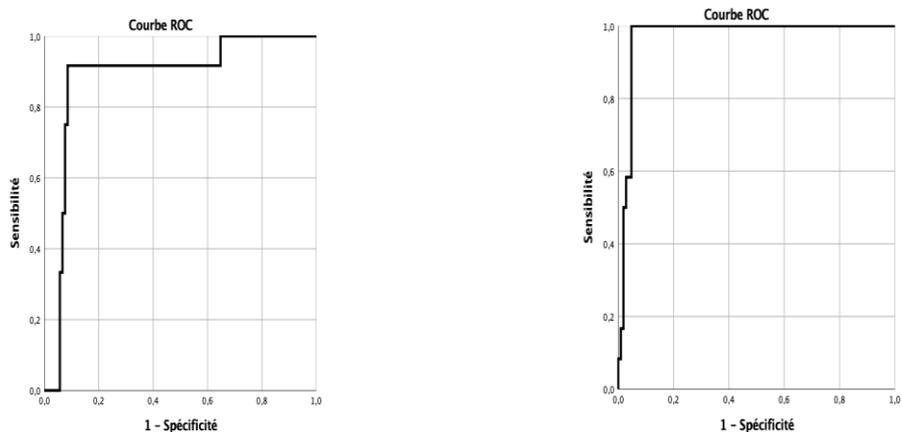


Figure 47. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d’intérêt : MFI du Kappa et Lambda; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 39. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LM & Lambda /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %		Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur		Borne inférieur	Borne supérieur
,883	,781	,984	,971	,942	,999

Une valeur d’IMF KAPPA supérieure à 10123 permet d’évoquer un LM avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 93% ; MFI LAMBDA supérieure à 20311 permet d’évoquer un LM avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 98%.

AUC kappa = 883 et AUC lambda =971 ; IC à 95% [0.781 : 0.984], [0.942 : 0.999] respectivement.

Courbe VI : IFM de CD43 dans la LM

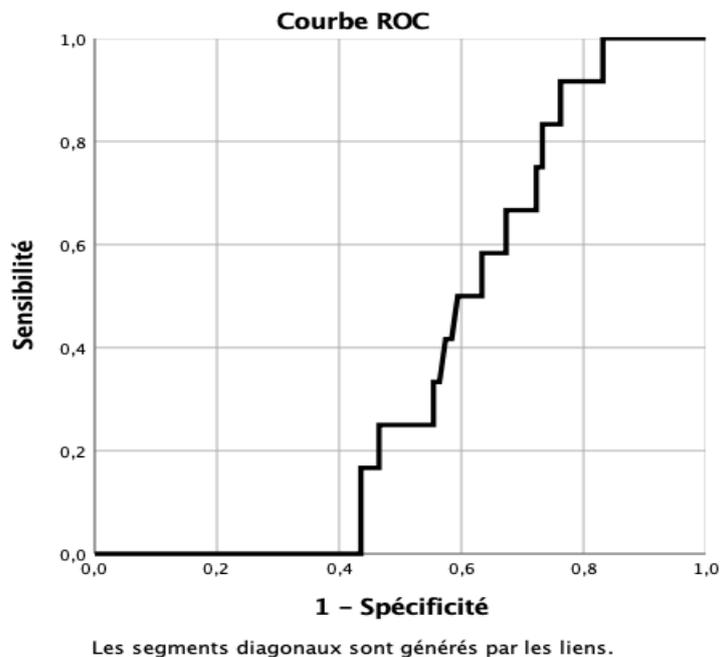


Figure 48. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD43; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 40. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,383	,276	,490

Une valeur de IMF du CD43 supérieure à 4900 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 98% ; AUC = 383 ; IC à 95% [0.276 : 0.490].

Courbe VII : IFM de CD38 dans la LM

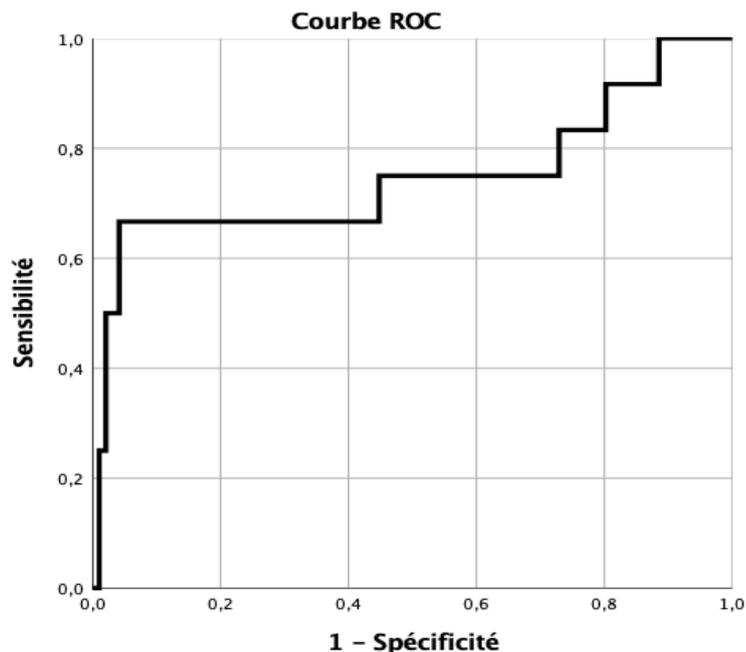


Figure 49. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD38; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 41. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,747	,551	,942

Une valeur de IMF du CD38 supérieure à 2544.50 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 99% ; AUC = .747 ; IC à 95% [0.551 : 0.942].

Courbe VIII : IFM de CD25 dans la LM

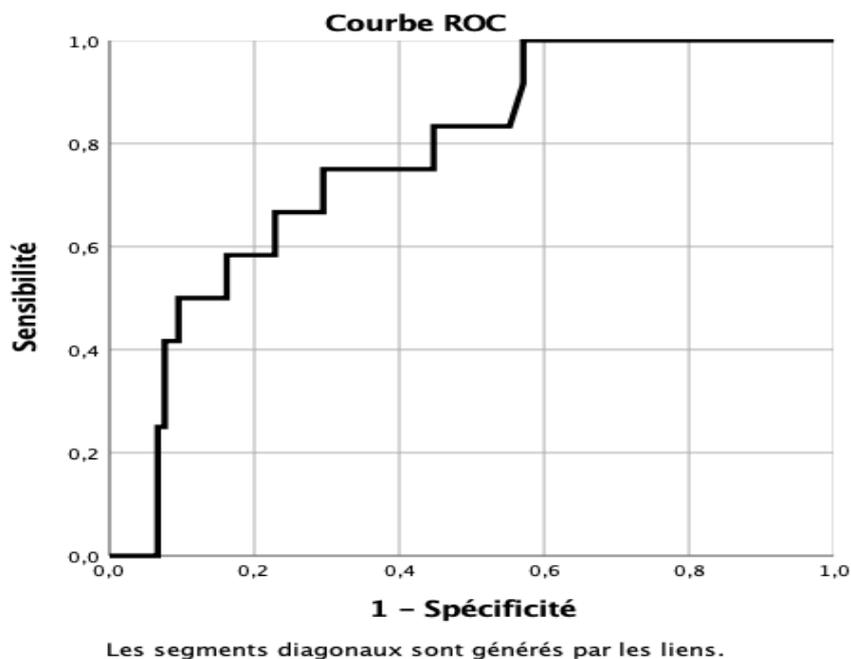


Figure 50. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD25; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 42. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,774	,654	,894

Une valeur de IMF du CD25 supérieure à 702.50 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 93% ; AUC = 774 ; IC à 95% [0.654 : 0.894].

Courbe IX : IMF de CD11c dans la LM

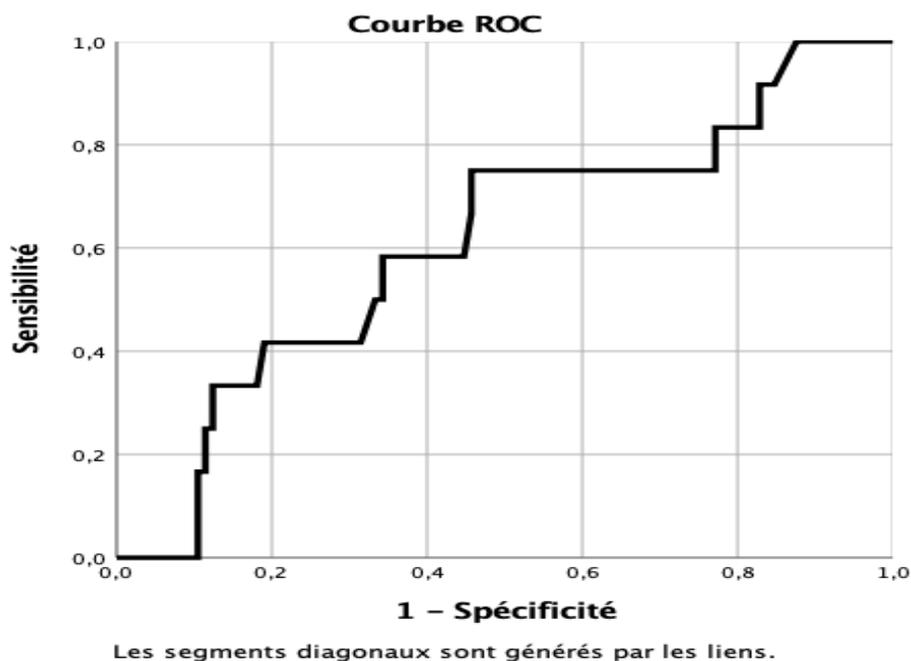


Figure 51. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD11c; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 43. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,611	,443	,778

Une valeur de IMF du CD11C supérieure à 478 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 08% et une spécificité de 89% ; AUC = 611 ; IC à 95% [0.443 : 0.778].

Courbe X : IMF de CD103 dans la LM

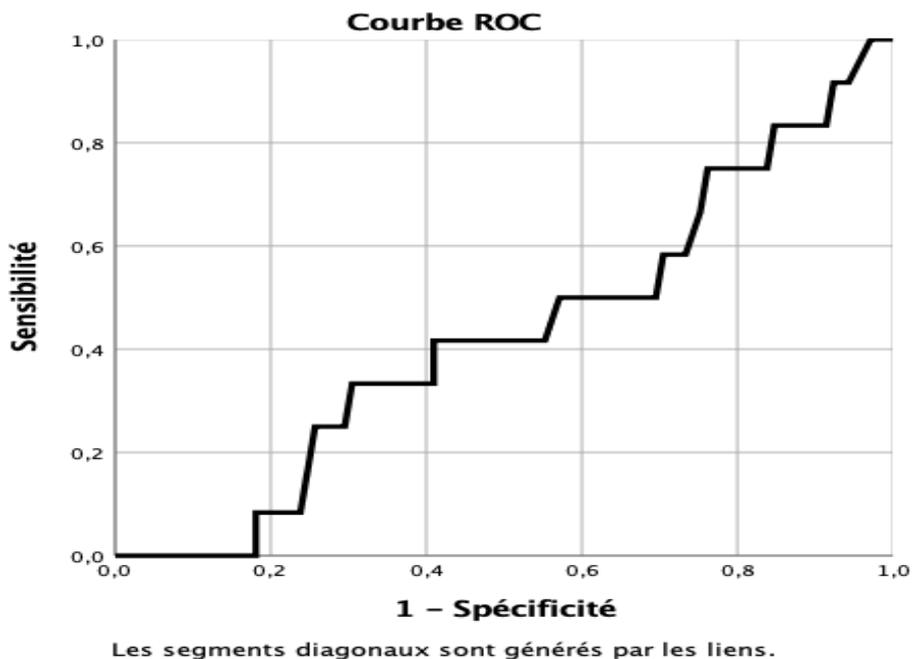


Figure 52. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD103; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 44. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,428	,263	,593

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 158.50 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 08% et une spécificité de 81% ; AUC = 428 ; IC à 95% [0.263 : 0.593].

Courbe XI : IMF de CD10 dans la LM

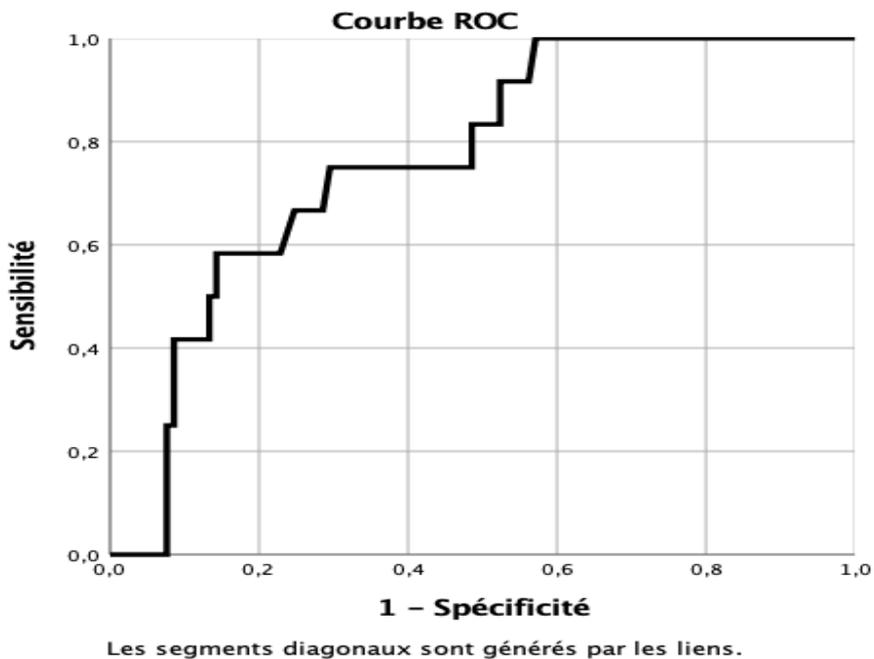


Figure 53. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD10; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 45. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,768	,651	,886

Une valeur de IMF du CD10 supérieure à 423 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 91% ; AUC = 768 ; IC à 95% [0.651 : 0.886].

Courbe XII : IMF de CD22 dans la LM

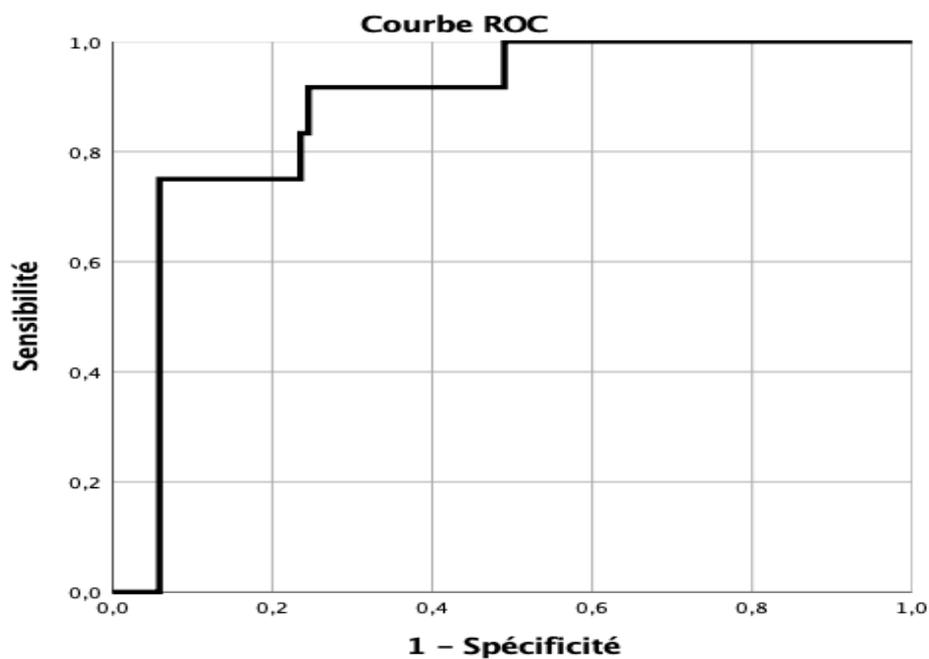


Figure 54. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD22; pour LM versus non LM dans les SLPC-B.

Tableau 46. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LM

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,875	,788	,962

Une valeur de IMF du CD22 supérieure à 3261 permet d'évoquer un LM avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 94% ; AUC = 875 ; IC à 95% [0.788 : 0.962].

Courbe XIII : Récapitulatif de traitement des observations

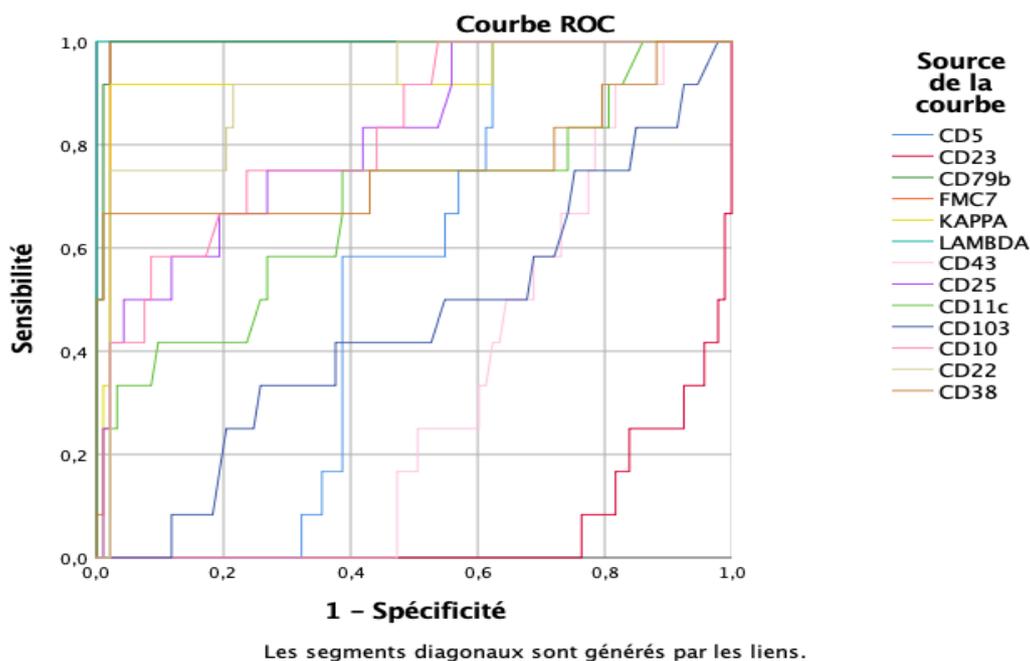


Figure 55. Récapitulatif des marqueurs

Tableau 47. Variables de résultats tests les plus discriminants

CD10/CD79b/FMC7/Kappa/Lambda/CD22

Variable(s) de résultats tests	Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
		Borne inférieur	Borne supérieur
CD10	768	651	886
CD79b	929	882	975
FMC7	886	826	945
Kappa	883	781	984
Lambda	971	942	999
CD22	875	826	993
CD25	774	654	894
CD38	747	551	942

Les valeurs les plus grandes de la ou des variables de résultats tests indiquent une probabilité plus élevée pour un état réel positif.

3. Marqueurs de LPL-B :

Courbe I : IMF de CD5 dans la LPL-B

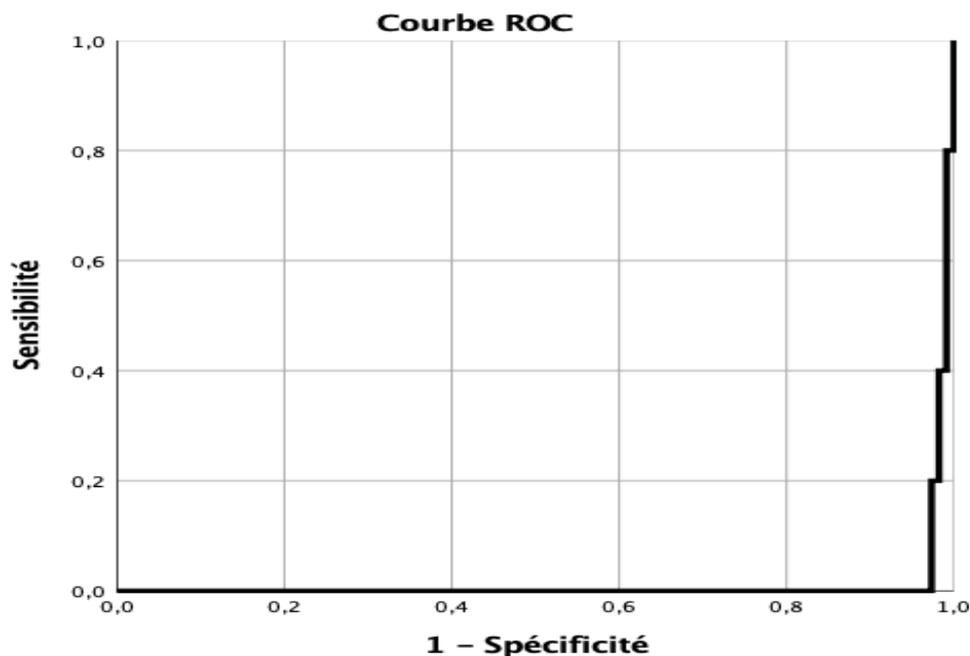


Figure 56. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : MFI du CD5; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 48. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,013	,000	,031

Une valeur de IMF du CD5 supérieure à 6502.50 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 83% ; AUC = 013 ; IC à 95% [0.000 : 0.031].

Courbe II : IMF de CD23 dans la LPL-B

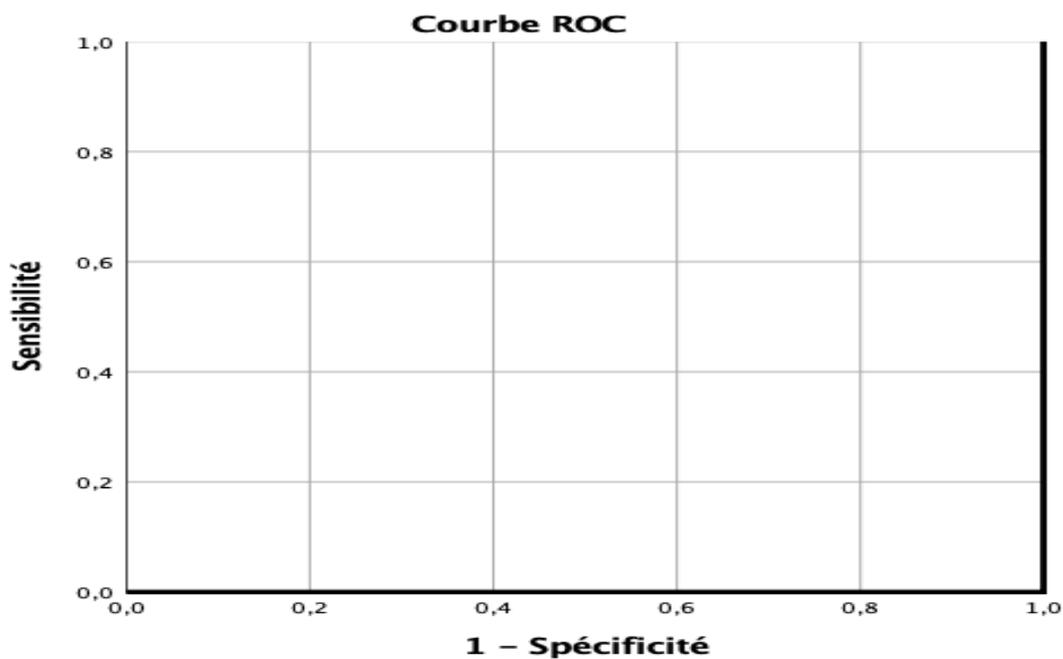


Figure 57. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD23; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 49. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,000	,000	,000

Une valeur de MFI du CD23 supérieure à 7160 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 81% ; AUC = 000 ; IC à 95% [0.000 : 0.000].

Courbe III : IMF de CD79b dans la LPL-B

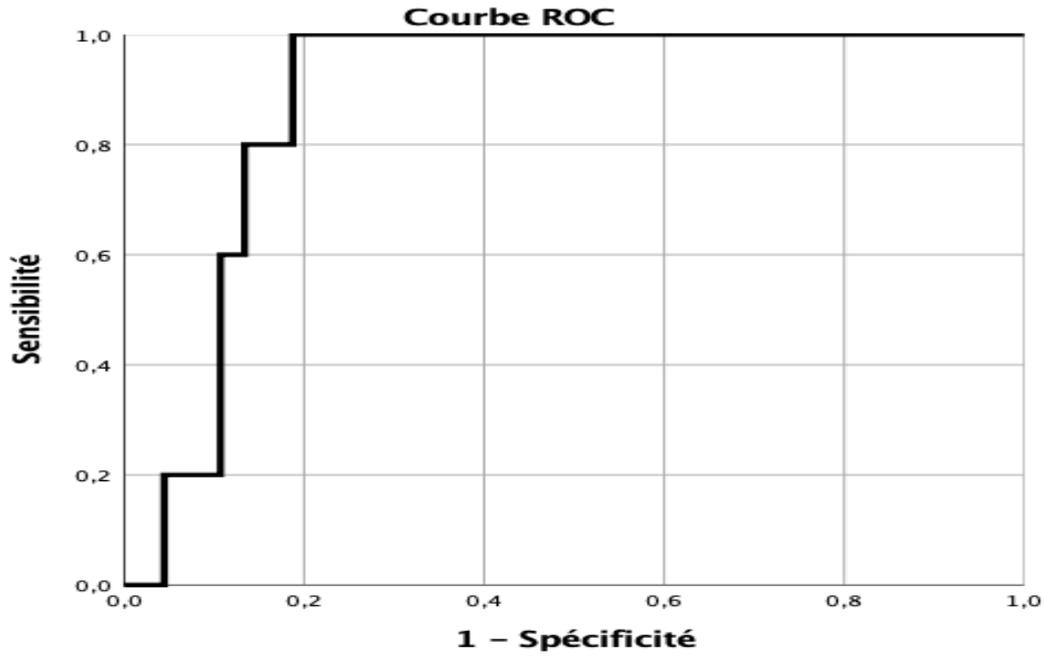


Figure 58. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD79b; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 50. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,884	,817	,951

Une valeur de IMF du CD79b supérieure à 33501 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 99% ; AUC = 884 ; IC à 95% [0.817 : 0.951].

Courbe IV : IMF de FMC7 dans la LPL-B

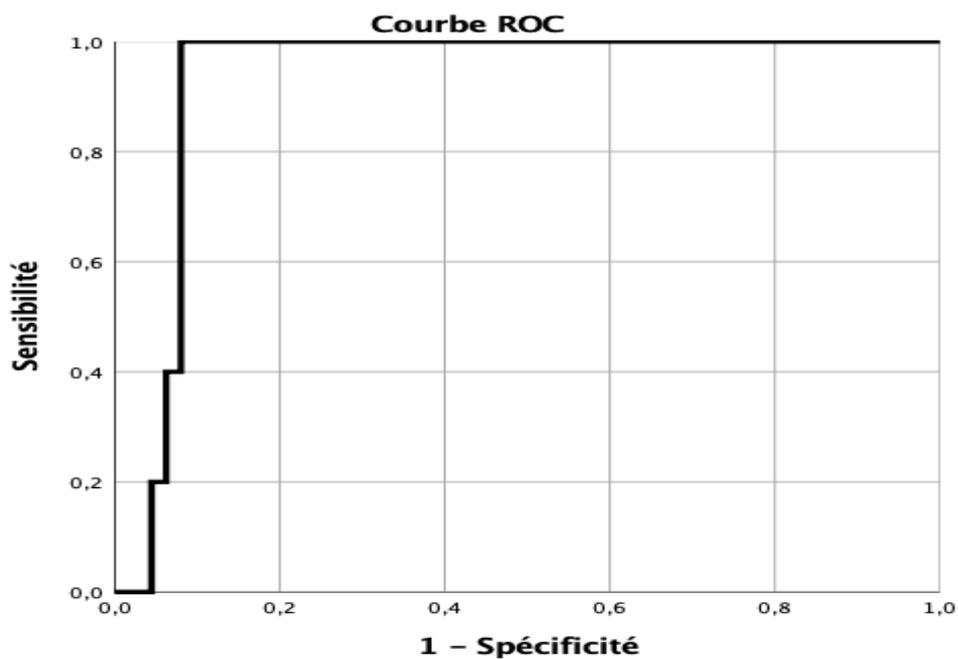


Figure 59. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du FMC7; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 51. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,930	,884	,977

Une valeur de IMF du FMC7 supérieure à 2911.50 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 20% et une spécificité de 95% ; AUC = 930 ; IC à 95% [0.884 : 0.977].

Courbe V : IMF de Kappa /Lambda dans la LPL-B

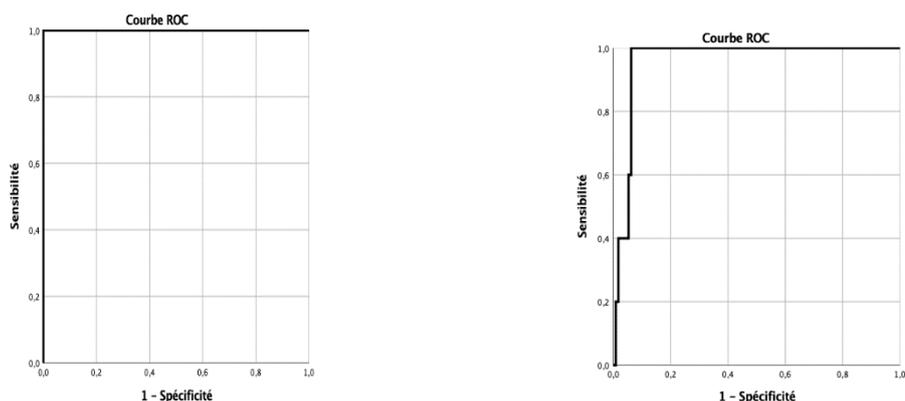


Figure 60. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du Kappa et Lambda; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 52. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LPL-B & Lambda /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
1,000	1,000	1,000

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,959	,921	,997

Des valeurs de IMF du kappa supérieure à 28722.50, permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 100% ; MFI Lambda supérieur à 35894.50 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 40% et une spécificité de 98%
 AUC kappa = 1.000 et AUC lambda =0.959 ; IC à 95% [1.000 : 1.000], [0.921 : 0.997] respectivement.

Courbe VI : IMF de CD43 dans la LPL-B

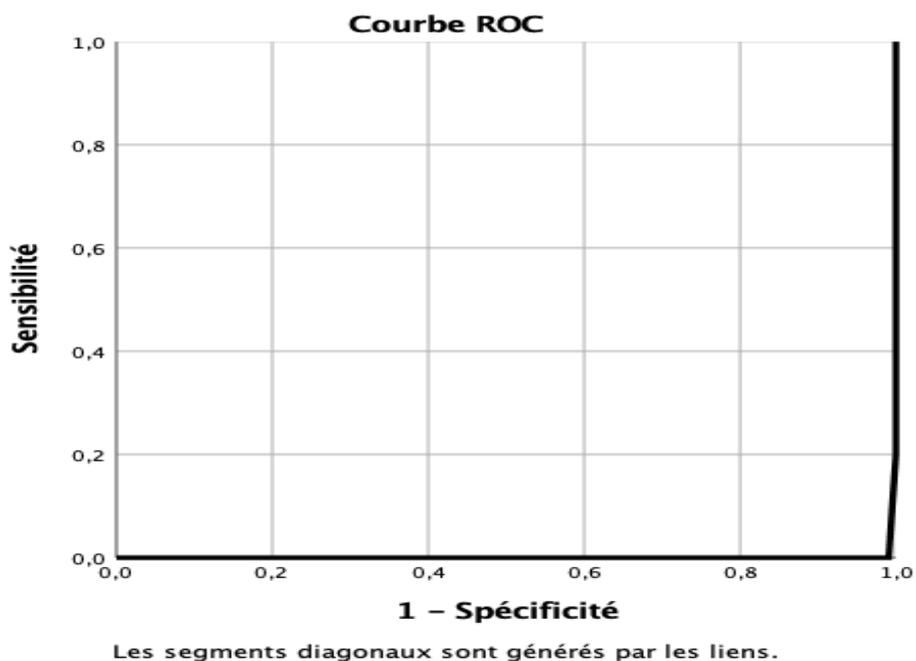


Figure 61. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt: IMF du CD43; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 53. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,001	,000	,005

Une valeur de IMF du CD43 supérieure à 3561.50 permet d'évoquer une LPL-B avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 80% ; AUC = 001 ; IC à 95% [0.000 : 0.005].

Courbe VII : IMF de CD25 dans la LPL-B

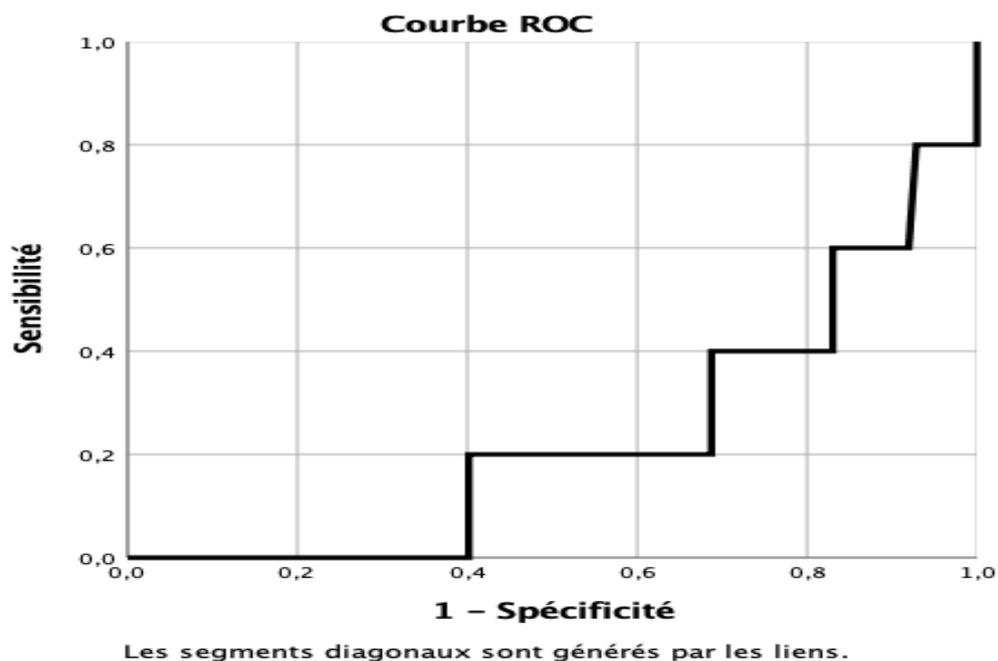


Figure 62. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD25; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 54. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,231	,039	,423

Une valeur de IMF du CD25 supérieure à 504 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 80% ; AUC = 231 ; IC à 95% [0.039 : 0.423].

Courbe VIII : IMF de CD11c dans la LPL-B

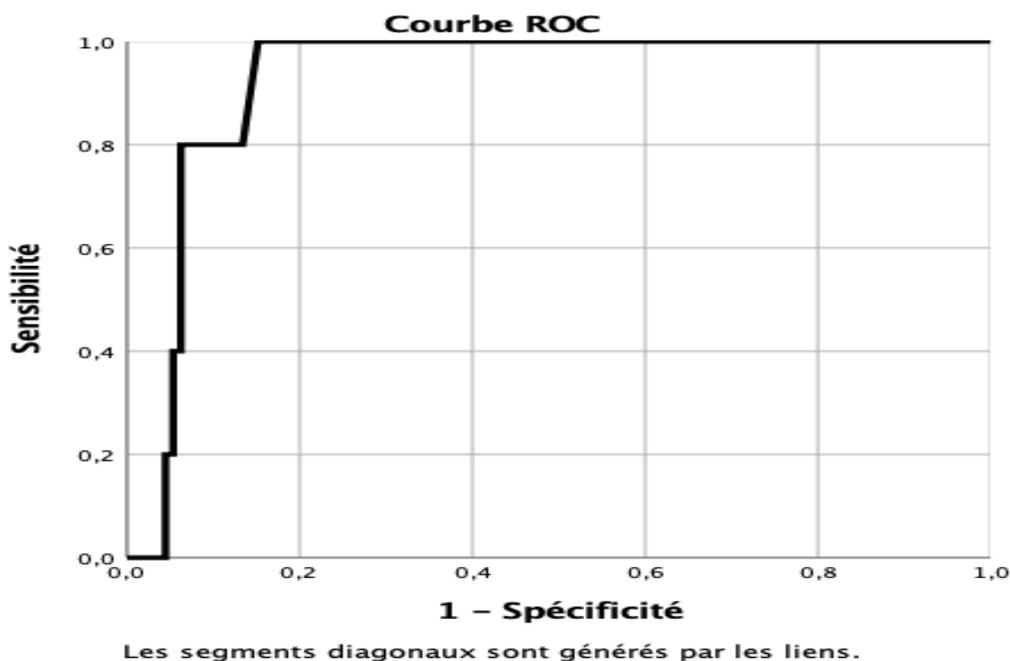


Figure 63. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD11c; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 55. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,927	,874	,980

Une valeur de IMF du CD11C supérieure à 295.50 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 80% et une spécificité de 90% ; AUC = 927 ; IC à 95% [0.874 : 0.980].

Courbe IX : IMF de CD103 dans la LPL-B

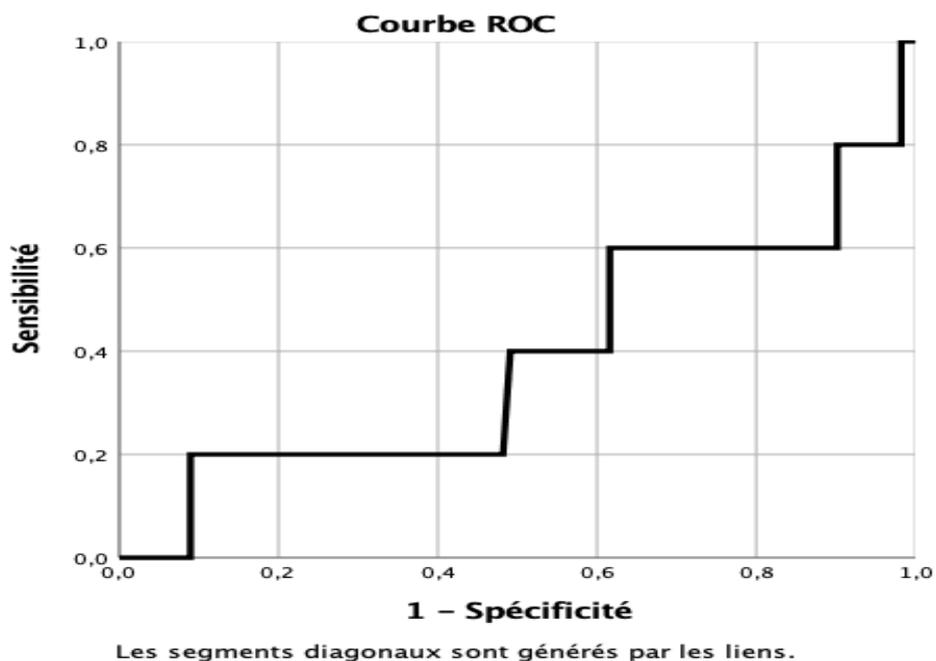


Figure 64. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD103; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 56. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,385	,100	,669

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 198 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 20% et une spécificité de 90% ; AUC = 385 ; IC à 95% [0.100 : 0.669].

Courbe X : IMF de CD22 dans la LPL-B

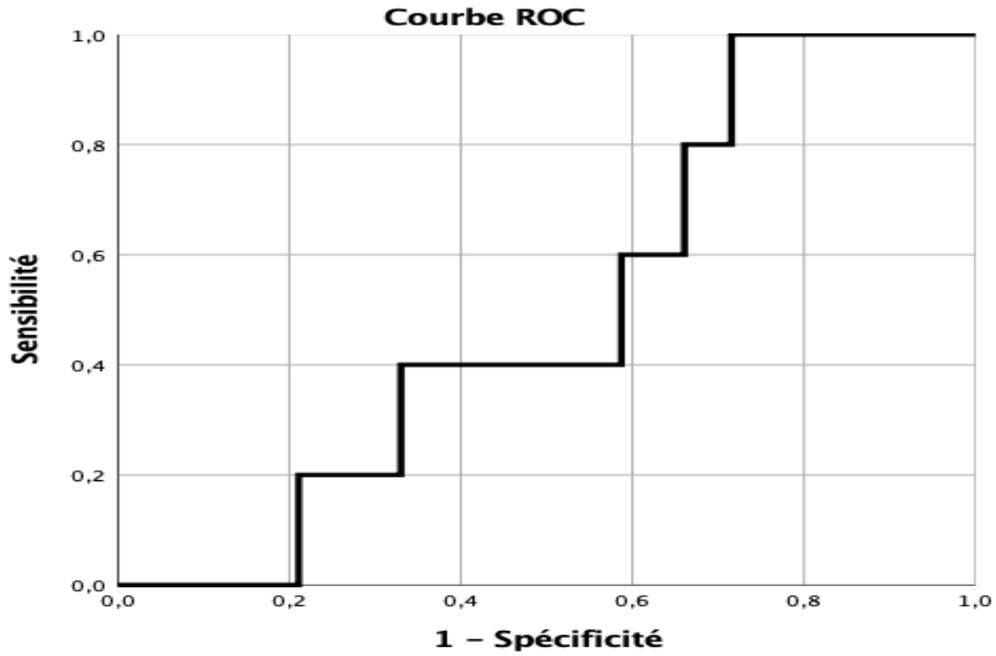


Figure 65. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD22; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 57. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,499	,312	,686

Une valeur de IMF du CD22 supérieure à 2732.50 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 20% et une spécificité de 78% ; AUC = 499 ; IC à 95% [0.312 : 0.686].

Courbe XI : IMF de CD10 dans la LPL-B

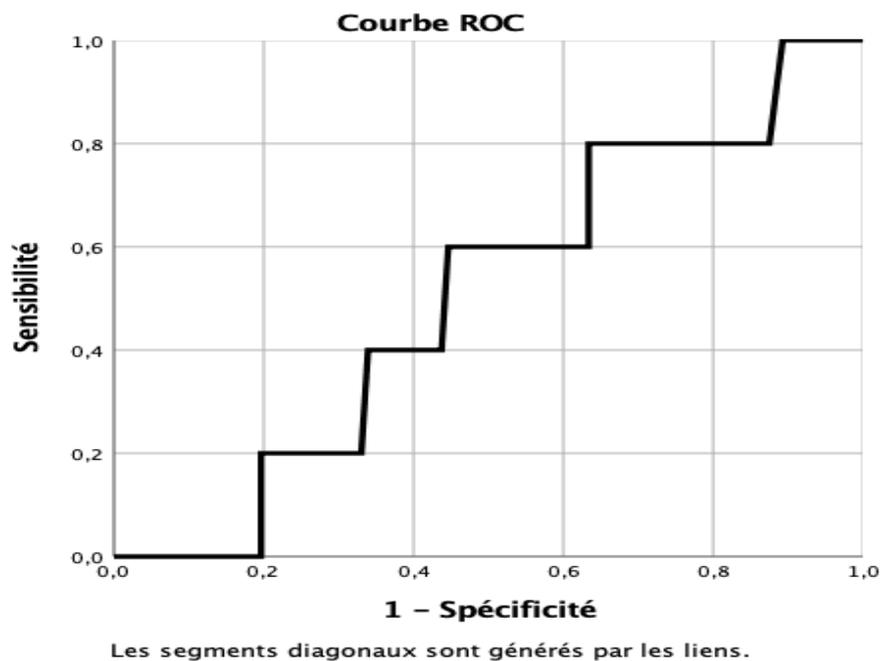


Figure 66. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD10; pour LPL-B versus non LPL-B dans les SLPC-B.

Tableau 58. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LPL-B

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,502	,281	,723

Une valeur de IMF du CD10 supérieure à 231.50 permet d'évoquer un LPL-B avec une sensibilité de 20% et une spécificité de 80% ; AUC = 502 ; IC à 95% [0.281 : 0.723].

Courbe XII : Récapitulatif de traitement des observations

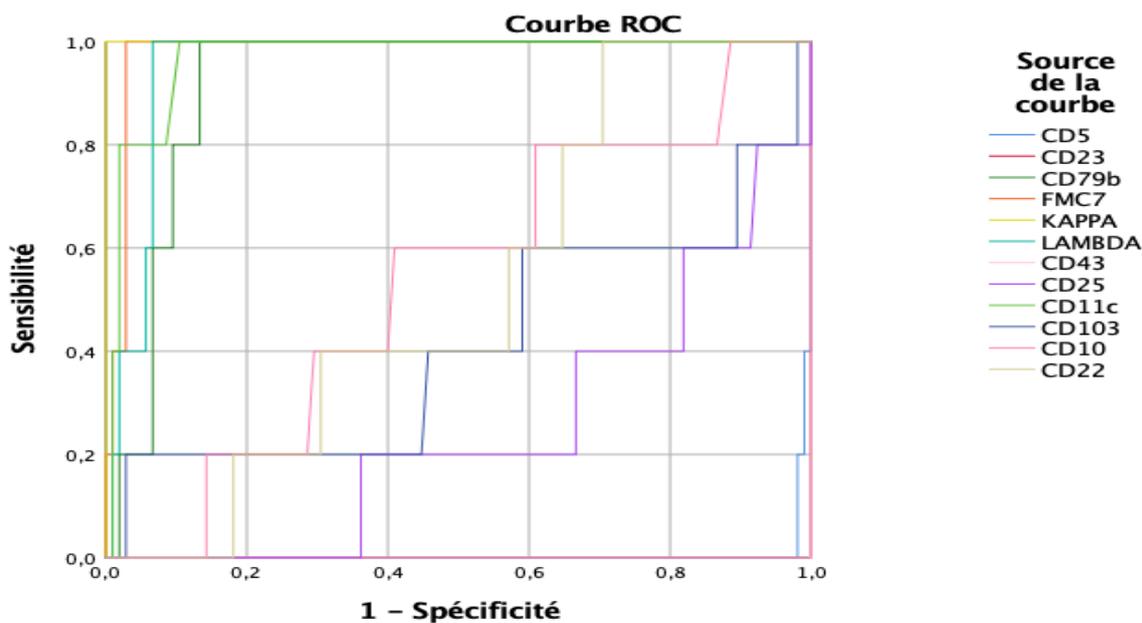


Figure 67. Récapitulatifs des marqueurs

Tableau 59. Variables de résultats tests les plus discriminants

CD79b/Kappa/Lambda/FMC7/CD11c

Variable(s) de résultats tests	Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
		Borne inférieur	Borne supérieur
CD79b	0.884	.817	.951
KAPPA	1.000	1.000	1.000
LAMBDA	0.959	.921	.997
FMC7	0,930	884	977
CD11c	927	874	980

Les valeurs les plus grandes de la ou des variables de résultats tests indiquent une probabilité plus élevée pour un état réel positif.

4. Marqueurs du LF :

Courbe I : IMF de CD5 dans le LF

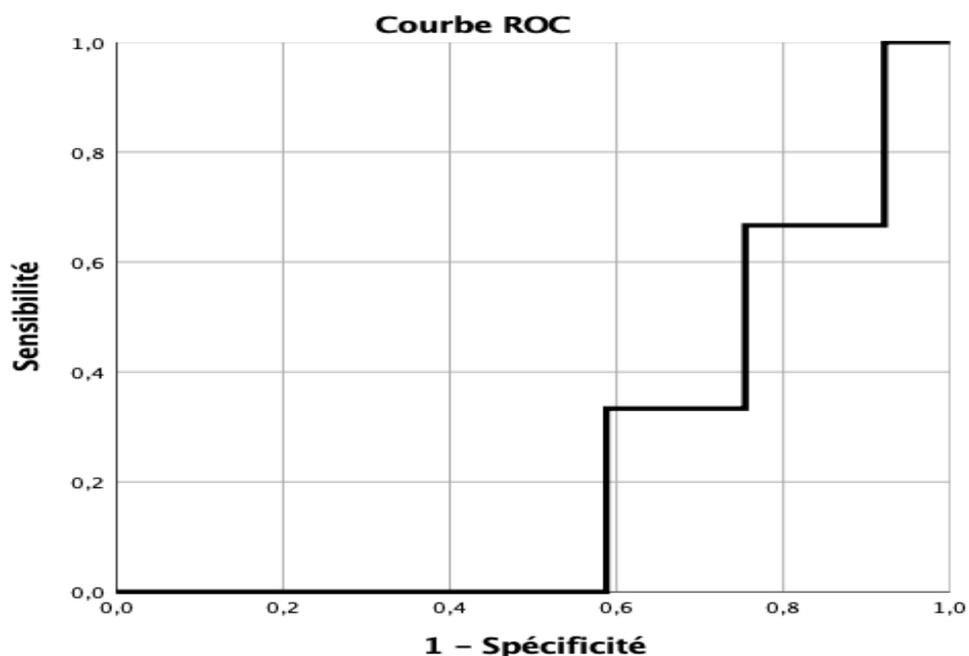


Figure 68. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD5; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 60. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,246	,078	,413

Une valeur de IMF du CD5 supérieure à 6258 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 80% ; AUC = 246 ; IC à 95% [0.078 : 0.413].

Courbe II : IMF de CD23 dans le LF

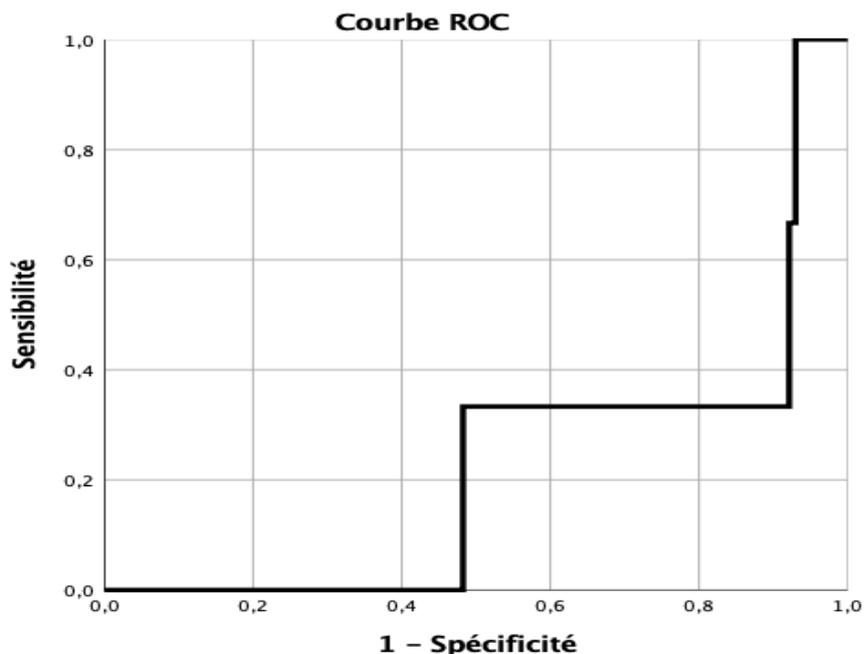


Figure 69. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD23; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 61. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,222	,000	,465

Une valeur de IMF du CD23 supérieure à 7160 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 80% ; AUC = 222 ; IC à 95% [0.000 : 0.465].

Courbe III : IMF de CD79b dans le LF

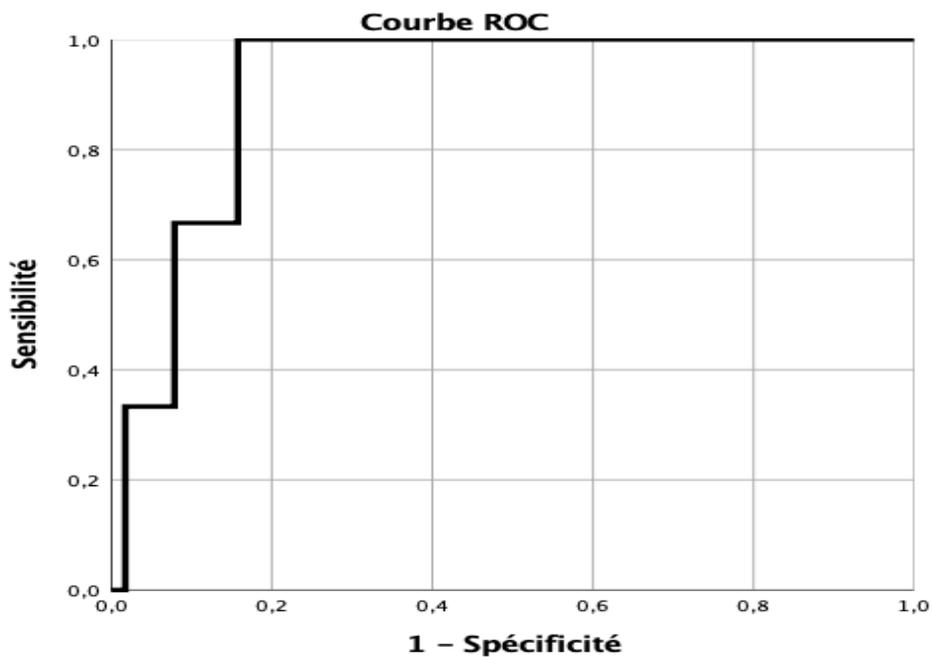


Figure 70. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD79b; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 62. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,915	,837	,993

Une valeur de IMF du CD79b supérieure à 43001.50 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 98% ; AUC = 915 ; IC à 95% [0.837 : 0.993].

Courbe IV : IMF de FMC7 dans le LF

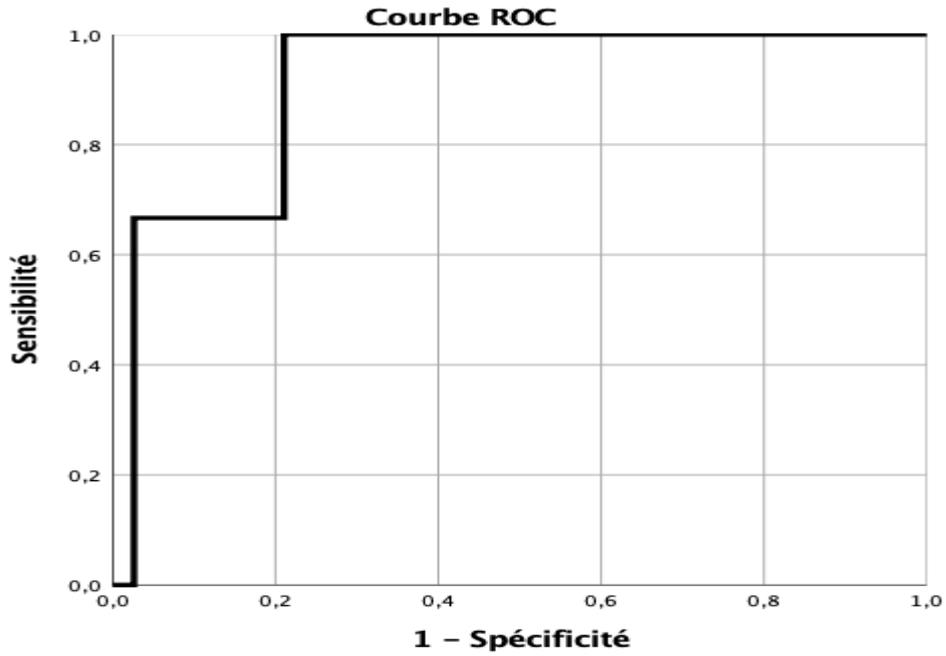


Figure 71. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du FMC7; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 63. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,912	,806	1,000

Une valeur de IMF du FMC7 supérieure à 10202 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 97% ; AUC = 912 ; IC à 95% [0.806 : 1.000].

Courbe V : IMF de Kappa /Lambda dans le LF

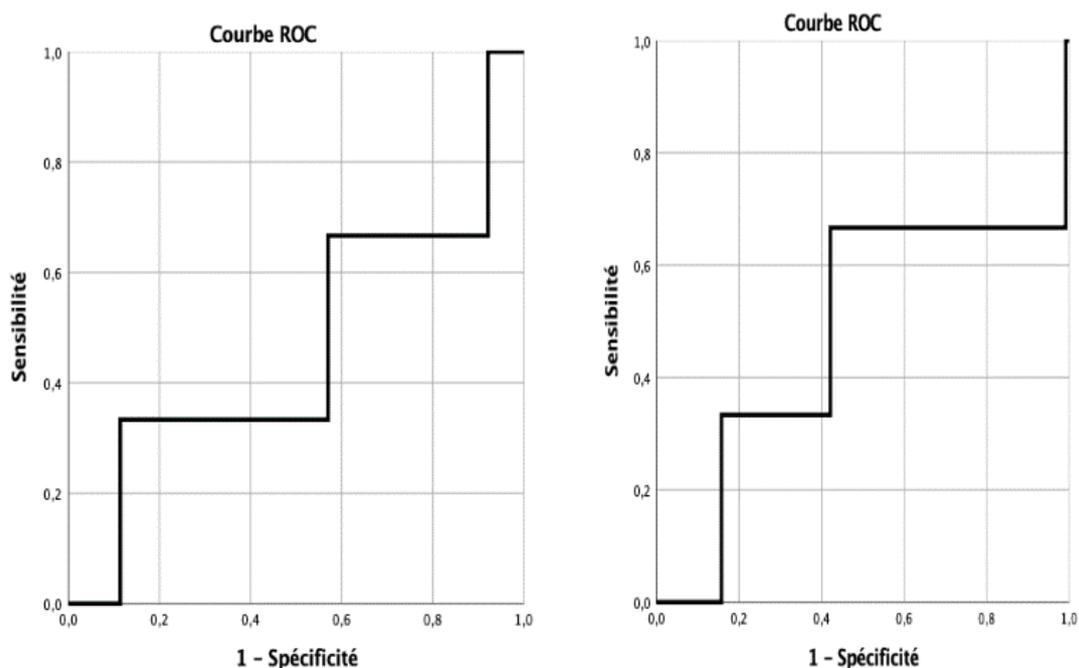


Figure 72. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du Kappa et Lambda; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 64. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LF Tableau : variable de résultats tests : Lambda /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,465	,087	,843

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,477	,079	,874

Une valeur de IMF du kappa supérieure à 8752 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 88%, MFI lambda supérieur à 3048 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 84%.

AUC kappa = 0.465 et AUC lambda = 0.477 ; IC à 95% [0.087 : 0.843], [0.079 : 0.874] respectivement.

Courbe VI : IMF de CD43 dans le LF

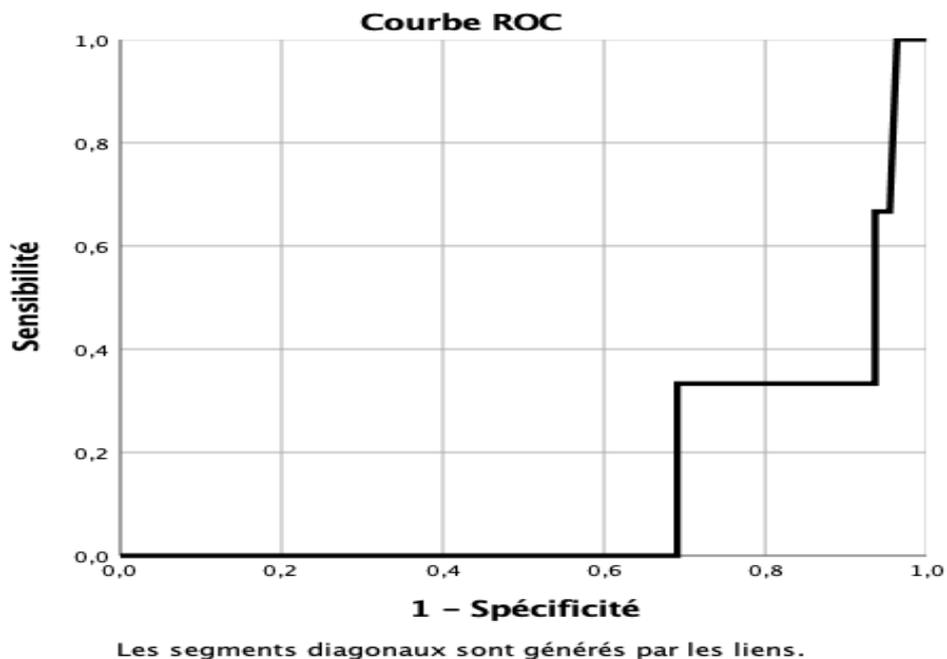


Figure 73. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD43; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 65. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,138	,000	,284

Une valeur de IMF du CD43 supérieure à 4353.5 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 90% ; AUC = 138 ; IC à 95% [0.000 : .284].

Courbe VII : IMF de CD38 dans le LF

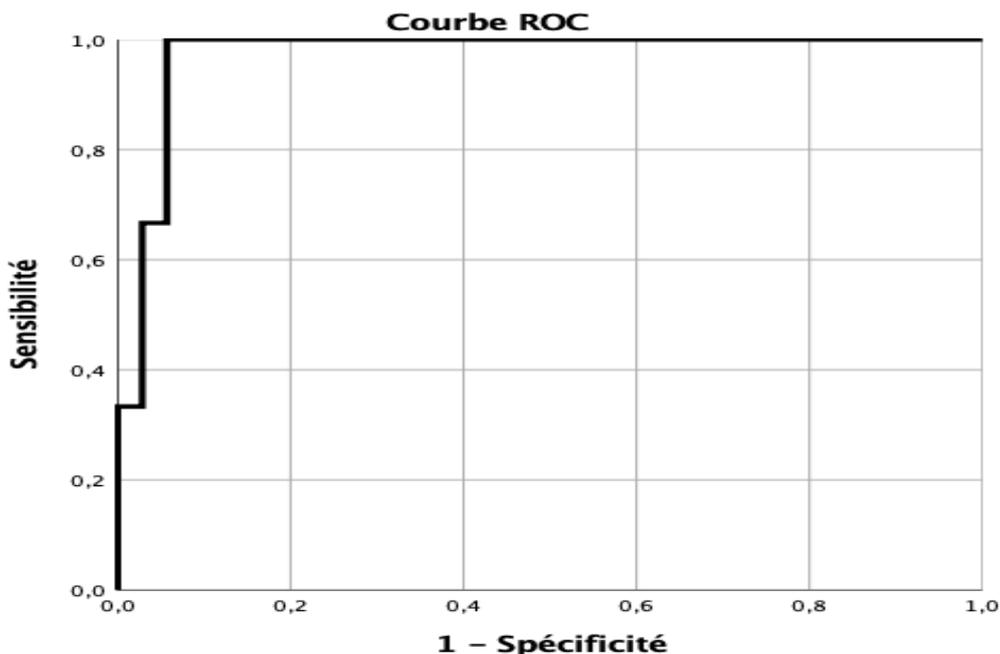


Figure 74. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD38; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 66. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,971	,934	1,000

Une valeur de IMF du CD38 supérieure à 13528.50 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 67% et une spécificité de 94% ; AUC = ,971 ; IC à 95% [0.934 : 1.000].

Courbe VIII : IMF de CD25 dans le LF

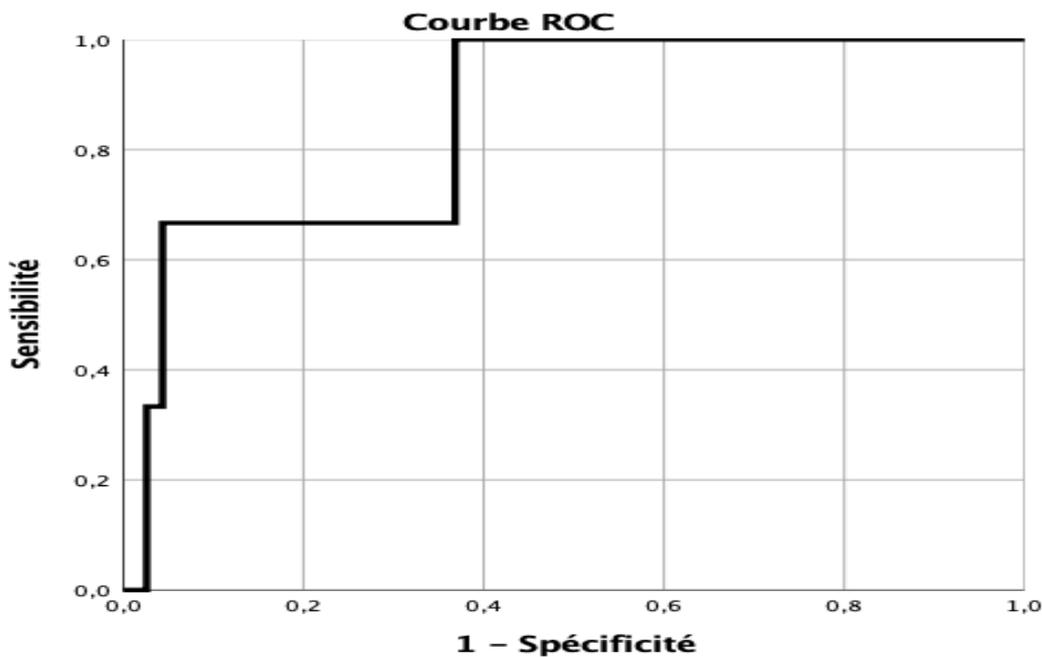


Figure 75. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD25; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 67. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,854	,670	1,000

Une valeur de IMF du CD25 supérieure à 2154 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 97% ; AUC = 854 ; IC à 95% [0.670 : 1.000].

Courbe IX : IMF de CD11c dans le LF

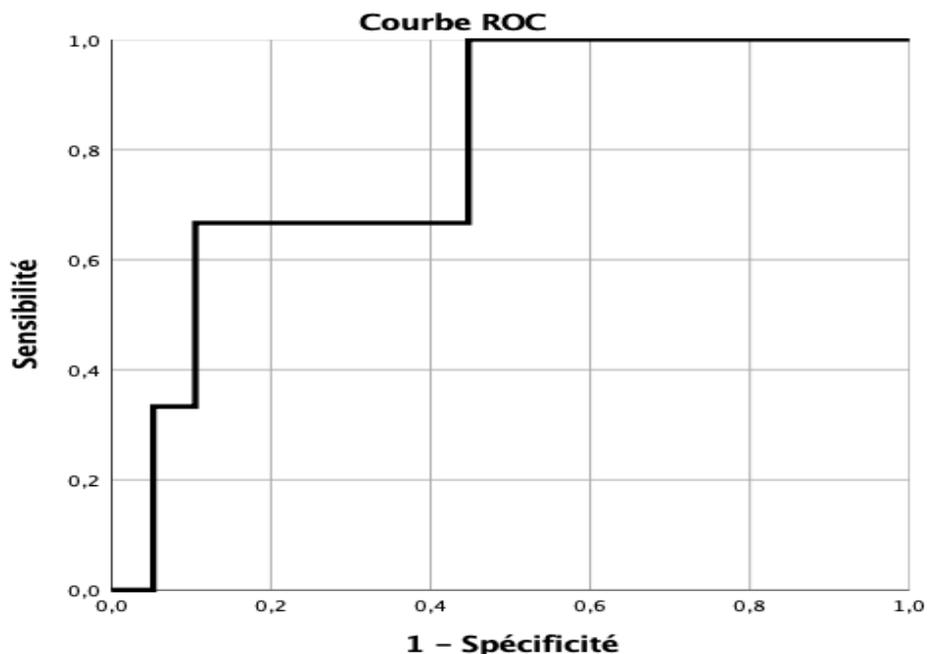


Figure 76. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD11c; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 68. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,798	,593	1,000

Une valeur de IMF du CD11C supérieure à 1116.50 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 94% ; AUC= 798 ; IC à 95% [0.593 : 1.000].

Courbe X : IMF de CD103 dans le LF

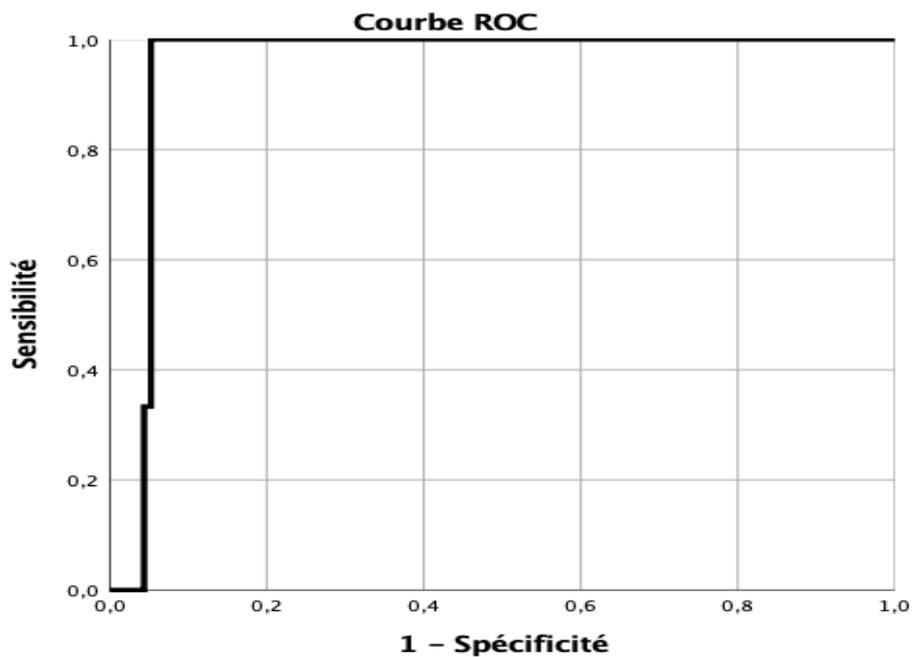


Figure 77. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD103; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 69. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,950	,911	,990

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 2016.50 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 33% et une spécificité de 94% ; AUC = 950 ; IC à 95% [0.911 : 0.990].

Courbe XI : IMF de CD10 dans le LF

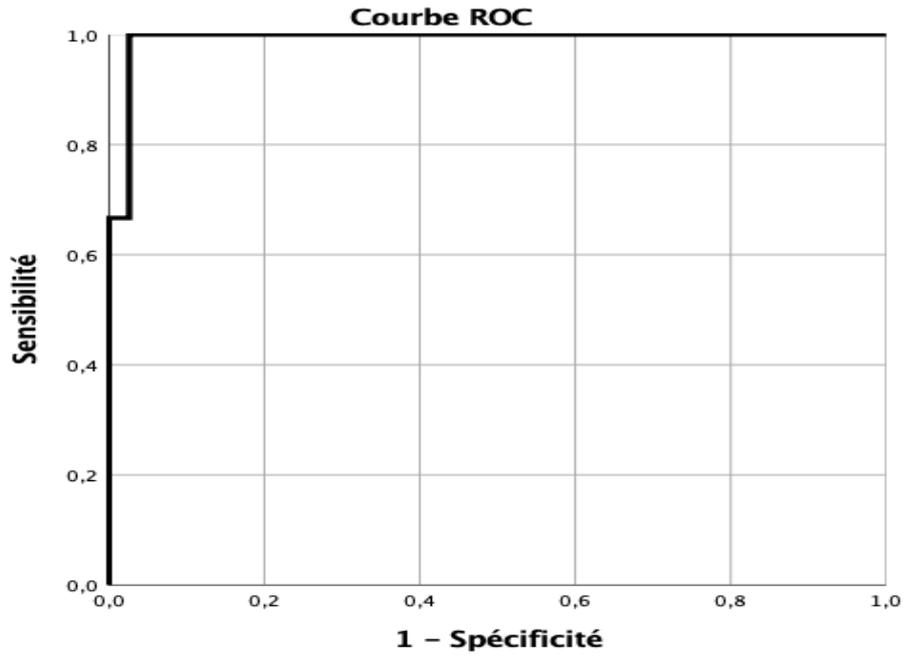


Figure 78. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD10; pour LF versus non LF dans les SLPC-B.

Tableau 70. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LF

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,991	,972	1,000

Une valeur de IMF du CD10 supérieure à 1310.50 permet d'évoquer un LF avec une sensibilité de 66% et une spécificité de 97% ; AUC = 991 ; IC à 95% [0.972 : 1.000].

Courbe XII : Récapitulatif de traitement des observations

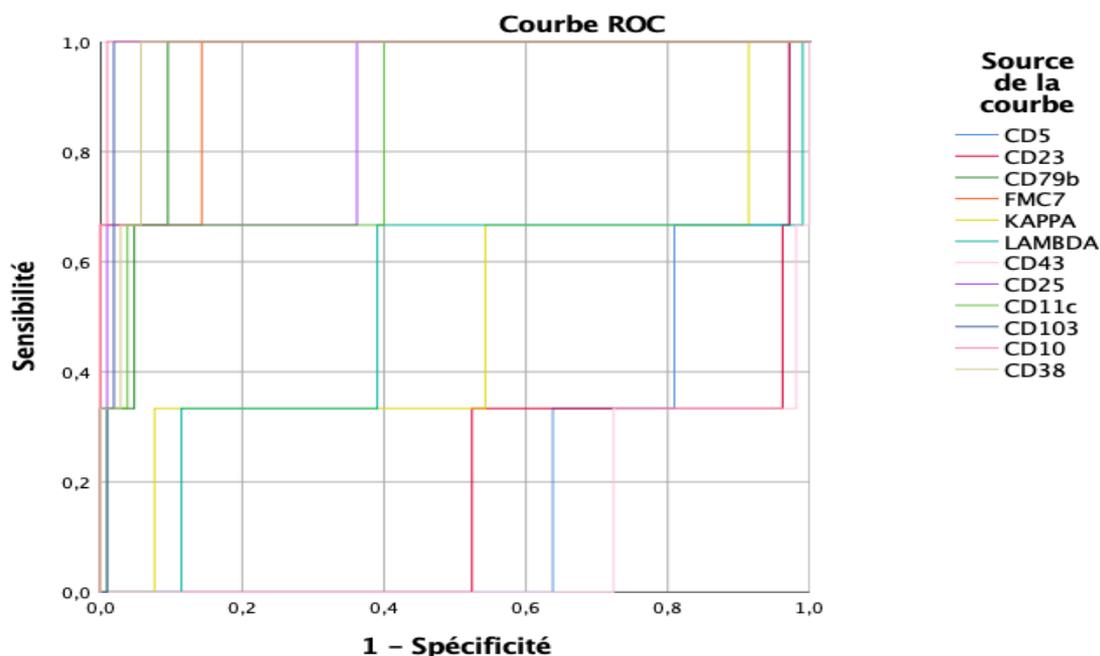


Figure 79. Récapitulatifs des marqueurs

Tableau 71. Variables de résultats tests les plus discriminants

CD10/CD25/CD79b/FMC7/CD38/CD103/CD11c

Variable(s) de résultats tests	Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
		Borne inférieur	Borne supérieur
CD10	0.991	.972	1.000
CD25	0.854	.670	1.000
CD79b	0.915	.837	0.933
FMC7	0.912	.806	1.000
CD38	0.971	.934	1.000
CD103	0.950	.911	0.990
CD11c	0.798	.593	1.000

Les valeurs les plus grandes de la ou des variables de résultats tests indiquent une probabilité plus élevée pour un état réel positif.

5. Marqueurs de LT :

Courbe I : IMF de CD5 dans la LT

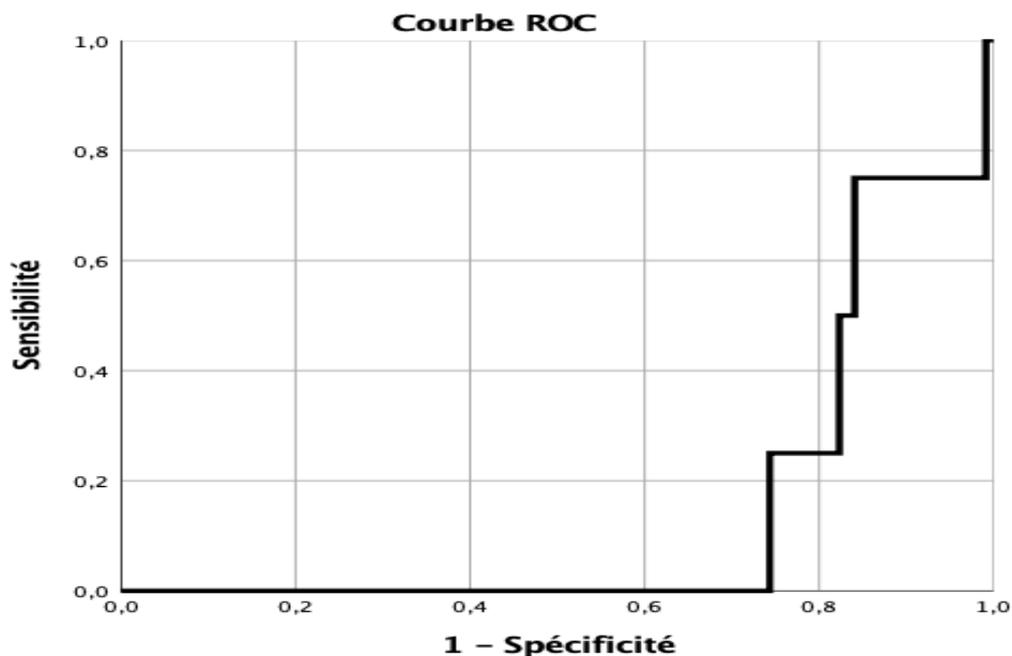


Figure 80. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD5; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 72. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,150	,047	,254

Une valeur de IMF du CD5 supérieure à 6258 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 80% ; AUC = ,150 ; IC à 95% [0.047 : 0.254].

Courbe II : IMF de CD23 dans la LT

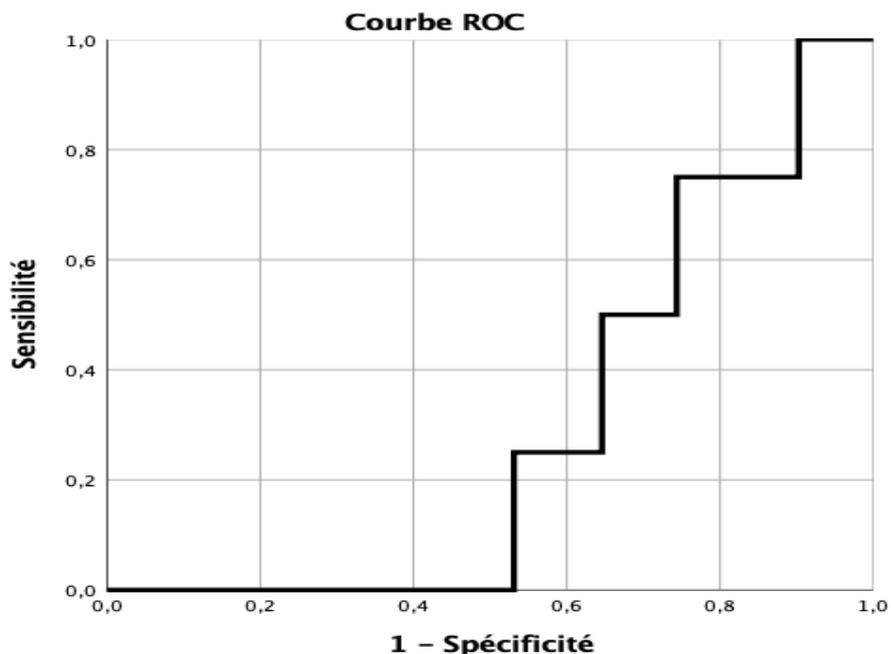


Figure 81. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD23; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 73. Variable(s) de résultats tests : CD23 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,294	,143	,445

Une valeur de IMF du CD23 supérieure à 8121 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 00% et une spécificité de 90% ; AUC = ,294 ; IC à 95% [0.143 : 0.445].

Courbe III : IMF de CD79b dans la LT

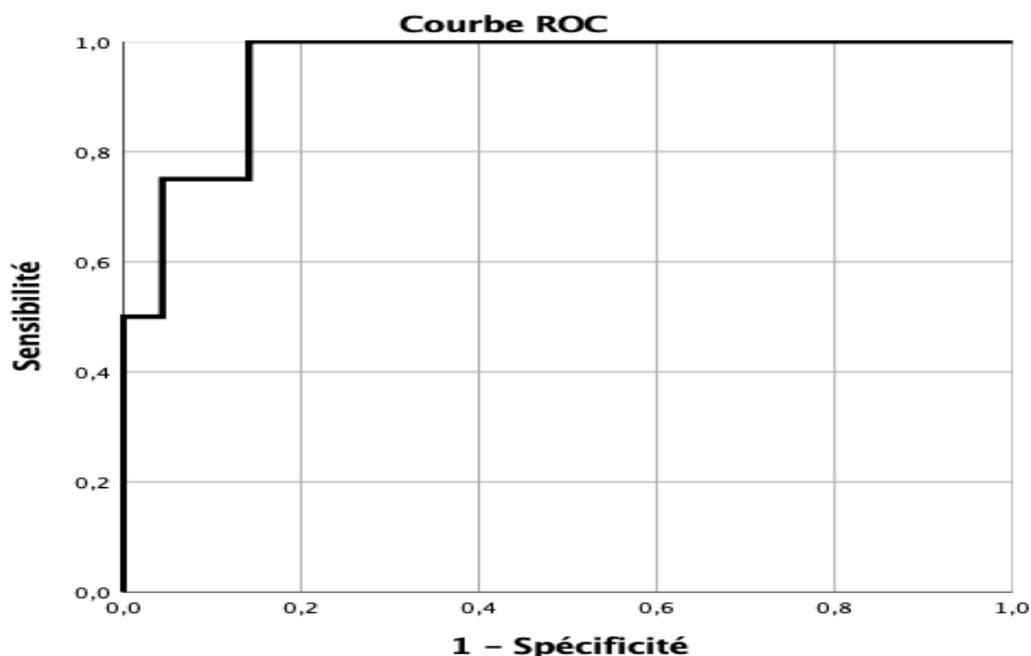


Figure 82. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD79b; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 74. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,954	,891	1,000

Une valeur de IMF du CD79b supérieure à 38501 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 98% ; AUC = ,954 ; IC à 95% [0.891 : 1.000].

Courbe IV : IMF de FMC7 dans la LT

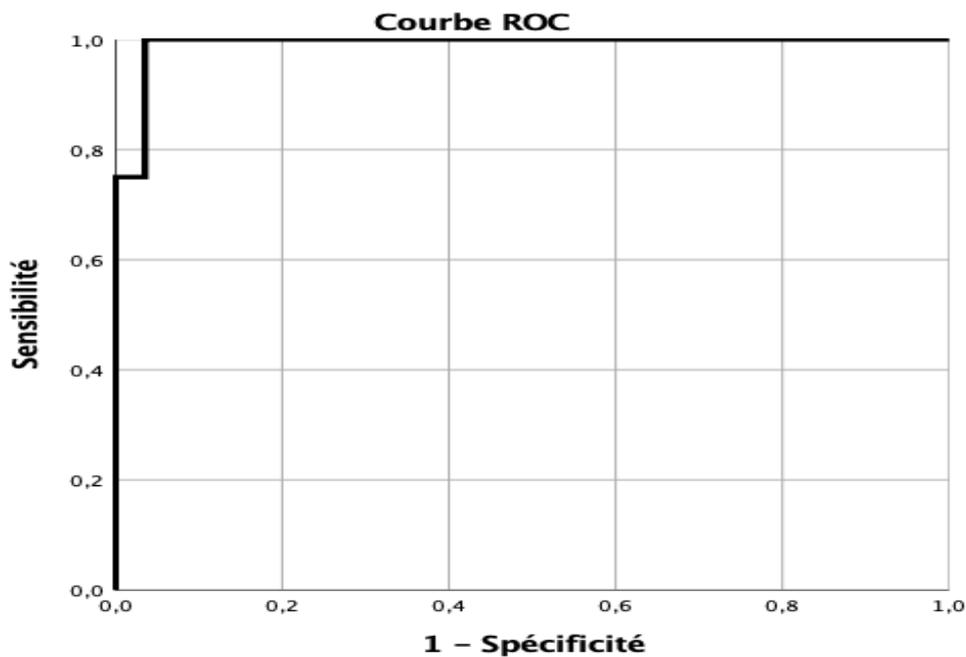


Figure 83. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du FMC7; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 75. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,991	,972	1,000

Une valeur de IMF du FMC7 supérieure à 16057 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 100% ; AUC = ,991 ; IC à 95% [0.972 : 1.000].

Courbe V : IMF de Kappa/Lambda dans la LT

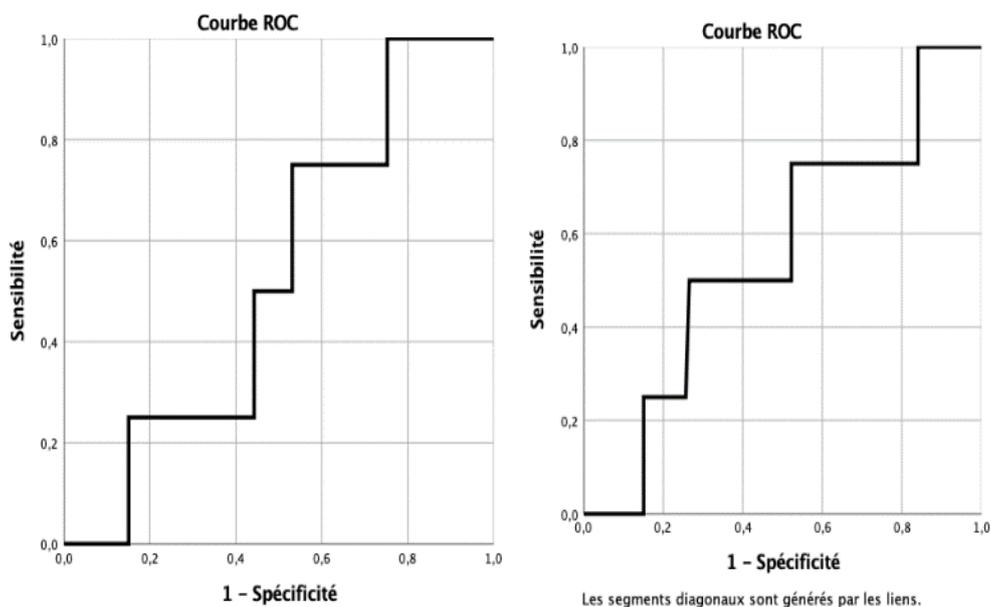


Figure 84. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du Kappa et Lambda; pour LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 76. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LT & Lambda /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %		Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur		Borne inférieur	Borne supérieur
,531	,308	,754	,556	,288	,825

Des valeurs de IMF du kappa et lambda supérieure à 2996 et 3535, respectivement permet d'évoquer une LT avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 80% et 85% respectivement.

AUC kappa = 0.531 et AUC lambda = 0.556 ; IC à 95% [0.308 : 0.754], [0.288 : 0.825] respectivement.

Courbe VI : IMF de CD25 dans la LT

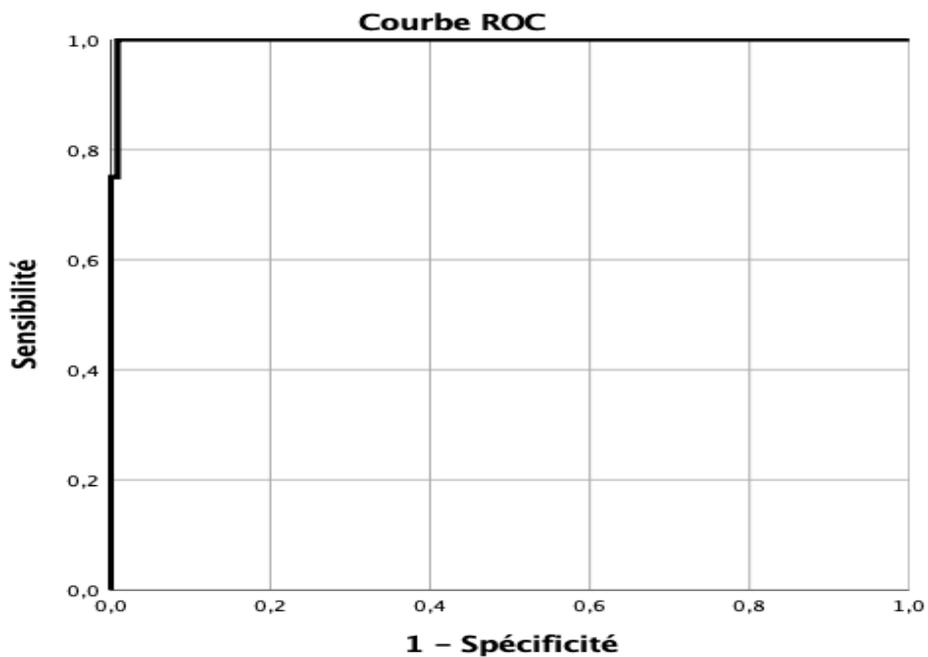


Figure 85. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD25; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 77. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,998	,991	1,000

Une valeur de IMF du CD25 supérieure à 2154 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 99% ; AUC= ,998 ; IC à 95% [0.991 : 1.000].

Courbe VII : IMF de CD11c dans la LT

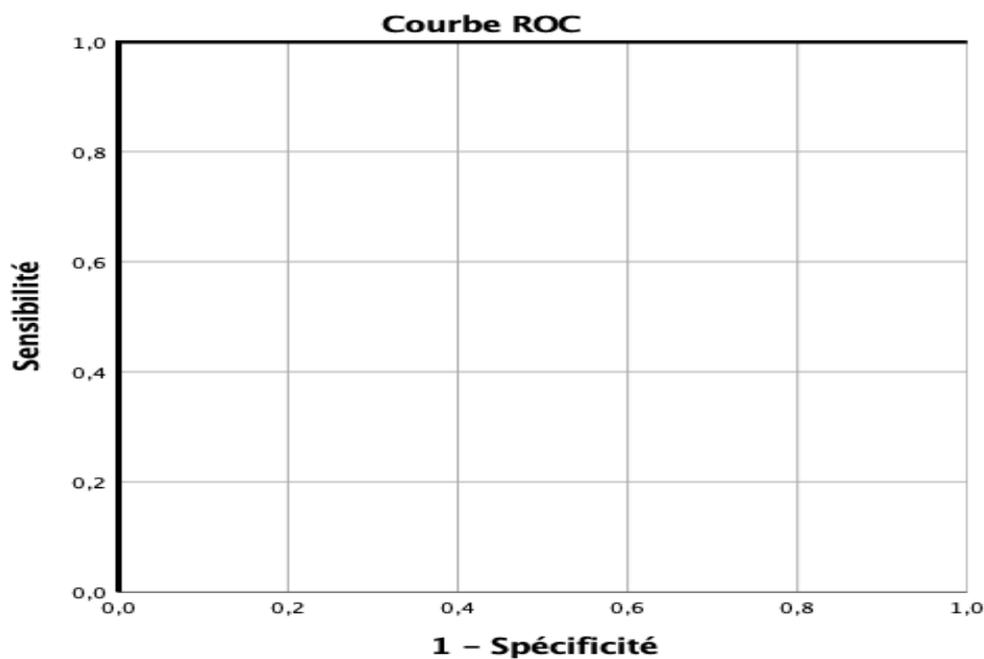


Figure 86. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD11c; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 78. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
1,000	1,000	1,000

Une valeur de IMF du CD11C supérieure à 21336 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 100% ; AUC = 1,000 ; IC à 95% [1.000 : 1.000].

Courbe VIII : IMF de CD103 dans la LT

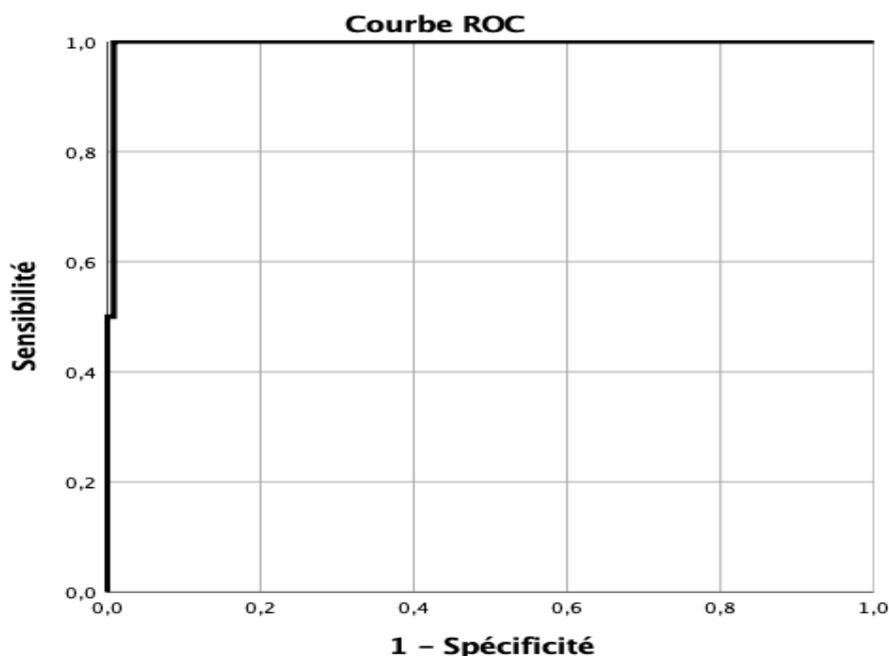


Figure 87. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD103; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 79. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,996	,985	1,000

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 46612.50 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 100% ; AUC = ,996 ; IC à 95% [.985 : 1.000].

Courbe IX : IMF de CD10 dans la LT

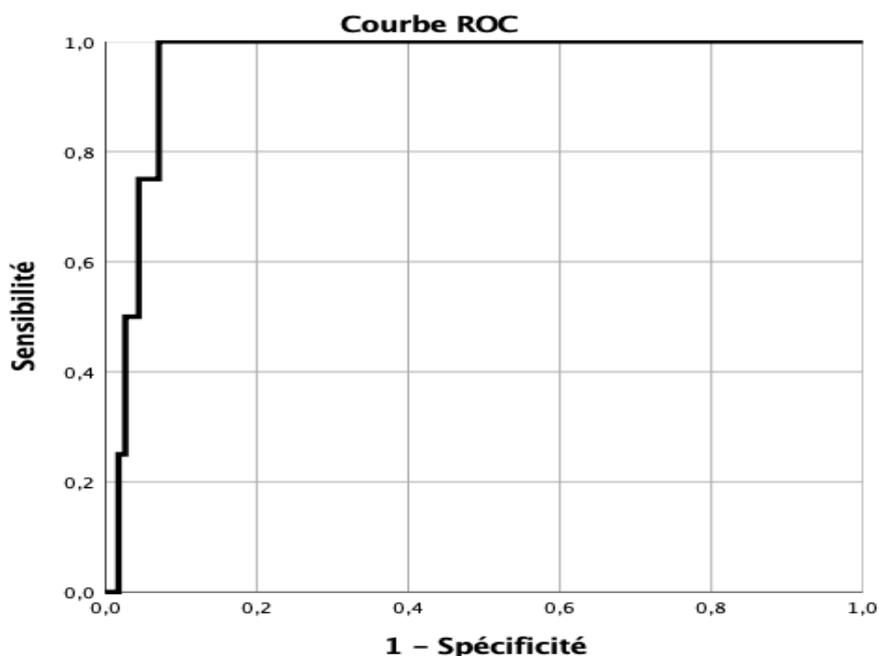


Figure 88. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD10; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 80. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,960	,923	,998

Une valeur de IMF du CD10 supérieure à 1117 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 25% et une spécificité de 97% ; AUC= ,960 ; IC à 95% [.923 : .998].

Courbe X : IMF de CD22 dans la LT

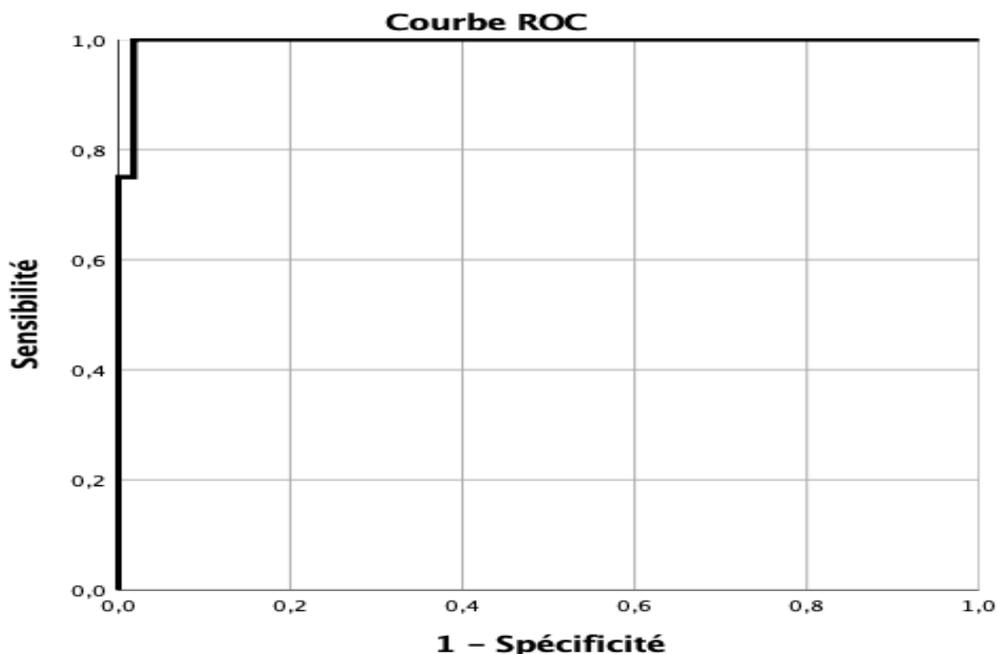


Figure 89. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD22; pour la LT versus non LT dans les SLPC-B.

Tableau 81. Variable(s) de résultats tests : CD22 /LT

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,995	,984	1,000

Une valeur de IMF du CD22 supérieure à 22056.50 permet d'évoquer un LT avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 100% ; AUC = ,995 ; IC à 95% [.984 : 1.000].

Courbe XI : Récapitulatif de traitement des observations

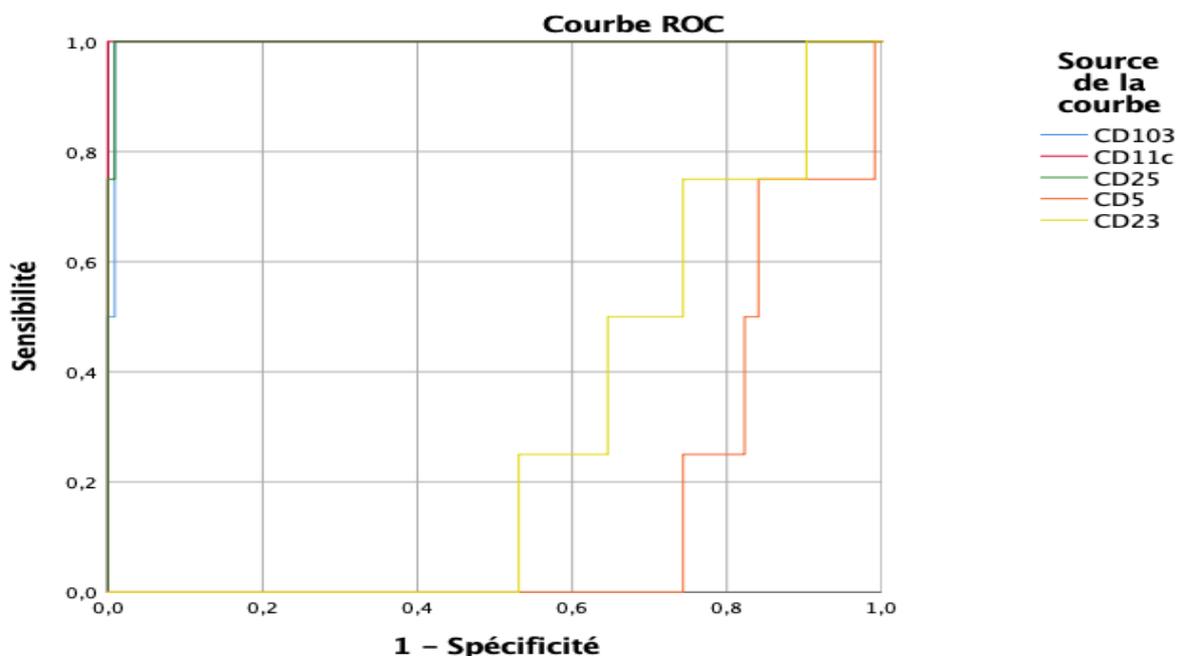


Figure 90. Récapitulatifs des marqueurs

Tableau 82. Variables de résultats tests les plus discriminants
CD25/CD11c/CD103/CD79b/CD22/FMC7

Variable(s) de résultats tests	Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
		Borne inférieur	Borne supérieur
CD25	0.998	.991	1.000
CD11c	1.000	1.000	1.000
CD103	0.996	.985	1.000
CD79b	0.954	.891	1.000
CD22	0.995	.984	1.000
FMC7	0.991	.891	1.000

Les valeurs les plus grandes de la ou des variables de résultats tests indiquent une probabilité plus élevée pour un état réel positif.

6. Marqueurs pour LZMS

Courbe I : IMF de CD5 dans la LZMS

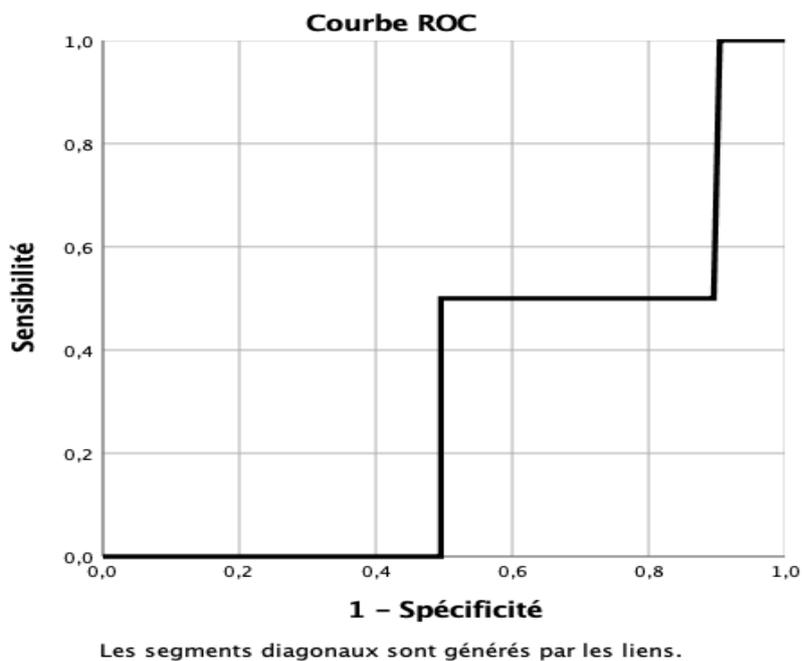


Figure 91. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD5; pour la LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 83. Variable(s) de résultats tests : CD5 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,302	,014	,591

Une valeur de IMF du CD5 supérieure à 6258 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 81% ; AUC = ,302 ; IC à 95% [.014 : 0.591].

Courbe II : IMF de CD23 dans le LZMS

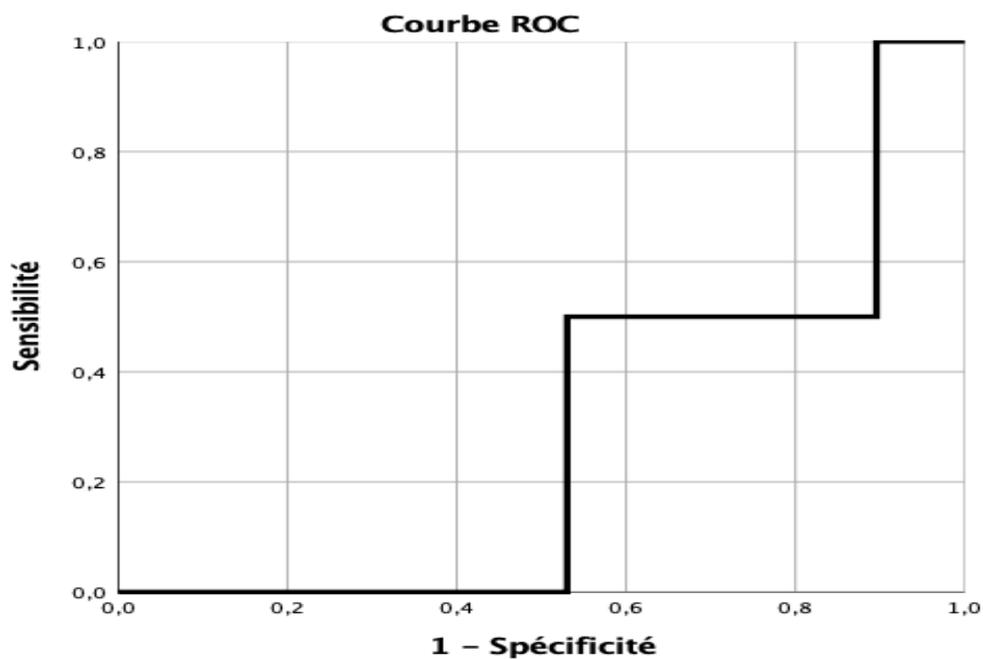


Figure 92. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD23; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 84 . Variable(s)de résultats tests : CD23 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,287	,025	,549

Une valeur de IMF du CD23 supérieure à 8002.50 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 88% ; AUC = ,287 ; IC à 95% [.025 : 0.549].

Courbe III : IMF de CD79b dans le LZMS

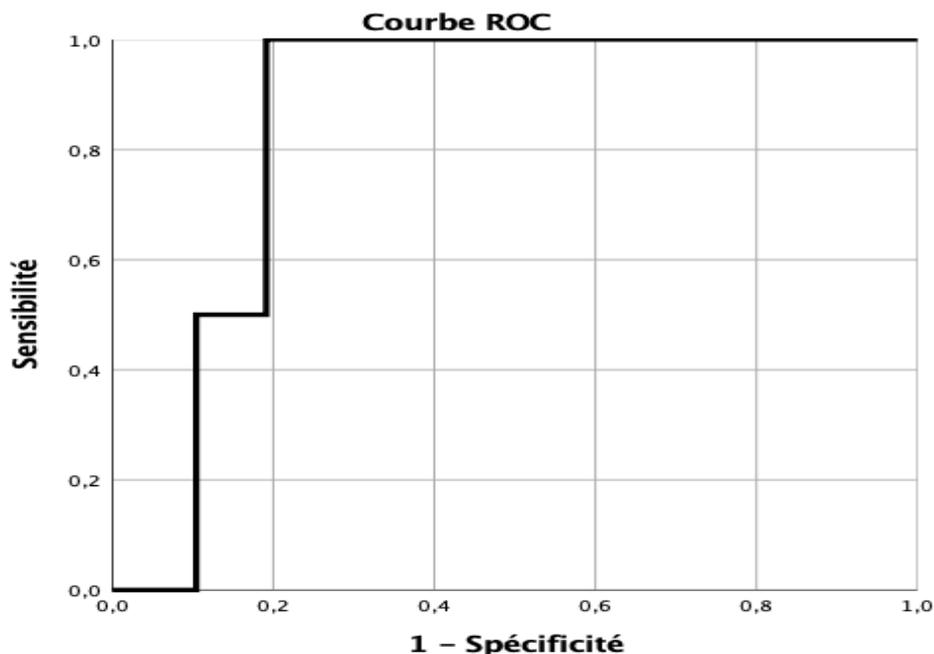


Figure 93. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD79b; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 85. Variable(s) de résultats tests : CD79b /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,852	,766	,938

Une valeur de IMF du CD79b supérieure à 22115 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 89% ; AUC = ,852 ; IC à 95% [.766 : 0.938].

Courbe IV : IMF de FMC7 dans le LZMS

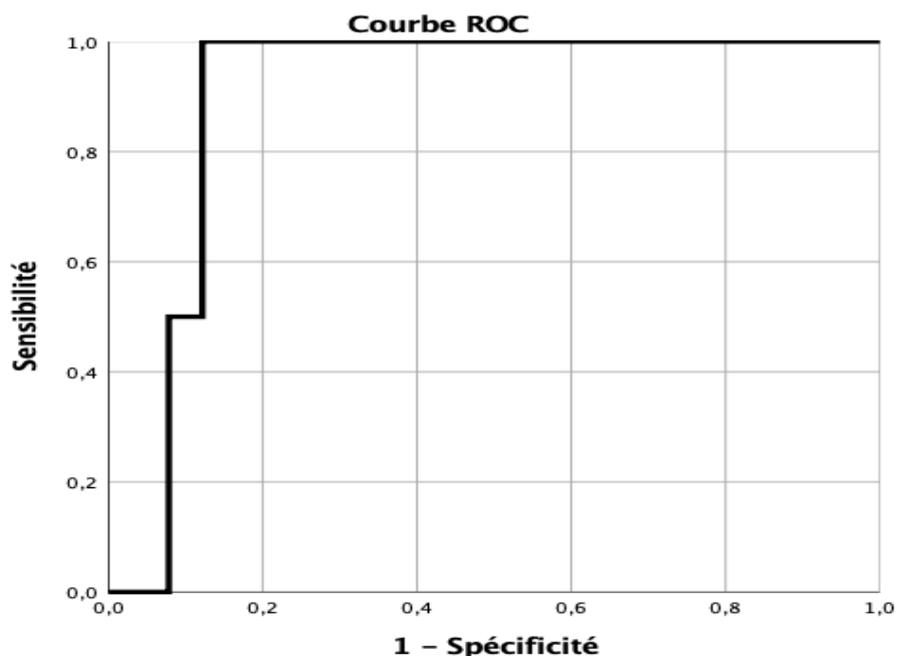


Figure 94. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du FMC7; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 86. Variable(s) de résultats tests : FMC7 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,900	,839	,961

Une valeur de IMF du FMC7 supérieure à 2337 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 92% ; AUC = ,900 ; IC à 95% [.839 : 0.961].

Courbe V : IMF de Kappa/Lambda dans le LZMS

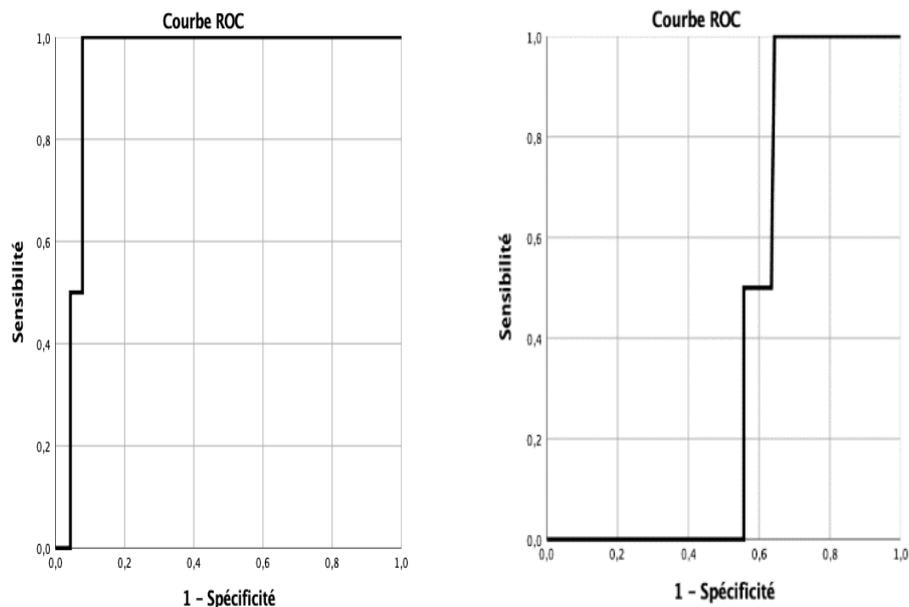


Figure 95. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du Kappa et Lambda; pour LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 87. Variable(s) de résultats tests : Kappa /LZMS & Lambda /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %		Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur		Borne inférieur	Borne supérieur
,939	,891	,988	,402	,298	,507

Une valeur de IMF du KAPPA supérieure

à 17178.50 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 95%. MFI lambda supérieur à 2900.50 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 80%.

AUC kappa = 0.939 et AUC lambda = 0.402 ; IC à 95% [0.891 : 0.988], [0.298 : 0.507] respectivement.

Courbe VI : IMF du CD43 dans le LZMS

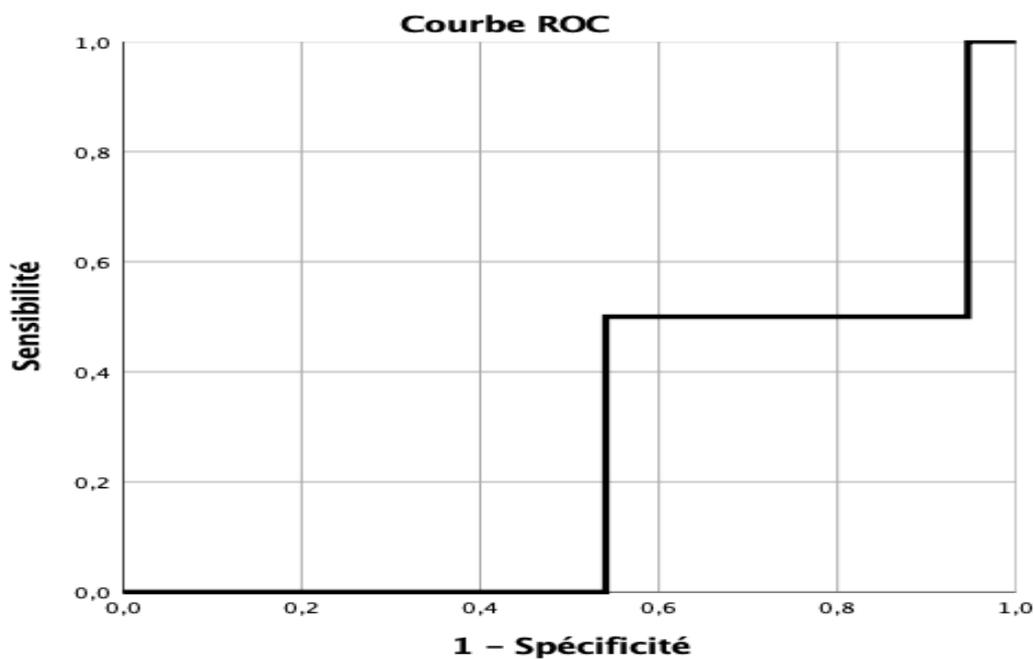


Figure 96. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD43; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 88. Variable(s) de résultats tests : CD43 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,257	,000	,545

Une valeur de IMF du CD43 supérieure à 3428 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 0% et une spécificité de 80% ; AUC= ,257 ; IC à 95% [.000 : 0.545].

Courbe VII : IMF du CD38 dans le LZMS

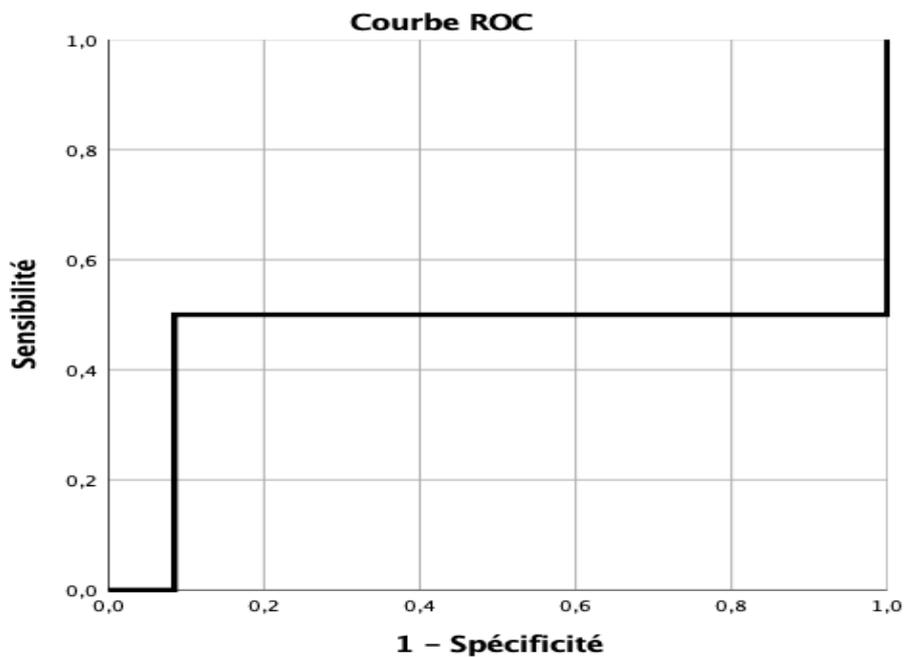


Figure 97. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD38; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 89. Variable(s) de résultats tests : CD38 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,458	,000	1,000

Une valeur de IMF du CD38 supérieure à 8902.50 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 90% ; AUC = ,458 ; IC à 95% [.000 : 1.000].

Courbe VIII : IMF du CD25 dans le LZMS

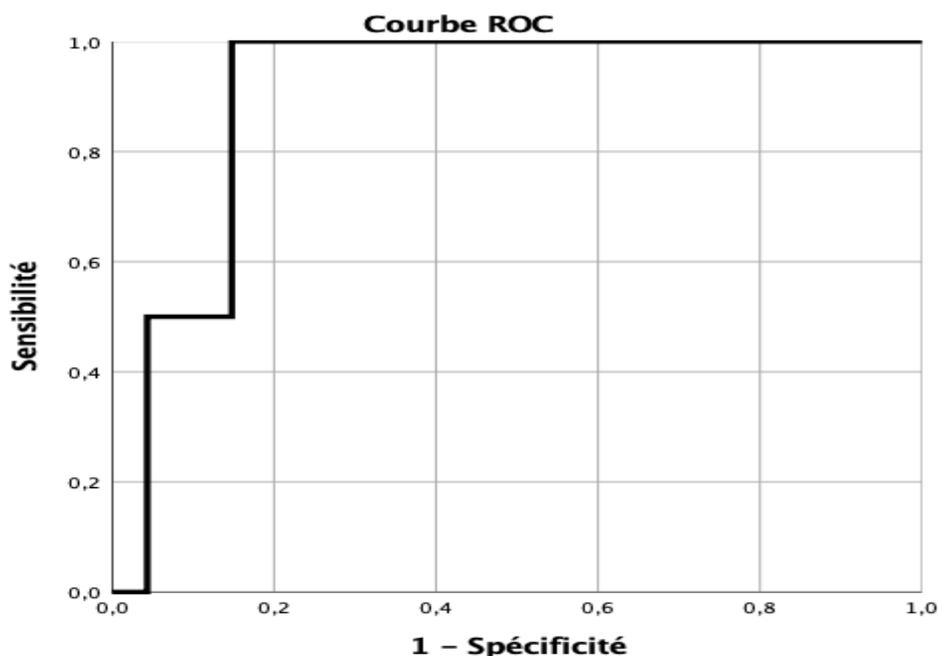


Figure 98. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD25; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 90. Variable(s) de résultats tests : CD25 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,904	,817	,992

Une valeur de IMF du CD25 supérieure à 666 permet d'évoquer une LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 90% ; AUC = ,904 ; IC à 95% [.817 : 0.992].

Courbe IX : IMF du CD11c dans le LZMS

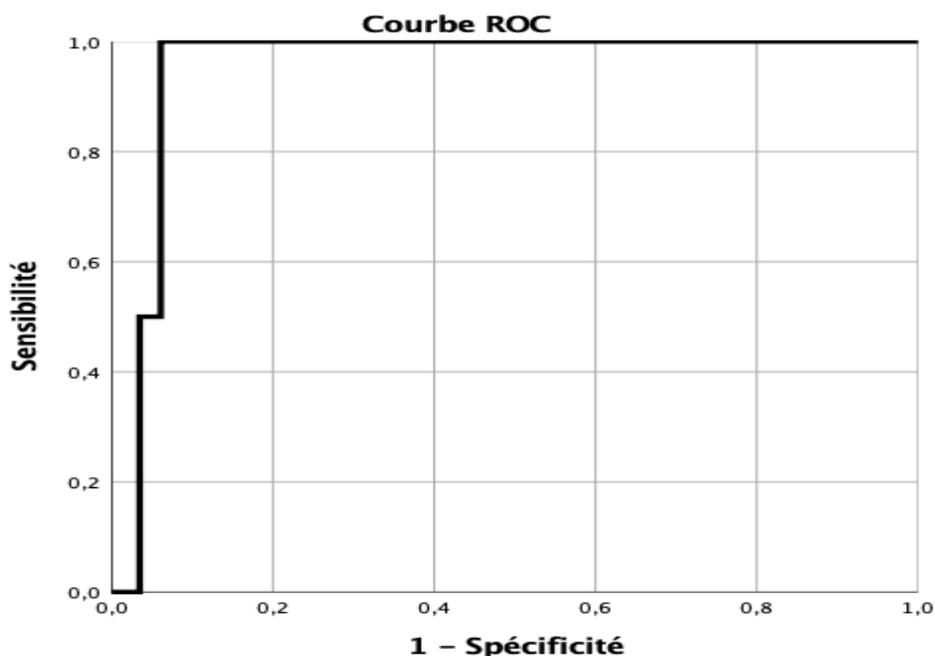


Figure 99. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD11c; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 91. Variable(s) de résultats tests : CD11c /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,952	,911	,994

Une valeur de IMF du CD11c supérieure à 842 permet d'évoquer une LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 93% ; AUC = ,952 ; IC à 95% [.911 : 0.994].

Courbe X : IMF du CD103 dans le LZMS

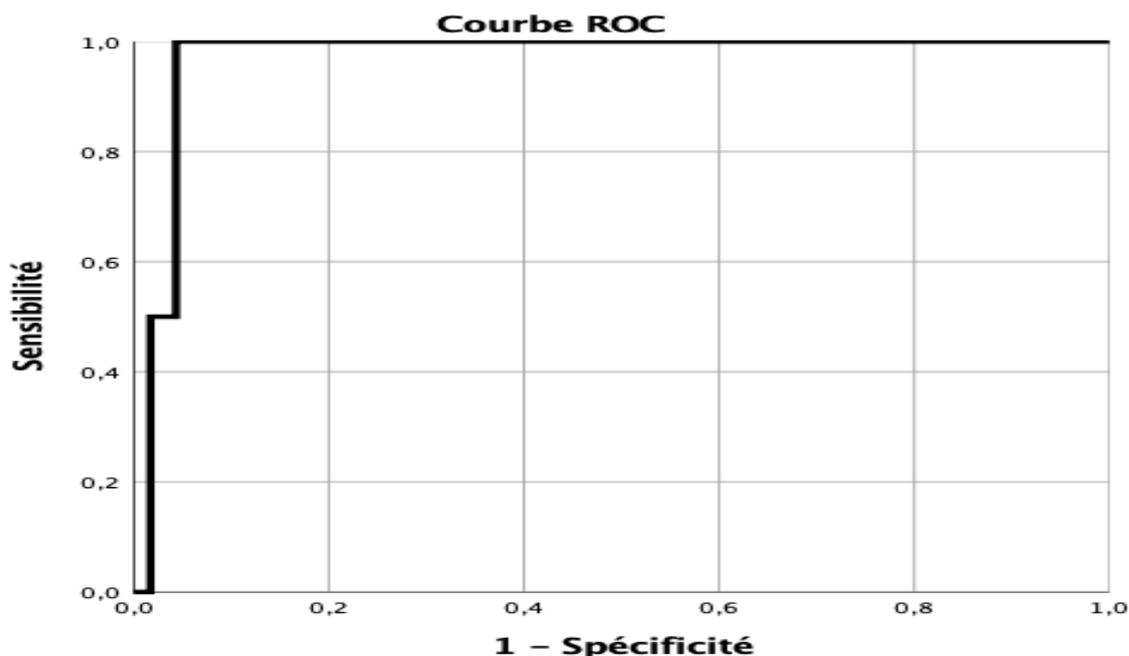


Figure 100. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD103; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 92. Variable(s) de résultats tests : CD103 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,970	,935	1,000

Une valeur de IMF du CD103 supérieure à 2781 permet d'évoquer une LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 90%; AUC = ,952 ; IC à 95% [.935 : 1.000].

Courbe XI : IMF du CD22 dans le LZMS

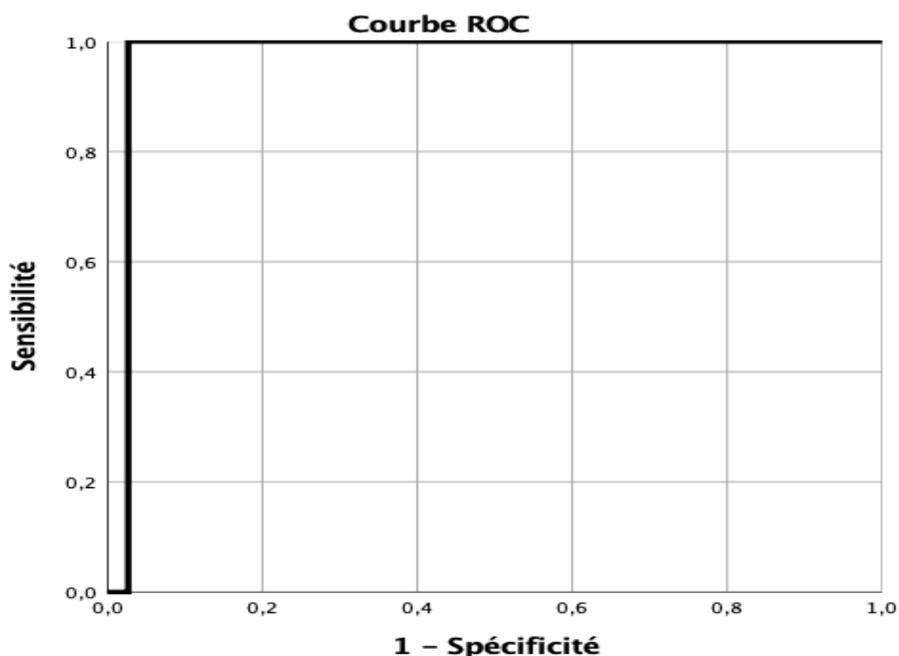


Figure 101. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD22; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 93. Variable(s)de résultats tests : CD22 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,973	,943	1,000

Une valeur de IMF du CD22 supérieure à 19616.50 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 97% ; AUC = ,973 ; IC à 95% [.943 : 1.000].

Courbe XII : IMF du CD10 dans le LZMS

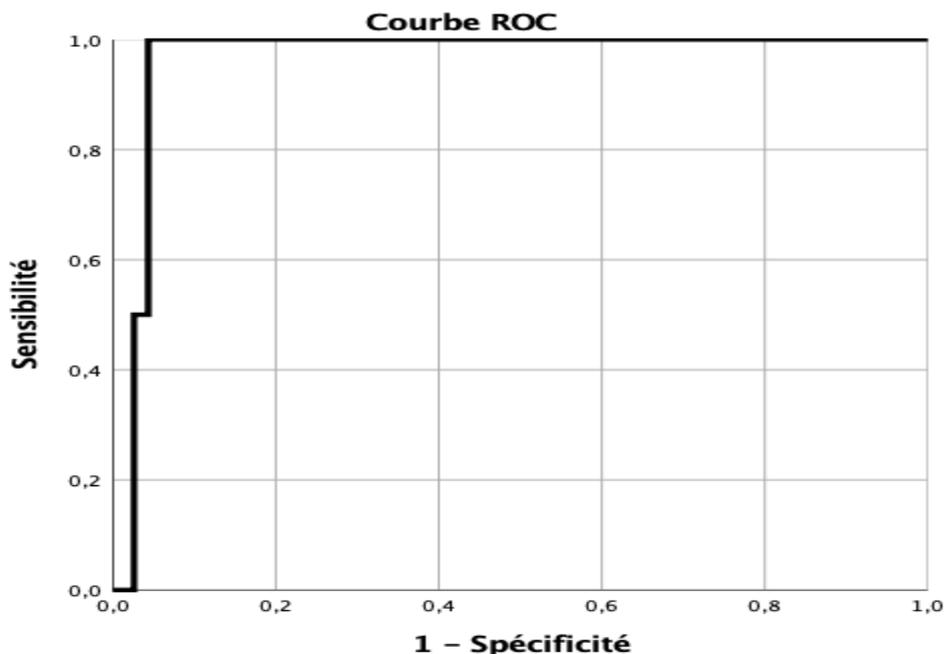


Figure 102. Courbe ROC afin de déterminer la valeur prédictive du paramètre d'intérêt : IMF du CD10; pour le LZMS versus non LZMS dans les SLPC-B.

Tableau 94. Variable(s) de résultats tests : CD10 /LZMS

Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
	Borne inférieur	Borne supérieur
,965	,931	1,000

Une valeur de IMF du CD10 supérieure à 904 permet d'évoquer un LZMS avec une sensibilité de 50% et une spécificité de 95% ; AUC = ,961 ; IC à 95% [.931 : 1.000].

Courbe XIII : Récapitulatif de traitement des observations

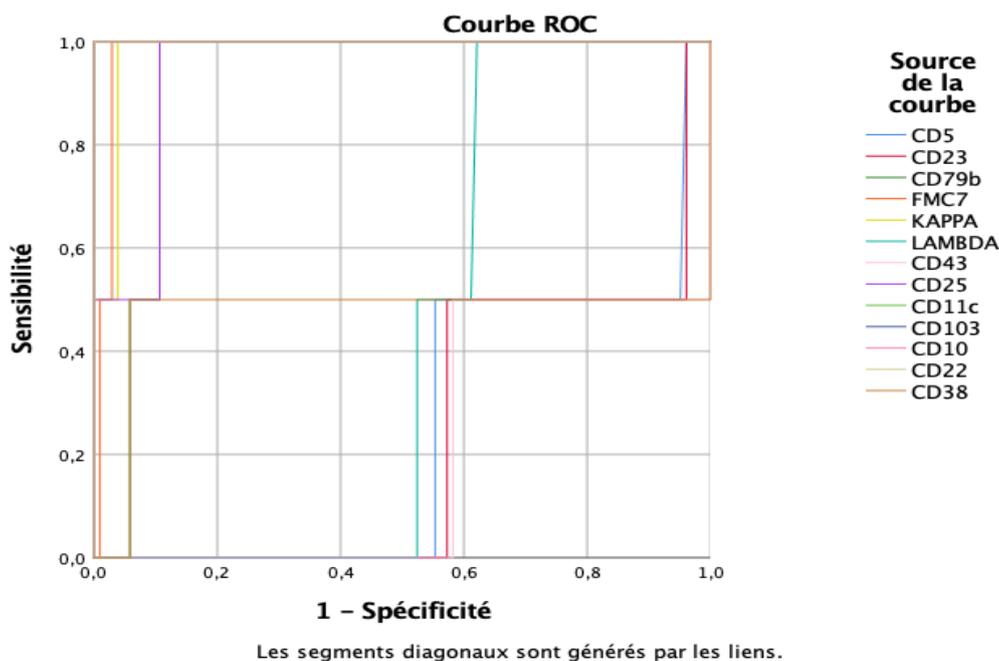


Figure 103. Récapitulatifs des marqueurs

Tableau 95. Variables de résultats tests les plus discriminants

CD25/CD22/CD10/CD79b/Kappa/CD103/CD11C/FMC7

Variable(s) de résultats tests	Zone sous la courbe	Intervalle de confiance asymptotique à 95 %	
		Borne inférieur	Borne supérieur
CD10	0.965	.931	1.000
CD22	0.973	.943	1.000
CD79b	0.852	.766	0.938
CD25	0.904	.817	0.992
KAPPA	0.939	.891	0.988
FMC7	0.900	.839	0.961
CD103	0.970	0.935	1.000
CD11c	0.952	0.911	0.994

Les valeurs les plus grandes de la ou des variables de résultats tests indiquent une probabilité plus élevée pour un état réel positif.

III. Etude du pouvoir discriminant de chaque marqueur et évaluation de scores à visée diagnostique (score de Matutes)

On va détailler la leucémie lymphoïde chronique car les autres pathologies présentent un petit échantillon : Les résultats ne sont pas statistiquement significatifs et aucune conclusion fiable ne peut être tirée.

1. Exploitation des marqueurs les plus discriminants dans la LLC :

1.1. Valeurs seuils selon une meilleure spécificité :

A partir des courbes ROC on a pu retirer les marqueurs les plus discriminants et on a fixé des valeurs seuils selon une meilleure spécificité.

Tableau 96. Valeur seuil selon une meilleure spécificité

Marqueurs	Sensibilité%	Spécificité%	Valeur seuil
CD5	33	100	5224
CD23	60	96	2838
CD79b	0	96	56661
Igs	0	69	20311
FMC7	0	77	2911 ,50
CD43	48	95	2544,50

1.2. Couplage des marqueurs discriminant de la LLC :

Nous avons tenu à couple les marqueurs les plus discriminants, le but étant d'augmenter la puissance de notre test diagnostique.

Tableau 97. Tableau croisé CD5_5224 * LLC

		LLC	
		0	1
CD5_5224	0	VN 26	FN 61
	1	FP 0	VP 30
Total		26	91

Lors d'un monomarquage avec le CD5 :

- VP (vrais positifs = 30) représentent le nombre d'individus malades avec un test positif,
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un test positif, (le CD5 est strictement négatif sur les lymphocytes B normal)
- FN (faux négatifs = 61) représente le nombre d'individus malades avec un test négatif,
- VN (vrais négatifs = 26) représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

Tableau 98. Tableau croisé CD23_2838 * LLC

		LLC	
		0	1
CD23_2838	0	VN 26	FN 36
	1	FP 0	VP 55
Total		26	91

Lors d'un marquage avec le CD23 :

- VP (vrais positifs = 55) représentent le nombre d'individus malades avec un test positif
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un test positif
- FN (faux négatifs = 36) représente le nombre d'individus malades avec un test négatif
- VN (vrais négatifs = 26) représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

Tableau 99. Tableau croisé CD43_2544,5 * LLC

		LLC	
		0	1
CD43_2544,5	0	VN 22	FN 47
	1	FP 0	VP 44
Total		22	91

Lors d'un marquage avec le CD43 :

- VP (vrais positifs = 55) représentent le nombre d'individus LLC+ avec un test positif,
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non LLC avec un test positif
- FN (faux négatifs = 36) représente le nombre d'individus LLC+ avec un test négatif,
- VN (vrais négatifs = 26) représente le nombre d'individus non LLC avec un test négatif.

Tableau 100. Tableau croisé CD5+CD23 * LLC

		LLC	
		0	1
CD5+CD23	0	VN 26	FN 76
	1	FP 0	VP 15
Total		26	91

Lors le couplage CD5+CD23+ deux marqueurs discriminant :

- VP (vrais positifs = 15) représentent le nombre d'individus malades avec un test positif,
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un test positif
- FN (faux négatifs = 76) représente le nombre d'individus malades avec un test négatif
- VN (vrais négatifs = 26) représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

Tableau 101. Tableau croisé CD5+CD43 * LLC

		LLC	
		0	1
CD5+CD43+	0	VN 22	FN 75
	1	FP 0	VP 16
Total		22	91

Lors le couplage CD5+CD43+ deux marqueurs discriminant :

- VP (vrais positifs = 16) représentent le nombre d'individus malades avec un test positif,
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un test positif
- FN (faux négatifs = 75) représente le nombre d'individus malades avec un test négatif,

- VN (vrais négatifs = 22) représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

Tableau 102. Tableau croisé CD23+CD43 * LLC

		LLC	
		0	1
CD23+CD43	0	VN 22	FN 65
	1	FP 0	VP 26
Total		22	91

Lors le couplage CD23+CD43+ deux marqueurs discriminant :

- VP (vrais positifs = 26) représentent le nombre d'individus malades avec un test positif,
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un test positif
- FN (faux négatifs = 65) représente le nombre d'individus malades avec un test négatif,
- VN (vrais négatifs = 22) représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

Tableau 103. Tableau croisé CD5+CD23+CD43 * LLC

		LLC	
		0	1
CD5+CD23+CD43	0	VN 22	FN 82
	1	FP 0	VP 9
Total		22	91

Lors d'un tri-couplage CD5+CD23+CD43+ on retrouve:

- VP (vrais positifs = 09) représentent le nombre d'individus malades avec un test positif,
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un test positif
- FN (faux négatifs = 82) représente le nombre d'individus malades avec un test négatif,
- VN (vrais négatifs = 22) représente le nombre d'individus non malades avec un test négatif.

1.3. Calculs de Valeur Prédictif Positive et Valeur Prédictif Négatif des marqueurs discriminants :

La valeur prédictive positive (VPP) d'un test est la probabilité que la maladie soit présente quand le résultat du test est positif.

La valeur prédictive négative (VPN) d'un test est la probabilité que la maladie soit absente quand le résultat du test est négatif.

Sensibilité : $VP/VP+FN$	VPP : $VP/VP+FP$
Spécificité : $VN/VN+FP$	VPN : $VN/VN+FN$

Tableau 104. VPP et VPN des marqueurs discriminants

	Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
CD5	32%	100%	100%	29%
CD23	60%	100%	100%	41%
CD43	48%	100%	100%	31%
CD5CD23	16%	100%	100%	25%
CD5CD43	17%	100%	100%	22%
CD23CD43	28%	100%	100%	25%
CD5CD23CD43	9%	100%	100%	21%

Interprétation :

CD5 : Lors d'un couplage avec le CD23 et /ou le CD43 la sensibilité s'est diminuée à 16% et à 17% respectivement, un tri-marquage CD5CD23CD43 présentent une sensibilité de 9% alors qu'un marquage unique CD5 on a une sensibilité à 32% meilleurs que les marquages combinés d'où l'intérêt de travailler marqueurs par marqueurs

CD23 : le marquage combiné CD23 /CD43 et CD23/CD5 présentent des sensibilités de 28% et 16% respectivement, le tri-marquage CD23CD5CD43 présentent une sensibilité de 9% alors le marquage unique CD23 présentent une sensibilité de 60% donc le couplage des trois marqueurs na pas amélioré la sensibilité du test.

CD43 : le CD43 est un marqueur discriminant qui a une sensibilité de 48% en marquage unique alors en marquage combiné avec le CD23 et le CD5 on a une diminution significative de la sensibilité d'où la nécessité de travailler avec un marquage unique.

2. Evaluation du score du Matutes selon nos valeurs seuils :

La création de scores permet d'optimiser l'interprétation des résultats dans la pratique quotidienne.

Interprétation :

CD5 : un point selon le score de Matutes pour tous les patients avec une valeur MFI supérieur ou égal à 5224 : valeurs seuils déterminé on privilégie la spécificité.

CD23 : Un point selon le score de Matutes pour toute expression positive (supérieur à 2838)

CD79b : un point selon le score de Matutes pour toute expression faible ou négative (inférieur à 56661)

Igs : un point selon le score de Matutes pour toute expression faible ou négative (inférieur à 20311)

FMC7 : Un point selon le score de Matutes pour toute expression négative (inférieur à 2911)

2.1. Répartition des patients selon l'expression des marqueurs du score :

Tableau 105. Fréquence du CD5 selon nos valeurs seuils

Tableau : Table de fréquences CD5_5224			
		Fréquence	Pourcentage
Valide	0	88	74,6
	1	30	25,4
	Total	118	100,0

25% des patients diagnostiqués pour SLPC-B sont CD5+, avec une fréquence de 30 patients CD5+ et 88 patients CD5-.

Tableau 106. Fréquence du CD23 selon nos valeurs seuils

Tableau : CD23_2838			
		Fréquence	Pourcentage
Valide	0	63	53,4
	1	55	46,6
	Total	118	100,0

46,6% des cas de SLPC-B ont un CD23+, avec une fréquence de 55 patients CD23+ et 63 patients CD23- .

Tableau 107. Fréquence du CD79b selon nos valeurs seuils

Tableau : CD79b_56661			
		Fréquence	Pourcentage
Valide	0	4	3,4
	1	114	96,6
	Total	118	100,0

96,6% des cas de SLPC-B ont un CD79b+, avec une fréquence de 114 patients CD79b+ et 4 patients CD79b-.

Tableau 108. Fréquence du FMC7 selon nos valeurs seuils

Tableau : FMC7 2911			
		Fréquence	Pourcentage
Valide	0	21	17,8
	1	97	82,2
	Total	118	100,0

82,2% des cas de SLPC-B ont une expression positive du FMC7, avec une fréquence de 97 patients FMC7+ et 21 patients FMC7-.

Tableau 109. Fréquence d'Igs selon nos valeurs seuils

Tableau : IGs 20311			
		Fréquence	Pourcentage
Valide	0	20	16,9
	1	90	83,1
	Total	118	100,0

83,1% des cas de SLPC-B ont une expression positive du IgMs, avec une fréquence de 98 patients IgM+ et 20 patients IgM-.

2.2. Répartition des patients selon le score de matutes :

Tableau 110. Patients avec un score de Matutes supérieur à 4

Matutes supérieur ou égal à 4 (tous les slpc-B)			
		Fréquence	Pourcentage
Valide	0	49	41,5
	1	69	58,5
	Total	118	100,0

58,5% de notre série d'études (118 cas) selon nos valeurs seuils, ont un score de Matutes supérieur ou égal à 4.

2.3. Répartition des patients avec LLC selon la valeur du score :

Tableau 111. Tableau croisé matutes_supérieur ou égal à 4 * LLC

			LLC		Total
			0	1	
matutes_sup_eg_4	0	Effectif	26	22	48
		% dans matutes_sup_eg_4	54,2%	45,8%	100,0%
	1	Effectif	0	69	69
		% dans matutes_sup_eg_4	0,0%	100,0%	100,0%
Total		Effectif	26	91	117
		% dans matutes_sup_eg_4	22,2%	77,8%	100,0%

Pour un score de Matutes supérieur à 4 selon nos valeurs seuils on a :

- VP (vrais positifs = 69) représentent le nombre d'individus malades LLC+ avec un Score de Matutes supérieur à 4.
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un score supérieur ou égal à 4
- FN (faux négatifs = 22) représente le nombre d'individus malades avec un Score inférieur à 4.
- VN (vrais négatifs = 26) représente le nombre d'individus non malades avec un Score de Matutes inférieur ou égal à 4

Tableau 112. Matutes supérieur ou égal à 3 * LLC

			LLC		Total
			0	1	
matutes_sup_eg_3	0	Effectif	26	1	27
		% dans matutes_sup_eg_3	96,3%	3,7%	100,0%
	1	Effectif	0	90	90
		% dans matutes_sup_eg_3	0,0%	100,0%	100,0%
Total		Effectif	26	91	117
		% dans matutes_sup_eg_3	22,2%	77,8%	100,0%

Pour un score de Matutes supérieur ou égal à 3 selon nos valeurs seuils on a :

- VP (vrais positifs = 90) représentent le nombre d'individus malades LLC+ avec un Score de Matutes supérieur ou égal à 3.
- FP (faux positifs = 0) représente le nombre d'individus non malades avec un score supérieur ou égal à 3
- FN (faux négatifs = 1) représente le nombre d'individus malades avec un Score inférieur à 3.
- VN (vrais négatifs = 26) représente le nombre d'individus non malades avec un Score inférieur à 3

2.4. Calcul du coefficient kappa :

Coefficient kappa : Le principe du coefficient Kappa est de corriger la concordance observée par la concordance qui pourrait être liée au hasard.

Pour un score de Matutes supérieur ou égal à 4 la mesure d'accord kappa est de 58%.

Pour un score de Matutes supérieur ou égal à 3 la mesure d'accord kappa est de 97%.

Donc les test statistique effectué sur notre séries de travail montre que le score de Matutes est modifié a supérieur ou égal à 3 ou lieu de supérieur ou égal à 4.

3. DISCUSSION :

L'étude des médianes des IFM des différents marqueurs du panel des SLPC-B au niveau du CHU Hassan II de Fès, établit des valeurs de référence qui sont une aide lors de l'interprétation et la validation des immunophénotypages au sein du laboratoire ce qui permet d'affiner le diagnostic par la réalisation des profils phénotypique propre à chaque entité.

Les résultats de notre étude concordent avec les données de la littérature, en particulier pour observer la répartition de la positivité ou la négativité des différents marqueurs ainsi que les différentes IMF des CD, par exemple dans la LLC, quelques CD montrent déjà un potentiel discriminant intéressant comme le FMC7, Igs, CD22 et le CD79b qui ont des IMF très faible, avec des effets seuils vis-à-vis les autres SLPC-B, et aussi la forte expression du CD23 et du CD5. Le LM pose un problème de diagnostic différentiel avec la LLC suite à l'expression intense du CD5 alors que les autres SLPC sont CD5 négatifs. Un CD23 négatif accompagné d'un CD38 et du CD22 très fort est en faveur de LM. Le profil du LT montre des marqueurs discriminants par rapport aux autres entités notamment le CD 25, CD11c et le CD103. Le reste des SLPC mettent en évidence toute la complexité d'interprétation des immunophénotypage lymphocytaires [102].

En effet, on constate des zones de chevauchements des IMF pour la plupart des CD, peu de cas rapporter dans notre étude (12 cas de LM, 5 cas de LPL-B, 3cas FL, 2 cas LZMS, 5 LT), l'hétérogénéité de la pathologie, et peu de données publiées sur les IFM car ces mesures sont très « techniques dépendantes » et propre à chaque laboratoire. Ce qui rend la mesure des médianes des IMF insuffisantes pour interpréter le phénotypage dans un but diagnostique notamment pour les cas atypique, d'où l'intérêt d'un complément d'investigation dans le but d'affirmer le diagnostic.

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 permet de mettre en évidence la capacité discriminative de chaque marqueur, utile pour la réalisation des score à visé diagnostique avec d'avantages de certitudes.

Le CD5 est un marqueur lymphoïde T caractéristique des cellules B de la LLC. Il est particulièrement discriminant avec ses valeurs fortes dans la LLC et le LM contrairement à ses valeurs faible dans le LZMS, LF, LT, LPL-B avec un AUC inférieurs à 50%.

Le CD23 est discriminant en étant plus fort dans la LLC avec un AUC de 91% et négatifs pour les autres SLPC-B non LLC. Le CD79b et le FMC7 discriminent parfaitement la LLC par leurs négativités (AUC= 0) et peuvent prendre des valeurs très élevées dans les autres SLPC-B qui expriment aussi les chaînes légères plus que la LLC. L'ensemble de nos résultats concordent avec les données du score de matutes pour le diagnostic de la LLC [103].

Le CD43 est majoritairement positif dans la LLC protéine de surface qui apparaît au stade de différenciation pro-B des LB et qui existe sur les cellules B de la LLC dans le sang périphérique, mais quand celui-ci est négatif la discrimination avec le LM et le LZMS est faible [104]. Le CD22 ressemble au profil du CD79b dans notre études, avec une forte expression dans le LZM et la LT, intermédiaire dans le LM et faible dans la LLC.

Concernant les marqueurs de score du diagnostic des LT (CD25, CD103, CD11c) ils sont discriminants par rapport aux autres SLPC-B notamment le LZMS qui pose un problème de diagnostic différentiel avec la LT [105]. Le CD10 et le CD38 apportent peu au diagnostic car ils sont discriminants également dans le le LM, LF et le LZMS.

Il existe des zones de chevauchement entre les SLPC-B qui peuvent rendre l'interprétation immunophénotypique délicates sans le recours aux autres marqueurs spécifiques.

Toutefois, notre effectif peu important pour l'étude des autres SLPC-B non LLC nous empêche de conclure du fait d'un manque de puissance de nos tests. D'autres études avec un effectif plus grand, prospectives et comparant d'autres marqueurs sont nécessaires pour conforter ces premiers résultats.

Dans la LLC la pathologie qu'on a explorée avec une cohorte significative, 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.

Les valeurs seuils des marqueurs les plus discriminants dans la LLC selon la courbe ROC sont choisies selon une meilleure spécificité car c'est une hémopathie chronique de sujet âgé dont la démarche diagnostic consiste à confirmer le diagnostic par cytométrie en flux et un résultat faussement négatif n'a pas de conséquence grave sur le patient car c'est une pathologie incurable même avec un diagnostic précoce.

En effet, l'association des marqueurs discriminants soit en double ou en triple marquage n'a pas augmenté la puissance du test, la spécificité de 100% des trois marqueurs discriminants n'a pas changer sois en marquage unique ou combinés alors que la sensibilité du test diminue en associant les marqueurs et aussi on risque de perdre beaucoup de vrai positif (malades), A noter que l'expression du CD5, CD23 et le CD43 est spécifique de la LLC selon nos résultats et selon les données de la littérature mais l'absence d'un ou plus de ces marqueurs n'exclut pas le diagnostic de la LLC car il existe des cas de LLC CD5 négatif, par exemple, décrite dans la littérature d'où l'intérêt d'interpréter les résultats marqueurs par marqueurs, opter pour d'autres marqueurs spécifiques afin d'améliorer la puissance du test notamment pour les cas de LLC atypique comme le CD200 et le CD180, et enfin évaluer le score de Matutes selon les

valeurs seuils de notre laboratoire [106].

L'évaluation du score de Matutes selon nos propres valeurs seuils implique l'étude des différents indicateurs de performance de ce test diagnostique.

L'étude de la répartition des patients avec le diagnostic d'un SLPC-B selon l'expression des marqueurs du score de Matutes selon les nouvelles valeurs seuils concordent avec les résultats publiés dans la littérature avec une forte expression du CD79b, FMC7, Igs chez les majorités des patients non LLC par rapport aux CD23 et CD5 marqueurs essentiellement positifs que dans la LLC.

L'étude de la répartition des SLPC-B de notre série montre que 58% des patients ont un score supérieur à 4 ceci est justifié car la majorité de nos patients ont déjà été diagnostiqués de la LLC.

Et enfin l'étude de la répartition des malades avec le diagnostic de la LLC selon les valeurs du score de Matutes qui va nous permettre de valider la valeur du score adaptée à nos valeurs seuils déterminer selon notre propre technique de marquages, réactifs, réglages, population...

Pour un test diagnostique de Matutes supérieur ou égal à 4 la sensibilité et la spécificité nous apportent peu d'information car on ne sait pas si le patient présente ou non le diagnostic, mais on connaît au contraire le résultat du test qu'il faut interpréter [8]. Cette information est fournie par une autre paire d'indicateurs; la valeur prédictive positive (VPP) qui est de 100% correspond à la probabilité que le diagnostic de la LLC est réellement positif avec un test diagnostique supérieur ou égal à 4, alors que la valeur prédictive négative (VPN) qui correspond à la probabilité que le diagnostic de la LLC est réellement négatif avec un score de Matutes inférieur à 4 est de 54% ,résultats qu'il faut compléter par un autre indicateur de performance diagnostique le coefficient kappa pour évaluer la concordance entre la valeur de score et la présence ou non de la maladie. Dans cette situation le coefficient kappa est de seulement 58% ces résultats sont en désaccord avec la littérature car le diagnostic d'une LLC est franc devant un score de Matutes supérieur ou égal à 4 sauf pour quelques cas de LLC atypique avec un score de 3. Résultats validés par le comité scientifique international.

Pour un test diagnostique de Matutes supérieur ou égal à 3 la VPP est de 100% et la VPN est de 96% le coefficient kappa est de 97% donc on peut conclure que le diagnostic de LLC est modifié à une valeur du score supérieur ou égal à 3 au lieu de supérieur ou égal à 4.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

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

L'étude des médianes des marqueurs du panel des SLPC-B du CHU Hassan II de Fès établit des valeurs de références qui séparent les patients selon les positivités et les négativités des différents marqueurs du panel diagnostique notamment l'immunoglobulines du surface et le CD79b dont l'interprétation se base essentiellement sur l'IMF pour compléter le calculs du score du Matutes. L'étude des IFM est compléter par une analyse de chaque marqueur utilisant la courbe ROC qui confirme les observations précédentes de l'étude des IMF et nous permet de soulever les marqueurs les plus discriminants utile pour orienter le diagnostic.

Les marqueurs du panel diagnostique des SLPC-B doivent être interprétés avec beaucoup de précaution car il existe toujours des zones de chevauchements entre chaque entité d'où l'intérêt de tester de nouveaux marqueurs utilisés en complément dans les cas atypiques et l'élaboration de score à visée diagnostique simple à calculer pour aider à l'interprétation quotidienne des immunophénotypes. Cette interprétation ne doit pas être déconnectée des données de la cytologie et de l'ensemble des arguments disponibles lors de la validation biologique.

A la fin de ce travail nous recommandons :

L'élaboration de score à visée diagnostique simple à calculer pour aider à l'interprétation quotidienne des immunophénotypes.

L'élaboration de recommandations concernant aussi bien le choix du marqueur à rechercher que les méthodes de standardisation inter-laboratoires.

Opter pour d'autres marqueurs spécifiques afin d'améliorer la puissance du test notamment pour les SLPC non LLC.

Poursuivre ce travail en élargissant notre cohorte notamment pour les pathologies rares afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs et exploitables pour un diagnostic et une prise en charge optimale.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE :

- [1]. C. Doinel, Ph. Bourin. La cytométrie en flux en immunologie et en hématologie : quelques aspects pratiques essentiels. Rev. Fr. Transfus. Hemobiol, 1989, 32, 467-481.
- [2]. X. Troussard, Leucémie lymphoïde chronique, EMC, volume 8 N°3 août 2013.
- [3]. X. Troussard, Diagnostic, pronostic et traitement chez les patients avec une leucémie lymphoïde chronique. Immuno-analyse et biologie spécialisée 22 (2007) 313–318.
- [4]. Julie Bruneau, Danielle Canonia, Thierry Jo Molina. Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures : ce qui va changer dans la pratique quotidienne. Revue francophone des laboratoires, Janvier 2017 - N°488 // 39.
- [5]. Le Gouill, S. Le lymphome à cellules du manteau : du diagnostic aux perspectives thérapeutiques. Rev. Médecine Interne 31, 615–620 (2010).
- [6]. Jaspers aurélie, Baron Frédéric et al. Le lymphome du manteau. Revue médical de liège 2010. 171-176.
- [7]. Florence Nguyen-Khac a, Leucémie prolymphocytaire B. Revue Francophone des Laboratoires, février 2006, N °379.
- [8]. C. Doyen a,*, M. Delos b, L. Michaux c, A. Bosly a. Lymphomes folliculaires. EMC-Hématologie 1 (2004) 83–105.
- [9]. S. Poulain a,1, M. Wemeau b,1, S. Balkaran b, B. Hivert b, A. Hautecoeur a, J. Rossignol b, J. Fernandez a, A. Daudignon a, C. Roumier b, V. Soenen b, P. Lepelley b, J.-L. Lai b, P. Morel c, X. Leleu b,*. Macroglobulinémie de Waldenström. La Revue de médecine interne 31 (2010) 385–394.
- [10]. Marie Balsat, Jérôme Cornillon. Actualités moléculaires et thérapeutiques dans la Leucémie à Tricholeucocytes. Bull Cancer 2013 ; 100 : 1043-7.
- [11]. H. Voinchet a, G. Etienne a, C.-B. Ghiringelli a, J.-L. Pellegrin b, J.-F. Viallard b, M. Parrens c, M. Longy-Boursie. Lymphomes spléniques de la zone marginale et auto-immunité : à propos de six cas, La Revue de médecine interne 31 (2010) 4–11.
- [12]. Lacombe C. Les cellules souches hématopoïétiques humaines normales: régulation et méthodes d'exploitation. Hématologie. 2005 – 2006.
- [13]. Marina Cavazzana-Calvo^{1*}, Emmanuelle Six¹, Isabelle André-Schmutz¹ et Laure Coulombel. Human hematopoiesis: from CD34 cells to T lymphocytes. Med Sci

- (Paris) 2007 ; 23 : 151–160.
- [14]. Plonquet A. Différenciation lymphocytaire B normale. Rev Francoph Lab. Mai 2013;2013(452):27-35.
- [15]. X. Troussard. Diagnostic, pronostic et traitement chez les patients avec une leucémie lymphoïde chronique. Immuno-analyse et biologie spécialisée 22 (2007) 313–318.
- [16]. Amélie Bonaud. Maturation finale des lymphocytes B : de la commutation de classe aux conséquences pathologiques de la production d'immunoglobulines anormales. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. ffNNT : LIMO0017ff. fftel-01186398f.
- [17]. X. Troussard. Nouveautés sur les hémopathies lymphoïdes chroniques B matures, immuno-analyse et biologie spécialisée (2013) 28 ,174-182.
- [18]. Shiaoqing Gong, Fotini Papavasiliou, Mila Jankovic, Yun Hu, Michel C. Nussenzweig Ig α /Ig β (CD79a/CD79b) Encyclopedia of Immunology (Second Edition), 1998, Pages 1194-1196.
- [19]. Bernard Halprn, structure et fonction des IG ; Rev franc d'allergo 1971 ,11(1), 51-66.
- [20]. Noémie Gensous a, 1, Delphine Turpin * a,b,1, Dorothée Duluc a, Cécile Contin-Bordes a,b, Patrick Blanco a,b, Genèse des anticorps Revue du Rhumatisme 83S (2016) A27-A32.
- [21]. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination : similarities and differences. Adv Immunol 2005;86:43-112.
- [22]. Honjo T. Immunoglobulin genes. Annu Rev Immunol 1983;1:499-528.
- [23]. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. Annu Rev Immunol 1996;14:441-57.
- [24]. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind . Adv Immunol. 2011;110 :27–70.
- [25]. Plonquet a, Différenciation lymphoïde B : Physiologie, Méthode d'exploration et application et études des prolifération, Revue Francophone des Laboratoire, février 2006, N°379).
- [26]. Kuppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer 2005;5(4):251-62.
- [27]. Yves Levy. Mécanisme D'hypermutation Somatique Des Gènes Des Immunoglobulines. Hématologie 5, no. 6 (2000): 469–479.

- [28]. N. Guillaume, G. Alimardani, J.C. Capiod, J.F. Claisse. Pertinence des analyses cytologiques et immunophénotypiques dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique B. *annale de biologie clinique*. Volume 60, numéro 6, Novembre – Décembre 2002 (673-81).
- [29]. Florence Nguyen-Khac . B-prolymphocytic leukemia; *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2006, Issue 379, February 2006, Pages 45- 47.
- [30]. Florence Cymbalista,* LLC: physiopathologie, diagnostic et approche thérapeutique, *Revue Francophone des Laboratoires* - Mai 2013 - n°452 // 6.
- [31]. Xavier Troussard, Michèle Maleta, Edouard Corneta. Phase précoce de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et concept de lymphocytose B monoclonale (MBL). *revue francophone des laboratoires*- JUIN 2011 - N°433 // 47.
- [32]. Swerdlow, H. et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (2008).
- [33]. D. Decaudin (MD, PhD). Mantle cell lymphoma: a biological and therapeutic paradigm. *EMC-Hématologie* 1 (2004) 69–82.
- [34]. A. Jaspers (1*), F. Baron (2*), C. Bonnet (3), B. De Prijck (3), M.F. Fassotte (3), Y. Beguin (4). LE LYMPHOME DU MANTEAU ; *Rev Med Liège* 2010; 65 : 4 : 171-176.
- [35]. Traverse-Glehen, A. et al. Splenic diffuse red pulp small-B cell lymphoma: toward the emergence of a new lymphoma entity. *Discov. Med.* 13, 253–265 (2012).
- [36]. C. Thieblemont, F. Davi, J. Brière. *Lymphomes de la zone marginale* ISBN : 978-2-8178-0370-8, Springer-Verlag Paris 2013.
- [37]. X. Troussard a,*,b,c, E. Cornet a. Leucémie à tricholeucocytes. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2009) 24, 254—260.
- [38]. Xavier Troussard Édouard Cornet, Proliférations lymphoïdes B matures à cellules chevelues, *Ann Biol Clin* 2015 ; 73 (4) : 399-406.
- [39]. Mikaël Roussel¹Michèle Malet¹Xavier Troussard¹. Hairy cell leukemia; *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2006, Issue 379, February 2006, Pages 49-54.
- [40]. Viardot A, Barth TF, Möller P, Döhner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2003;13:183–190.
- [41]. Ghobrial IM, Gertz MA, Fonseca R. Waldenstrom macroglobulinaemia. *Lancet Oncol* 2003;4:679–85.
- [42]. Pangalis GA, Kyrtsolis MC, Kontopidou FN, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Vassilakopoulos TP, et al. Differential diagnosis of Waldenstrom's

- macroglobulinemia and other B-cell disorders. *Clin Lymphoma* 2005;5:235–40.
- [43]. Xavier Ronot, Didier Grunwald, Jean-Francois Mayol, Jean Boutonnat. *Cytometrie en flux*. Lavoisier, 2006 ISBN 10 :2-7430-0898-9 ; Paris : Editions TEC and DOC
- [44]. Philippe Gaulard. *Classification des lymphomes non hodgkiniens* Volume 6, numéro 5, Mai 2000 p 343-52.
- [45]. Helene Merle-Beral. Leucémie lymphoïde chronique biologie et pronostic. *Revue Francophone des Laboratoires*, février 2006, N 379.
- [46]. Andrien F. Fassotte, Marie-France, Beguin, Yves, Fillet, George. *Traitement des lymphomes non hodgkiniens : de l'abstention thérapeutique à la greffe de moelle*. *Medicine est Hygiène* volume 48-1990, 3672-3676.
- [47]. Bonnet C, Beguin Y, De Prijck B, et al. Anticorps monoclonaux en hématologie en 2009. *Rev Med Liège*, 2009, 64, 268-273.
- [48]. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6: 443-6.
- [49]. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S. Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol* 2000; 51: 634-41.
- [50]. Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood* 1998; 91: 1644-52.
- [51]. Coleman M, Goldenberg DM, Siegel AB, et al. Epratuzumab: targeting B-cell malignancies through CD22. *Clin Cancer Res*. 2003;9(10 Pt 2):3991S–3994S.
- [52]. Poole JA, Meng J, Reff M, Spellman MC, Rosenwasser LJ. Anti-CD23 monoclonal antibody, lumiliximab, inhibited allergen-induced responses in antigen-presenting cells and T cells from atopic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 780-8.
- [53]. Tong X, Long L. In vitro activity of a novel fully human anti-CD40 antibody CHIR12.12 in chronic lymphocytic leukemia: blockade of CD40 activation and induction of ADCC. *Blood* 2004: 104.
- [54]. Suvas S, Singh V, Sahdev S, Vohra H, Agrewala JN. Distinct role of CD80 and CD86 in the regulation of the activation of B cell and B cell lymphoma. *J Biol Chem* 2002; 277: 7766-75.
- [55]. Hale G, Cobbold S, Novitzky N, Bunjes D, Willemze R, Prentice HG, et al. Campath-1 antibodies in stem-cell transplantation. *Cytotherapy* 2001; 3: 145-64.
- [56]. Wing MG, Moreau T, Greenwood J, Smith RM, Hale G, Isaacs J, et al. Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1H: involvement of CD16 (FcγRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* 1996; 98:

2819-26.

- [57]. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 1986 ;233 :1318-21.
- [58]. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16:566-81.
- [59]. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Educ Program Am Soc Hematol*. 2012;2012:137-42.
- [60]. (Campana D. Role of Minimal Residual Disease Monitoring in Adult and Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. oct 2009;23(5):1083-98.
- [61]. Karim Maloum Évaluation de la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique Volume 12, numéro 4, Juillet-Août 2006, 274-81.
- [62]. Olivier Lees a,* Immunophénotypage : Apport de la cytométrie a la biologie clinique. *Revue Française des Laboratoires*, novembre 2000, N°32.
- [63]. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972 ; 43 : 404–409.
- [64]. V. Moalic, B. Mercier, C. Ferec Luminex™ Technology: technical approach, applications and future prospects ; *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 19 (2004) 181–187.
- [65]. Leach, M. Drummond, M. et Doig, A. *Practical flow cytometry in haematology diagnosis* singapour: WILEY-BLACKWELL (2003).
- [66]. H. Jouault et M. Imbert. La cytométrie en flux : intérêt et applications en hématologie. *Revue française des laboratoires*, avril/mai 1995, N ° 275.
- [67]. Idziork, thierry, Cazareth, Julie et al. Que la lumière soit. Et si ce n'était plus seulement vrai ! Évolution de la cytométrie : du conventionnel à la masse (en passant par le spectre) *Fiat Lux*. May be no more true in cytometry! Go to mass and spectrum but still stay classic. *Médecine/Science*, Volume 34 N5, 439- 447.
- [68]. Francis Lacombe, Marc Maynadiéb, Bernard Chatelain, Marie-Christine Bénédi,* Évolution des outils informatiques d'analyse des données en cytométrie en flux ; *Revue francophone des laboratoires*, septembre/octobre 2017-N°495 / 57.
- [69]. Olivier Lees a. Immunophénotypage: Apport de la cytométrie a la biologie clinique, *Revue Française des Laboratoires*, novembre 2000, N° 32.
- [70]. Bernard A, Boumsell L. Human leukocyte differentiation antigens. *PUBMED*1984

Oct 27;13(38):2311-6.

- [71]. Heddy Zola et al. CD molecules 2006 : Human cell differentiation molecules Journal of Immunological Methods Volume 319, Issues 1–2, 30 January 2007, Pages 1-5.
- [72]. Craig, F. E. et Foon, K. A. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111, 3941–3967 (2008).
- [73]. Mark A. Behlke^{1, 2}, Lingyan Huang², Lisa Bogh³, Scott Rose², and Eric J. Devor¹. Fluorescence and Fluorescence Applications. 2005 Integrated DNA Technologie
- [74]. Costopoulos & Le Garff-Tavernier. Immunophénotypage lymphocytaire dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques. Elsevier Masson (2013).
- [75]. Latget, Cannard, Jamin Nathalie, Lsesve, jean-françois, Buisine, Jacqueline. Immunophénotypage des leucémies aiguës : utilisation du CD45 en troisième couleur pour améliorer la discrimination des cellules blastiques. *Rv Fr Lab* (2000), N319 ; 37- 43.
- [76]. La cytométrie en flux : intérêt dans le diagnostic phénotypique et le suivi des hémopathies malignes Volume 60, numéro 6, Novembre - Décembre 2002
- [77]. De Tute, R. M. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology* 58, 90–105 (2011).
- [78]. Craig, F. E. Flow Cytometric Evaluation of B-cell Lymphoid Neoplasms. *Clin. Lab. Med.* 27, 487–512 (2007).
- [79]. Béné, M. C. et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* 25, 567–574 (2011).
- [80]. Magali Le Garff-Tavernier, Myrto Costopoulos, and Hélène Merle-Béral, “Place de La Cytométrie En Flux Dans Le Diagnostic et Le Suivi Des Syndromes Lymphoprolifératifs B,” *Revue Francophone Des Laboratoires* 2013, no. 452 (2013): 37–48.
- [81]. Garff-Tavernier, M. L., Costopoulos, M. & Merle-Béral, H. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B. *Rev. Francoph. Lab.* 43, 37–48 (2013).
- [82]. Hallek, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111, 5446– 5456 (2008).

- [83]. Asplund, S. L., McKenna, R. W., Doolittle, J. E. & Kroft, S. H. CD5-positive B-cell neoplasms of indeterminate immunophenotype: A clinicopathologic analysis of 26 cases.
- [84]. Miguet laurent, Mayeur-rousse, Lennon Sarah et al. Interest of the CD148, CD180 and CD200 Combination in Flow Cytometry Analyses for Mature B-Cell Neoplasms Diagnosis. *Blood*, volume 124, N°21, 5407-5407.
- [85]. Van Bockstaele, F., Verhasselt, B. & Philippé, J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: A comprehensive review. *Blood Rev.* 23, 25–47 (2009).
- [86]. Sarfati, M. et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 88, 4259–4264 (1996).
- [87]. Ho, A. K. et al. Small B-cell neoplasms with typical mantle cell lymphoma immunophenotypes often include chronic lymphocytic leukemias. *Am. J. Clin. Pathol.* 131,27–32 (2009).
- [88]. M. Dungarwalla, E. Matutes, and C. E. Dearden, “Prolymphocytic Leukaemia of B- and T-cell Subtype: a State-of-the-art Paper: B- and T-prolymphocytic Leukaemia,” *European Journal of Haematology* 80, no. 6 (June 2008): 469–476
- [89]. Horatiu Olteanu et al, “CD23 Expression in Follicular Lymphoma: Clinicopathologic Correlations,” *American Journal of Clinical Pathology* 135, no. 1 (January 2011): 46–53.
- [90]. Cornet, E. *et al.* Recommendations of the SFH (French Society of Haematology) for the diagnosis, treatment and follow-up of hairy cell leukaemia. *Ann. Hematol.* 93, 1977–1983 (2014).
- [91]. Christine B. Kost, Jeannine T. Holden, and Karen P. Mann, “Marginal Zone B-cell Lymphoma: A Retrospective Immunophenotypic Analysis,” *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 74B, no. 5 (September 2008): 282–286.
- [92]. Lin, P. & Medeiros, L. J. Lymphoplasmacytic lymphoma/waldenstrom macroglobulinemia: an evolving concept. *Adv. Anat. Pathol.* 12, 246–255 (2005).
- [93]. Choquet S. Syndromes lymphoprolifératifs chroniques chez la personne âgée : du diagnostic à la prise en charge. *Bull Cancer.* 2008;95:74-8.
- [94]. Xu J, Medeiros LJ, Saksena A, et al. CD10-positive mantle cell lymphoma: clinicopathologic and prognostic study of 30 cases. *Oncotarget.* 2018 Feb 20;9(14):11441-11450.
- [95]. Aude Collignon¹ & Anne Wanquet¹ & Elsa Maitre² et al. Prolymphocytic Leukemia: New Insights in Diagnosis and in Treatment. *Curr Oncol Rep.* 2017 Apr;19(4):29.

- [96]. Mora A, Bosch R, Cuellar C, et al. CD200 is a useful marker in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018 Oct 16.
- [97]. Delacour H, Servonnet A et al. La courbe ROC (receiver operating characteristic) : principes et principales applications en biologie clinique. *Annal de biologie clinique* 2005, Volume 63, pages 11
- [98]. François Rioult ; Interprétation graphique de la courbe. Brest France, EGC 11,6 p.
- [99]. Hervé Delacour^a Aurélie Servonnet^b Céline Roche^a .Critères d'évaluation de la validité d'un test biologique Assessing diagnostic test efficacy. *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2009, Issue 412, May 2009, Pages 41-48.
- [100]. Bernard Grenier. Justifier les décisions médicales et maîtriser les coûts. Paris 6^{ème} édition, Masson, 152 p.
- [101]. M.R. Nendaz^[1], A. Perrier Diagnostic test: sensitivity, specificity, positive predictive value, negative value ; *Revue des Maladies Respiratoires* Vol 21, N° 2 - avril 2004 pp. 390-393.
- [102]. Al-Sawaf O¹, Eichhorst B², Hallek M². chronic lymphocytic leukemia ; *internist BERL* 2020 Mars, 61(3):277-287.
- [103]. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* 1994 oct;8(10):1640–5.
- [104]. Fernandez-Rodriguez J¹, Andersson CX, Laos S, Baeckström D, Sikut A, Sikut R, Hansson GC. The leukocyte antigen CD43 is expressed in different cell lines of nonhematopoietic origin. *Tumour Biol.* 2002 Jul-Aug;23(4):193-201.
- [105]. Maitre E¹, Cornet E¹, Troussard X¹. Hairy cell leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2019 Dec;94(12):1413-1422.
- [106]. Salem DA^{1,2}, Stetler-Stevenson M³. Clinical Flow-Cytometric Testing in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Methods Mol Biol.* 2019;2032:311-321.

ANNEXE I :

Démarche technique pour réussir la monoclonalité :

(Article soumis pour publication) :

Traitement du tube avec lavage :

- 100µl de sang avec 2ml de PBS
- centrifugation à 1500 tours/minute pendant 5 min puis élimination du surnageant
- reprise du culot avec 2ml de PBS puis mélange par agitation rotative ;
- centrifugation à 1500 tours/minute pendant 5 min puis élimination du surnageant.

Incubation cellulaire :

- Le culot cellulaire est repris dans 2ml de PBS puis mélanger par agitation rotative
- Incubation pendant 1H à 37°C
- centrifugation à 1500 tours/minute pendant 5 min puis élimination du surnageant

La lyse érythrocytaire :

- Reprise du culot avec 1ml de solution de lyse puis mélange par agitation rotative ;
- incubation de 20 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- centrifugation à 1500 tours/minute pendant 5 minutes puis élimination du surnageant
- reprise du culot avec 2ml de PBS puis mélange par agitation rotative ;
- centrifugation à 1500 tours/minute pendant 5 minutes puis élimination du surnageant

Marquage direct :

- Ajout de 50 µl de sang prétraité à 20 µl de chaque anticorps marqués CD19-ECD, KAPPA-PE, LAMBDA-FITC.
- incubation de 20 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante ;
- reprendre la préparation dans 500 µl de PBS

La préparation sera ensuite analysée sur le cytomètre FC500

Liste des productions scientifique :

Publications :

M. Abddaoui, K. Lemhouer, I. Tlemçani, M. El-Azami El-Idrissi and M. Amrani Hassani
Immunophenotypic Diagnosis of Low Clone Hairy Cell Leukemia (A Case Study). Academic
Journal of Cancer Research

Zineb Khammar 1; **Meryeme Abddaoui 2** ; Imane Tlamçani 2 ; Maha Ouazzani 1; Noufissa
Alami 1 ;Mohamed el Azami el Idrissi 2; Moncef Amrani Hassani 2 ; Rhizlane Berrady1.
La Leucémie à grand lymphocyte granuleux (LGL-T) atypique : diagnostic et pronostic : A
propos d'un cas. Médecine thérapeutique

Imane Tlemçani, Rime Bennani, **Meryeme Abddaoui**, Moncef Amrani Hassani
Hairy cell leukemia: About 3 cases. International Journal of Current Advanced Research.

Imane Tlamçani1, Soukaina Oudhiri, **Meryem Abddaoui**, Sarra Benmiloud, Moustapha
Hida, Moncef Amrani Hassani. Immunophenotypic profile of acute lymphoblastic leukemia
in children .Médecine thérapeutique pédiatrie.

TLEMCANI Imane, MAROU SOUMANA Boubacar, HADAOUI Fz, DJIBRILLA Amadou,
ABDAOUI Meryeme, HARANDOU Mustapha, AMRANI HASSANI Moncef
Leucémie aigue myéloblastique compliquée d'une coagulation intravasculaire disséminée au
cours d'une grossesse. Médecine thérapeutique

Journées Scientifiques et Congrès internationaux :

- Participation à la journée de l'innovation en biologie organisé à Paris le 21-22 Novembre 2019.
- Participation au 6ème congrès africain de chimie clinique et médecine de laboratoire organisé au Maroc du 25 au 28 Septembre 2019.

Journées Scientifiques et Congrès Nationaux :

- Participation à l'atelier de formation aux systèmes d'informations organisé du 19 au 21 mai 2015 à l'Université sidi Mohammed ben Abdellah.
- Participation à la 2ème journée Régionale de lutte contre le VIH-SIDA à Fès du 22 au 30 Mai 2015.
- Participation à l'atelier du Dosage des médicaments : Validation Bio-analytique organisé le

13 juin 2015 à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès.

- Participation à la journée scientifique de Cytométrie en Flux organisée à Rabat le 24 Octobre 2015.

- Participation à l'Ecole thématique : Rédaction scientifique, organisé le 1 et le 2 juin 2015 à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès.

- Participation aux 17ème journées Marocaines de Biologie Clinique organisées à Marrakech du 5 au 7 Octobre 2017.

- Participation au troisième forum du pôle de Biotechnologie à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz de Fès le 26 Décembre 2017.

-Participation aux 7ème journées Nationales de Biologie Praticienne organisé à Marrakech les 29-30-31 Mars 2018.

-Participation à la 1ère journée de formation continue des Médecins et Infirmiers sur le Syndrome Lymphoprolifératif le 28 Avril 2018 à Fès.

-Participation à la 18 ème journée Marocaines de Biologie Clinique organisé à Casablanca du 27 au 29 Septembre 2018.

- Participation au XVème Congrès National d'hématologie à Agadir du 11 au 14 Octobre 2018.

-Participation à la 2ème édition de la journée de formation pour Médecin et Infirmiers sous le thème : Immunothérapie de la recherche à la pratique clinique, le 20 Avril 2019 à Fès.

-Participation à l'atelier de formation en biosécurité et biosûreté au laboratoire organisé par le service de pharmacologie-toxicologie, laboratoire central des analyses médicales CHU Hassan II de Fès, avec le support de Civillian Research and Development Foundation Global (CRDF) à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès, le 11 et le 12 Juillet 2019.

-Participation aux 19ème congrès de Biologie Clinique organisé à Marrakech du 25 au 28 Septembre 2019.



الملخص :

مرض التكاثر اللمفاوي يشمل جميع الأمراض السرطانية التي تنشأ في الجهاز اللمفاوي . في بعض الحالات ، خلايا الليمفوما سوف تنتقل إلى الدم المحيطي وستحدث بعد ذلك عن مرحلة اللوكيميا من مرض التكاثر اللمفاوي . يعتبر الكشف عن النمط المناعي للخلايا اللمفاوية أنسب أداة تشخيص لوصف متلازمة التكاثر اللمفاوي المزمن ب. تقنية قياس التدفق الخلوي تتميز بكونها سريعة، و قدرتها على استخدام لوحة كبيرة من الأجسام المضادة لتحديد شدة التعبير عن العلامة والنسبة المئوية للخلايا المعنية والإجابة على عدة أسئلة وقت التشخيص أو أثناء المتابعة للمريض، على الرغم من أن قياس التدفق الخلوي عرف تطورا مهما في السنوات الأخيرة إلا أن غياب العلامات المميزة للخلية يقلل من دقة التشخيص ويشكل مشكلة إدارة التكيف مع المرض. بصرف النظر عن وجود درجة Matutes / Moreau التي تجعل التشخيص ممكناً لسرطان الدم اللمفاوي المزمن عندما يكون أكبر من أو يساوي 4 ، والنتيجة التشخيصية لسرطان الدم اللمفاوي مشعر الخلايا، لا توجد توصية دولية واسعة النطاق على استراتيجيات التشخيص التي سيتم تبنيها لمتلازمة التكاثر اللمفاوي المزمن ب الأخرى. الغرض من الدراسة التي نقدمها هو تقييم قيم كثافة العلامات المختلفة المستخدمة بشكل روتيني في لوحات الجسم المضاد المستخدمة في المركز الاستشفائي الجامعي الحسن الثاني بفاس وكذلك توزيع هذه العلامات وفقاً لمتلازمة التكاثر اللمفاوي المزمن ب المختلفة. تعتبر هذه المعطيات مفيدة للغاية للطبيب الإحيائي عند تحليل النمط المناعي للخلايا اللمفاوية.

الكلمات الدالة :

التدفق الخلوي , التشخيص, النمط المناعي للخلايا اللمفاوية, متلازمة التكاثر اللمفاوي المزمن ب, كتلة التمايز.



مركز دراسات الدكتوراه: علوم وتقنيات المهندس

الأطروحة رقم : 64

أطروحة الدكتوراه

مقدمة من طرف

عداوي مريم السيدة

تخصص: علم المناعة وعلم الأمراض المعدية

مساهمة قياس التدفق الخلوي في تشخيص و رصد متلازمات التكاثر اللمفاوي المزمن من النوع ب

أطروحة قدمت ونوقشت بتاريخ 16 نوفمبر 2020 أمام اللجنة المؤلفة من :

الاسم الكامل	الصفة	المؤسسة	
د. برحو محمد	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - فاس	رئيس
د. فلاح حسن	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - الدار البيضاء	مقرر
د. بادو عبد الله	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - الدار البيضاء	مقرر
د. الرابعي سميرة	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - فاس	مقرر
د. بنيس سناء	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - فاس	ممتحن
د. تلمساني إيمان	أستاذ مؤهل	كلية الطب والصيدلة - فاس	ممتحن
د. عمرانني حسني منصف	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - فاس	مشرف
د. الأزمي الإدريسي محمد	أستاذ التعليم العالي	كلية الطب والصيدلة - فاس	مشرف

مختبر علم الدم

كلية العلوم والتقنيات - فاس