

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER**

**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2020

THESES 2020 TOU3 2061

**THESE**

**POUR LE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE**

---

Présentée et soutenue publiquement

Par

**THEO CECCOMARINI**

---

**MISE EN PLACE D'UN ALGORITHME DECISIONNEL POUR LE  
DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL, PAR CYTOMETRIE DE FLUX, DES  
SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES-B**

---

Le jeudi 15 Octobre 2020

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur François VERGEZ

**JURY**

Présidente : Madame la Professeur Véronique De Mas

1<sup>er</sup> assesseur : Monsieur le Professeur Loïc YSEBAERT

2<sup>ème</sup> assesseur : Monsieur le Docteur Jean-Baptiste RIEU

3<sup>ème</sup> assesseur : Monsieur le Docteur François VERGEZ

**PERSONNEL ENSEIGNANT**  
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier  
au 2 mars 2020

**Professeurs Emérites**

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

**Professeurs des Universités**

**Hospitolo-Universitaires**

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

**Universitaires**

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

## Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JULLIARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(\*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

## Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S	Biophysique
Assistants Hospitalo-Universitaires	
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique

## Remerciements :

---

### **A Madame la Professeur Véronique DE MAS,**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier au Laboratoire d’Hématologie au CHU de Toulouse*

Je sais que tu es très sollicitée pour participer aux thèses donc je te remercie d’avoir accepté de faire partie de mon jury et surtout de le présider. C’est une grande chance pour moi d’avoir pu travailler à tes côtés plusieurs mois à l’Oncopole. Je te remercie pour toutes les connaissances que tu m’as transmises et pour les bons moments que l’on a passés ensemble.

### **A Monsieur le Professeur Loïc YSEBAERT,**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier dans le Service d’Hématologie de l’Institut Universitaire de Cancérologie de Toulouse – Oncopole*

Je vous remercie d’avoir accepté de faire partie de mon jury. C’est un honneur de pouvoir compter sur vous pour apporter vos connaissances, votre expérience et votre expertise clinique sur ce travail. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

### **A Monsieur le Docteur Jean-Baptiste RIEU,**

*Praticien Hospitalier au Laboratoire d’Hématologie au CHU de Toulouse*

Je ne peux que te remercier pour tous ces moments passés avec toi à l’Oncopole. Tes compétences de cytologiste et tes facultés à les enseigner constituent une véritable chance pour tous ceux qui travaillent à tes côtés. Tu resteras, pour moi, un exemple à suivre. Nous te remercions aussi pour le « petit Rieu », ce livre qui va nous suivre tout au long de notre carrière. Merci pour tout, et j’espère ne pas avoir trop altéré ton égo avec nos parties de basket.

### **A Monsieur le Docteur François VERGEZ,**

*Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier au Laboratoire d’Hématologie au CHU de Toulouse*

Nous ne nous connaissions pas lorsque tu m’as proposé ce projet. Je te remercie de m’avoir fait confiance et j’espère avoir été à la hauteur. J’ai vraiment passé de bons moments à travailler sur ce sujet, que ce soit sur le plan professionnel ou humain. Je te remercie pour tous tes conseils, toujours accompagnés d’un sourire et de ta bonne humeur. Tu as toujours été disponible et répondu présent. Je n’ai même pas eu besoin de te harceler...je suis un peu déçu ! Je garderai en mémoire, et avec une certaine nostalgie, nos longs moments passés à réaliser nos courbes de ROC. Merci beaucoup.

## **A toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail**

Aux techniciennes de CMF de l'Oncopole, merci à vous d'avoir consacré du temps pour cette étude et de m'avoir initié à la cytométrie de flux.

Merci à **Aurélie** et à tous ceux qui ont participé à la collecte des données depuis 2016.

### **Un grand MERCI**

A tous les **biologistes, techniciens** et à tout **le personnel hospitalier** que j'ai eu la chance de croiser pendant mes années d'interne. Ce fut une incroyable expérience professionnelle et humaine que je n'oublierai jamais.

Merci à toi, **Jérôme**, qui m'aura permis de passer tous mes diplômes de préleveur. Les moments passés avec toi au laboratoire et en dehors auront été enrichissants.

Merci **Fabien** pour tes coups de gueule et toutes ces parties de racquetball. Je l'avoue aujourd'hui, je t'ai laissé gagner pendant 1 an.

Merci également à toi, **Magali**, pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Merci **Yannick**, c'était un réel plaisir de pouvoir travailler avec toi et toujours dans la bonne humeur. Tu m'as beaucoup apporté. J'espère que nous resterons en contact, en attendant.... Quand est-ce que nous commençons une nouvelle saison MPG ?

Merci **Laetitia** pour ton initiation à la biologie moléculaire ; nos après-midi aux microscopes vont me manquer. J'espère que l'on pourra, prochainement, faire une soirée « Top chef » devant les plats de ta sœur !

Merci **Lucie** pour toutes les connaissances que tu nous as transmises. Dommage, je n'aurais jamais eu ma semaine en cytogénétique...satané Covid !

Enfin, merci à la super équipe de Cahors (**Nathalie, Claire, Barni**) avec qui je finis en beauté cette aventure.

### **A mes amis et Co-internes**

#### **Par ordre chronologique :**

Merci à mes amis d'enfance : **Jul** et **Yann**. Nous nous sommes vus grandir et évoluer du collège à aujourd'hui. Des kilomètres nous ont séparés sans jamais compromettre la simplicité et la sincérité de notre amitié.

#### **A mes amis de fac:**

Merci **l'agneau** pour ta générosité, ton authenticité, et pour la bonne humeur que tu partages autour de toi. Tu m'as interpellé à la BU santé et tu ne m'as jamais déçu depuis toutes ces années.

Merci **PA** et **Marin** pour tous les moments que l'on a passé aux Tripodes, chez vous, à manger, à boire et chanter du Brassens ou du Charlélie Couture. C'est toujours un régal de passer du temps avec vous, **Laurie** et **Claire**. Merci **Zarour**, mon Interiste préféré !

Merci à mes deux binômes. **Badiano** mon binôme parfait d'une année ; et **Cabrolito**, nous avons formé un beau duo, que ce soit en TP ou sur les terrains de foot.

A **Gwen**, toujours fidèle pendant ces années de faculté.

A **Charlotte** qui a toujours été présente et prête à me booster pendant les révisions du concours.

Ces années à la faculté ont été belles grâce à toutes les personnes qui m'ont entouré. J'ai peut-être travaillé un peu trop mais je vous remercie de m'avoir toujours été fidèle.

### Le concours en poche, vient le temps de l'internat :

#### Limoges, ma ville d'accueil !

Merci à **Sébastien**, on se connaissait déjà à la fac mais je suis obligé de te mettre dans cette partie tant on a partagé de bons moments sur Limoges. Tu es et tu auras été un ami, un colocataire, un co-interne et un partenaire de sport parfait. A nos burgers, nos omelettes à 12 œuf, nos parties de fléchettes, de billard, de ping-pong et nos séries ! A la petite **Chacha**, toujours de bonne humeur, même quand elle nous tapissait notre mur de fléchettes.

Je remercie **Guillaume** mon fidèle partenaire pendant mon niveau 1 d'interne. On a formé un beau duo. Je me suis régalé avec toi au labo et en dehors. On a formé une belle coloc pendant 6 mois. Nous avons formé un groupe juste parfait avec **MF** et **Maher**.

Comment ne pas mentionner **Paola**, **Claudia**, **Florence**, **Céline** et **Malika**, toutes différentes mais toutes des personnes super.

Merci à **Renan** pour toutes tes défaites au foot, au ping-pong, au padel et à Fifa.

Merci à **Caro**, **Cassandra**, **Julie** et **Camille**. Nous avons passé un semestre d'été parfait malgré la victoire de la France en coupe du monde.

J'ai vraiment rencontré de belles personnes à Limoges. Je ne suis pas le meilleur pour donner des nouvelles et je m'en excuse mais je ne vous oublierai pas.

#### Ensuite, le grand retour sur Toulouse... enfin ☺ !

Je ne peux que remercier mes deux chouchous Toulousains **Alban** (le Palois) et **Dodo** (le mec de Saint-Yorre). Je préfère vous les citer ensemble au risque de les confondre. Je cite, bien sûr en suivant, **Maximin**, le seul gars capable de faire des compte éosino/pas éosino, **Ali** le mec le plus attachant et **Hugo** l'élève le plus prometteur que j'ai eu au Baby.

**Anais**, on m'avait prévenu que ton caractère et mon humour allaient, peut être, être incompatible et pourtant... Un super semestre avec toi ! J'en aurais bien fait d'autres. Tu es une personne compétente, sérieuse et sur qui on peut compter donc merci.

Je remercie également **Imane** et **Orancie** avec qui j'ai passé un super semestre en hématologie et **Marine** pour les belles gardes que nous avons faites ensemble.

#### Puis, pour boucler la boucle : retour à Cahors !

A croire, encore une fois, que je suis chanceux ! Je rencontre ou re-rencontre des gens incroyable et toujours motivés pour tout. Des personnes avec qui l'on se sent immédiatement proches. Elles m'ont permis de redécouvrir Cahors donc merci à vous la team des 4 B (**Barni**, **Bérange**, **Béné** et **Benoit**), **Pierre** et **Isa**, **Fred** et la team infectio dont **Léo**, le directeur et promoteur officiel du festival à Ausset le Ton.

## A ma famille

Merci à **papa, maman**, mon **frérot** et ma **soeurette** ! Vous êtes ma petite famille, ma fierté, mon bonheur, mon équilibre. Je suis l'homme le plus chanceux d'avoir ce noyau dur depuis 29 ans. Vous avez toujours été présent pour moi, c'est une force de vous avoir. Je ne vous remercierai jamais assez, il n'y a pas de mot pour ça.

Merci à mes **grands-parents**, vous êtes et vous avez été indispensable à tous les stades de ma vie. J'ai tellement passé de beaux moments à vos côtés, tellement appris et tellement bien mangé !!! Des grands-parents parfaits. Il n'y a pas un jour sans que je pense à chacun d'entre vous. Vous êtes un exemple pour moi.

Je remercie tous **les Cecco** et tous **les Sauvé** en passant par **Emilie, Pippo, Gégé, Jojo, Cricri, la famille Maftouh, Lisa, Milan** et **Rémi**. On en a passé des beaux moments... et c'est loin d'être fini ;) ce n'est même que le début ! Merci **Myriam** pour la maison du Montat, tu nous auras permis de passer un super été à Cahors, de faire mon premier potager et de terminer ma thèse dans les meilleures conditions qui soient !

Un grand merci à **Jacques** et **Agnès** qui m'accompagnent depuis mes 14 ans sans m'avoir pour autant choisi. Je sais que je pourrai toujours compter sur vous.

A **Edith**, tu as toujours eu les mots justes pour m'encourager et pour me donner de la force. Tu as un don pour ça. Tu as choisi **Jordan** pour t'accompagner dans la vie. Je vais m'abstenir de le remercier car il serait trop content. Enfin, je suis le tonton par « alliance » le plus heureux avec ces **2 petits trésors**. Je vais enfin pouvoir monter mon équipe mixte de foot.

## A ma moitié

Merci de m'accepter comme je suis, merci de m'avoir accompagné depuis toutes ces années. Chaque jour, chaque année passée avec toi ne fait que confirmer la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés. Quoi de plus rassurant que de savoir que nous avons encore tant de choses à découvrir ensemble. A notre moitié de vie passée ensemble et à toutes les belles années qui nous attendent.

Et merci de supporter la Roma et l'Italie !

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>9</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>	<b>11</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>14</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>15</b>
I. A. Les différentes étapes de la lymphopoïèse B : de la cellule souche hématopoïétique à la différenciation plasmocytaire .....	17
I. A. 1. Phase indépendante de l'antigène.....	17
I. A. 2. Phase dépendante de l'antigène .....	17
I. B. Mécanismes des lésions génétiques et origines cellulaires des lymphomes.....	18
I. B. 1. Mécanismes des lésions génétiques .....	18
I. B. 2. Origine cellulaire des lymphomes .....	19
I. C. Les différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B).....	20
I. C. 1. Les formes d'emblée leucémiques.....	20
I. C. 1. 1. La leucémie lymphoïde chronique (CLL).....	20
I. C. 1. 2. La leucémie à tricholeucocytes (HCL).....	24
I. C. 1. 3. La leucémie prolymphocytaire B (B-PLL).....	26
I. C. 2. Les formes lymphomateuses secondairement leucémiques .....	27
I. C. 2. 1. Les lymphomes de la zone marginale (MZL) .....	27
I. C. 2. 1. 1. Les lymphomes du MALT.....	29
I. C. 2. 1. 2. MZL splénique.....	29
I. C. 2. 1. 3. Le NMZL.....	30
I. C. 2. 2. Le lymphome du manteau (MCL) .....	30
I. C. 2. 3. Le lymphome folliculaire (FL) .....	33
I. C. 2. 4. La macroglobulinémie de Waldenström (WM).....	35
I. C. 2. 5. Le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) .....	38
I. D. Le rôle de la cytométrie en flux dans le diagnostic des SLPC-B.....	40
I. D. 1. L'intérêt de l'immunophénotypage dans les SLPC-B.....	40
I. D. 1. 1. Les caractéristiques phénotypiques de la CLL.....	40
I. D. 1. 2. Les caractéristiques phénotypiques de la HCL .....	41
I. D. 1. 3. CD200 .....	42
I. D. 1. 4. ROR1.....	42
I. D. 1. 5. CD180 .....	42
<b>II. Matériel et méthode.....</b>	<b>43</b>
II. A. Sélection des échantillons .....	43
II. B. Appareil d'analyse et marquage des populations lymphocytaires .....	44
II. B. 1. Appareil d'analyse .....	44

II. B. 2.	Marquage des populations lymphocytaires .....	44
II. C.	Analyse des résultats .....	44
<b>III.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>47</b>
III. A.	Répartition des différents syndromes lymphoprolifératifs B en fonction de l'expression des marqueurs ROR1, CD180, CD200.....	47
III. A. 1.	Expression du ROR1 dans les SLPC-B.....	47
III. A. 2.	Expression du CD180 dans les SLPC-B .....	48
III. A. 3.	Expression du CD200 au sein de chaque SLPC-B.....	48
III. B.	Réalisation de l'algorithme.....	49
III. B. 1.	Etude des marqueurs sur la cohorte initiale .....	49
III. B. 2.	Etude des marqueurs sur la population CD5 high.....	52
III. B. 3.	Etude des marqueurs sur la population CD5 mid.....	56
III. B. 4.	Etude des marqueurs sur la population CD5 low .....	59
III. B. 4. 1.	Etude des marqueurs sur la population CD5low-ROR high.....	59
III. B. 4. 2.	Etude des marqueurs sur la population CD5low-ROR mid.....	60
III. B. 4. 3.	Etudes des marqueurs sur la population CD5low-ROR low .....	61
III. C.	Hétérogénéité des SLPC-B .....	63
III. D.	Validation de l'algorithme .....	64
<b>IV.</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>66</b>
<b>V.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>70</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>AC</b>	Anticorps
<b>AUC</b>	Aire sous la courbe de ROC
<b>BCR</b>	Récepteur des lymphocytes B
<b>BL</b>	Lymphome de Burkitt
<b>B-PLL</b>	Leucémie prolymphocytaire B
<b>CG</b>	Centre germinatif
<b>CLL</b>	Leucémie lymphoïde chronique
<b>CMF</b>	Cytométrie en flux
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigène
<b>CSH</b>	Cellule souche hématopoïétique
<b>CT</b>	Translocation chromosomique
<b>DLBCL</b>	Lymphome B diffus à grandes cellules
<b>FISH</b>	L'hybridation fluorescente in situ
<b>FL</b>	Lymphome folliculaire
<b>FN</b>	Faux négatif
<b>FP</b>	Faux positif
<b>GEIL</b>	Groupe d'étude immunologique des leucémies
<b>HCL</b>	Leucémie à tricholeucocytes
<b>vHCL</b>	Leucémie à tricholeucocytes variante
<b>HMS</b>	Hypermutation somatique
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IGH</b>	Chaines lourdes des immunoglobulines
<b>IGHV</b>	Région variable des chaines lourdes des immunoglobulines
<b>IUCT-O</b>	Institut universitaire du cancer de Toulouse Oncopole
<b>LB</b>	Lymphocyte B
<b>LNH</b>	Lymphome non hodgkinien

<b>LPL</b>	Lymphome lymphoplasmocytaire
<b>MALT</b>	Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses
<b>MBL</b>	Lymphocytose B monoclonale
<b>MCL</b>	Lymphome à cellules du manteau
<b>M-CLL</b>	Leucémie lymphoïde chronique à chaînes des immunoglobulines mutées
<b>MFI</b>	Moyenne d'intensité des fluorescences
<b>MGUS</b>	Gammopathie monoclonale de signification indéterminée
<b>MZL</b>	Lymphome de la zone marginale
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>ROC</b>	Caractéristique de fonctionnement du récepteur
<b>RTK</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase
<b>SLL</b>	Lymphome lymphocytaire
<b>SLPC-B</b>	Syndrome lymphoprolifératif chronique B
<b>SDRPL</b>	Lymphome splénique diffus de la pulpe rouge avec lymphocytes villeux
<b>SMZL</b>	Lymphome splénique de la zone marginale
<b>TSM</b>	Incidence standardisée mondiale
<b>U-CLL</b>	Leucémie lymphoïde chronique à chaînes des immunoglobulines non mutées
<b>V-HCL</b>	Leucémie à tricholeucocytes variantes
<b>VN</b>	Vrai négatif
<b>VP</b>	Vrai positif
<b>VPN</b>	Valeur prédictive négative
<b>VPP</b>	Valeur prédictive positive
<b>WM</b>	Maladie de Waldenström

## TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différentes étapes de la lymphopoïèse B à partir du précurseur B d'après Küppers et al.....	18
Figure 2 : Mécanisme d'une translocation de type t(14;18) (q32;q21) .....	19
Figure 3 : Taux d'incidence par classe d'âge en France en 2018 pour la CLL/SLL .....	20
Figure 4 : Origine cellulaire de la CLL. L'acronyme TD représente la stimulation T dépendante, TI la stimulation T indépendante. Les éclairs mettent en évidence la survenu d'aberrations génétiques et épigénétiques.....	21
Figure 5 : Frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa à fort grossissement (x1000) d'un patient atteint d'une CLL .....	22
Figure 6 : CLL d'aspect vieilli avec quelques lymphocytes à rapport nucléocytoplasmique intermédiaire.....	22
Figure 7 : CLL avec un contour nucléaire irrégulier parfois en « forme de cœur ». Morphologie associée à une trisomie 12 .....	22
Figure 8 : CLL polymphocytoïde avec un taux de polymphocytes inférieur à 55 % .....	23
Figure 9 : Représentation des différents profils d'aberrations entraînant la perte de la fonction de la protéine TP53 .....	23
Figure 10 : A. Voie de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK dans le HCL. B. Mise en évidence de l'activation in vivo de la voie RAF-MEK-ERK chez les patients HCL illustrée par l'expression de pERK (rouge) et de la cycline-D1 (marron) dans une biopsie de moelle osseuse .....	24
Figure 11 : Tricholeucocytes sur un prélèvement médullaire après colorations au MGG.....	25
Figure 12 Tricholeucocytes sur un frottis sanguin après colorations au MGG .....	25
Figure 13 : Tricholeucocytes variants sur un frottis sanguin coloré au MGG .....	26
Figure 14 : B-PLL sur un frottis sanguin coloré au MGG a,b Cellules B-PLL avec son nucléole proéminent. c,d Frottis sanguin de CLL avec présence de cellules polymphocytaires B (flèches noir), de lymphocytes de la CLL (flèches rouge), et des ombres de Gumprecht (flèches bleu). e Cellules de v-HCL avec présence de villosités et d'un nucléole. f Cellule d'un SMZL. g,h Cellules polymphocytaires T .....	27
Figure 15 : Les principaux pathogènes pouvant être associés aux MZL. ....	28
Figure 16 : Pathogénèse du MCL.....	31
Figure 17 : Dissémination sanguine d'un MCL sous sa forme classique .....	32

Figure 18 : Dissémination sanguine d'un MCL sous sa forme blastoïde (flèche noir) et forme classique (flèche rouge) .....	32
Figure 19 : Développement d'un LF : un processus multi-étape.....	33
Figure 20 : Aspect au grossissement *1000 dans le sang d'un FL.....	34
Figure 21 : Schéma d'une IgM monomère et d'un modèle pentamérisé formant une macroglobuline .....	35
Figure 22 : Blocage de maturation de la cellule B dans la WM.....	36
Figure 23 : Infiltrat polymorphe médullaire chez un patient atteint de WM suite à une aspiration de moelle osseuse .....	37
Figure 24 : Algorithme selon Hans .....	38
Figure 25 : Mise en évidence de cellules d'un DLBCL sur un frottis sanguin .....	39
Figure 26 : Marquage des cellules par l'intermédiaire d'un anticorps couplé à un fluorochrome.....	40
Figure 27: Répartition des différents SLPC-B en fonction du type d'échantillon.....	43
Figure 28 : Courbes de ROC des différents marqueurs dans le but de différencier les CLL/aCLL des autres SLPC-B.....	45
Figure 29 : MFI du ROR1 (à gauche) et pourcentage de positivité du ROR1 (à droite) en fonction des types de SLPC-B.....	47
Figure 30 : Répartition des SLPC-B en fonction de la MFI du CD180 (à gauche) et du pourcentage de positivité du CD180 (à droite) .....	48
Figure 31 : Répartition des SLPC-B en fonction de la MFI du CD200 (à gauche) et du pourcentage de positivité du CD200 (à droite) .....	48
Figure 32 : Histogramme représentant la prévalence des différents SLPC-B dans notre population de malades .....	49
Figure 33 : Courbes de ROC pour distinguer le FL des formes non-FL.....	50
Figure 34 : Seuils obtenus pour chaque marqueur sur la cohorte initiale .....	51
Figure 35 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B en fonction de l'expression du CD5 .....	51
Figure 36 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5 high en fonction de l'expression du CD79b ratio .....	52
Figure 37 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5high-CD79bratiohigh en fonction de l'expression du CD200.....	53
Figure 38 : Algorithme décisionnel de la population CD5 high .....	54

Figure 39 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5mid en fonction de l'expression du CD23 .....	56
Figure 40 : Algorithme décisionnel pour la population CD5 mid .....	57
Figure 41 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5low en fonction de l'expression du ROR.....	59
Figure 42 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5lowRORhigh en fonction de la MFI du CD200.....	60
Figure 43 : Algorithme décisionnel de la population CD5 low .....	62
Figure 44 : Représentation graphique des différents clusters en pourcentage au sein des SLPC-B.....	63
Figure 45 : Répartition des SLPC-B de notre cohorte de validation en fonction du type d'échantillon	64

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification révisée de l'OMS 2016 des hémopathies lymphoïdes B à cellules matures	16
Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques des SLPC-B	41
Tableau 2 : Score de Matutes et Moreau	41
Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des AUC obtenues pour différencier les SLPC-B	45
Tableau 5 : Tableau représentant la capacité des marqueurs à différencier les différents SLPC-B	50
Tableau 6 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5 high	52
Tableau 7 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5 high-CD79bratio high	53
Tableau 8 : Tableau résumant les performances de l'algorithme de la population CD5 high avec VP (vrai positif), VN (vrai négatif), FP (Faux positif), FN (faux négatif), VPP (valeur prédictive positive), VPN (valeur prédictive négative)	55
Tableau 9 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5mid	56
Tableau 10 : Tableau résumant les performances de l'algorithme de la population CD5 mid avec VP (vrai positif), VN (vrai négatif), FP (Faux positif), FN (faux négatif), VPP (valeur prédictive positive), VPN (valeur prédictive négative)	58
Tableau 11 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs pour différencier les SLPC-B CD5low	59
Tableau 12 : Tableau récapitulatif représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5low-RORhigh	59
Tableau 13 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5low-RORmid	60
Tableau 14 : Tableau récapitulatif représentant la capacité des différents marqueurs pour différencier les SLPC-B CD5low-RORlow	61
Tableau 15 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5low-RORlow-CD10low	61
Tableau 16 : Tableau résumant les performances de l'algorithme de la population CD5 low avec VP (vrai positif), VN (vrai négatif), FP (Faux positif), FN (faux négatif), VPP (valeur prédictive positive), VPN (valeur prédictive négative)	63
Tableau 17 : Recueil des résultats de notre cohorte de validation après application de l'algorithme décisionnel	65

## I. Introduction

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B) correspondent à une prolifération de cellules lymphoïdes de la lignée B à un stade mature de leur développement. C'est un groupe qui comprend un ensemble de pathologies distinctes avec une évolution et une prise en charge différente pour chaque entité. Il est alors important de comprendre, de maîtriser et d'être capable de les classer de manière précise.

Au laboratoire de biologie médicale, nous disposons d'un ensemble de techniques permettant de différencier les SLPC-B. La cytométrie en flux (CMF) en fait partie. Elle est capable de classer les populations et les sous populations cellulaires. Ainsi, il est possible de détecter des proliférations anormales de cellules tumorales et donc de mettre en évidence des clones lymphocytaires. L'objectif final de cette technique est d'aiguiller le clinicien pour confirmer ses premières hypothèses diagnostiques. Cependant, il est parfois difficile pour le biologiste de réussir à classer les différents SLPC-B par l'intermédiaire de la CMF. De plus, il n'existe pas à ce jour de procédure permettant de standardiser cette technique afin de diminuer la variabilité inter-laboratoires.

Le but de notre projet est d'élaborer, à l'aide de la CMF, un algorithme décisionnel pour guider le biologiste dans sa démarche diagnostique. Avec l'aide de cet algorithme, nous pourrions apprécier la répartition des différents SLPC-B en fonction de l'expression de marqueurs phénotypiques. Ce projet permettra également de mettre en avant les marqueurs les plus judicieux à utiliser. Ceci pourra guider le biologiste dans son choix de marqueurs pour élaborer ses panels d'anticorps monoclonaux et favorisera une homogénéisation des pratiques des laboratoires.

De grandes avancées au cours des soixante dernières années ont permis une meilleure compréhension des cellules lymphoïdes normales et néoplasiques. Elles ont abouti à la modification et à l'actualisation des différentes classifications des hémopathies lymphoïdes (1).

Historiquement entre 1956 et 1966, ce sont les publications du Dr. Rappaport qui ont conduit aux bases de la classification des lymphomes. Celles-ci s'appuyaient uniquement sur des critères morphologiques et cliniques (2). L'apparition et le développement des nouvelles technologies ont permis d'inclure des critères immunologiques et génotypiques. Ces progrès ont abouti en 1994 à la classification de REAL (Revised European American Lymphoma) (3). Cette dernière a été rédigée lors d'un consensus entre les membres de l'International Lymphoma Study Group réunissant cliniciens et pathologistes. Par la suite, le travail en commun de la *Society for Hematopathology* (SH) et de l'*European Association of Hematopathologists* (EAHP), avec l'appui de l'organisation mondiale de la santé (OMS), a conduit successivement à la classification de l'OMS 2001, 2008 et 2016. L'actualisation en fonction des progrès scientifiques, au fil des années, est primordiale (1).

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
<i>Lymphome / Leucémie B splénique, non classable</i>
<i>Lymphome B diffus à petites cellules de la pulpe rouge splénique</i>
<i>Leucémie à tricholeucocytes - variant</i>
Lymphome lymphoplasmocytaire
Macroglobulinémie de Waldenström
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgM*
Maladie des chaînes lourdes Mu
Maladie des chaînes lourdes gamma
Maladie des chaînes lourdes alpha
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgG/IgA*
Myélome multiple
Plasmocytome solitaire osseux
Plasmocytome extra-osseux
Maladie des dépôts d'immunoglobuline monoclonaux*
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire
<i>Lymphome de la zone marginale ganglionnaire de type pédiatrique</i>
Lymphome folliculaire
Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> *
Lymphome folliculaire de type duodénal*
Lymphome folliculaire de type pédiatrique*
<i>Lymphome à grandes cellules B avec réarrangement de IRF4*</i>
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif
Lymphome à cellules du manteau
Néoplasie à cellules du manteau <i>in situ</i> *
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), sans autre spécificité (NOS)
de type B du Centre germinatif*
de type Activé B*
Lymphome à grandes cellules B riche en lymphocytes T/histiocytes
DLBCL primitif du système nerveux central
DLBCL primitif cutané, de type jambe
DLBCL EBV+, NOS*
<i>Ulcère cutanéomuqueux EBV+*</i>
DLBCL associé à une inflammation chronique
Granulomatose lymphomatoïde
Lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin (thymique)
Lymphome à grandes cellules B intravasculaire
Lymphome à grandes cellules B ALK positif
Lymphome plasmablastique
Lymphome des séreuses
<i>DLBCL HHV8+, sans autre spécificité*</i>
Lymphome de Burkitt
<i>Lymphome Burkitt-like avec aberration 11q</i>
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

Tableau 1 : Classification révisée de l'OMS 2016 des hémopathies lymphoïdes B à cellules matures

Ci-dessus, nous pouvons voir la classification actuelle des lymphomes de 2016 (tableau1) (4). Elle correspond à un inventaire d'entités qui lorsque cela est possible, fait référence à la cellule d'origine du SLPC-B.

Afin de comprendre la genèse d'un lymphome, il est indispensable d'avoir des notions sur la lymphopoïèse B physiologique. Nous allons aborder les différentes étapes essentielles au développement d'un lymphocyte B (LB) et de sa transformation en une cellule maligne. Puis, nous déclinons les principales hémopathies lymphoïdes B à cellules matures et leurs caractéristiques. Enfin, nous ferons des rappels sur la CMF.

## **I. A. Les différentes étapes de la lymphopoïèse B : de la cellule souche hématopoïétique à la différenciation plasmocytaire.**

D'une façon schématique, la maturation d'un lymphocyte peut être représentée comme un cycle où les cellules lymphoïdes sont en circulation continue. Cette maturation débute par une cellule souche hématopoïétique (CSH) et conduit aux plasmocytes ou aux cellules B mémoires après avoir subi deux étapes spécifiques de maturation : une phase dite indépendante de l'antigène et une phase dépendante de l'antigène.

Lors de sa maturation, le lymphocyte passera par différentes étapes appelées « sélection positive » et « sélection négative » sous risque de rentrer précocement en apoptose.

### **I. A. 1. Phase indépendante de l'antigène**

Cette phase a lieu dans la moelle osseuse appelée « organe lymphoïde primaire ». A cet endroit se trouvent en faible nombre des CSH. Ces cellules vont être capables de se différencier et d'aboutir à des progéniteurs communs engagés dans des lignées lymphoïdes ou myéloïdes. Le progéniteur lymphoïde a la capacité de se différencier en un précurseur B, T ou NK. Le précurseur B va passer successivement par les stades pro-B, pré-B puis B immature sous l'influence d'interleukines. Durant ces étapes, les cellules vont subir des remaniements des gènes des immunoglobulines (Ig). Ces remaniements permettent d'aboutir à la formation d'un récepteur à la surface cellulaire appelé BCR. Ce récepteur est indispensable pour permettre aux LB de reconnaître un antigène et de déclencher une réponse immune. Cependant si ces mécanismes de remaniement conduisent à un BCR non fonctionnel ou reconnaissant un antigène du « soi », un processus de sélection négative est mis en place pour éradiquer le LB afin d'éviter toutes réponses inadaptées.

Une fois passée les étapes de sélection négative et positive, le LB, avec son BCR naïf (c'est-à-dire n'ayant pas rencontré d'antigène du « non soi ») doit s'éduquer. Pour cela, le lymphocyte sort de la moelle osseuse et va rejoindre, par l'intermédiaire du sang, la rate et les ganglions où va se dérouler la seconde phase de sélection, dépendante de l'antigène.

### **I. A. 2. Phase dépendante de l'antigène**

Le lymphocyte lors de cette phase, va patrouiller jusqu'à rencontrer son antigène et éduquer son BCR. Pour optimiser ses chances de rencontrer l'antigène, le LB circule en continue dans les tissus et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate, plaques de Peyer).

Les antigènes sont présentés par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) telles que les cellules dendritiques. Les LB vont pouvoir reconnaître l'antigène grâce à leur BCR et proliférer. Par la sécrétion de diverses cytokines, les lymphocytes T jouent un rôle important dans cette étape. Certains LB sécréteront alors une IgM de faible affinité pour l'antigène et d'autres migreront vers le follicule primaire puis vers le centre germinatif (CG) du follicule secondaire. Ces derniers lymphocytes subiront alors des modifications afin d'augmenter leur affinité à l'antigène.

La première modification à intervenir est le processus d'hypermutation somatique (HMS). Il correspond à la survenue de mutations ponctuelles dans les régions variables des chaînes lourdes et légères. Ce mécanisme est important pour augmenter l'affinité et éduquer le récepteur en vue d'une

réponse optimale contre l'antigène. Une sélection positive permet alors d'éradiquer les LB ne reconnaissant pas l'antigène du non-soi par un mécanisme d'apoptose programmée.

La deuxième modification est la commutation de classe ou « switch » isotypique. Ce processus permettra, par un mécanisme de réarrangement des régions constantes, la production des autres types d'Ig (IgE, IgA, IgG).

Une fois ces deux événements réalisés, les cellules vont proliférer pour augmenter leurs nombres afin de bien répondre à l'agent agresseur. Elles vont finir leurs différenciations en cellules B mémoires et en plasmocytes qui retourneront dans la moelle osseuse (figure 1) (5).

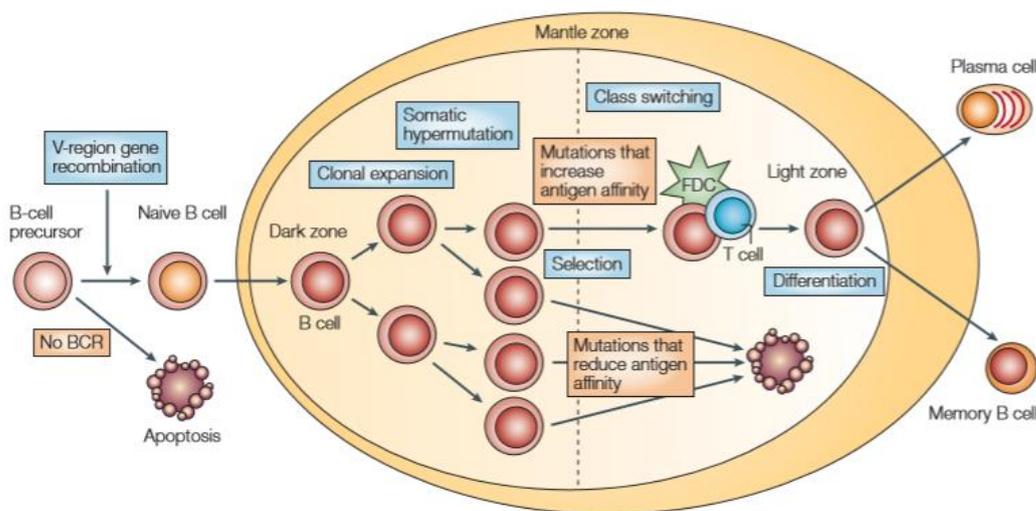


Figure 1 : Représentation des différentes étapes de la lymphopoïèse B à partir du précurseur B d'après Küppers et al

## I. B. Mécanismes des lésions génétiques et origines cellulaires des lymphomes

De nombreuses étapes clés de la lymphopoïèse B, permettant la différenciation des LB et la diversification des anticorps (AC), favorisent la survenue d'anomalies génomiques. Ces anomalies peuvent être des translocations de fragments chromosomiques ou des mutations ponctuelles impliquant des oncogènes. Ces événements peuvent favoriser le développement de cellules tumorales en facilitant leur croissance et leur survie.

### I. B. 1. Mécanismes des lésions génétiques

La translocation chromosomique (CT) est une aberration chromosomique caractérisée par l'échange réciproque d'une partie d'un chromosome entre deux chromosomes non-homologue. Dans les SLPC-B, les CT ont lieu principalement pendant les remaniements des gènes des Ig.

Ces translocations peuvent entraîner une dérégulation de certains oncogènes. Par exemple, on peut observer chez les patients atteints d'un lymphome folliculaire (FL) une CT de type t (14;18) (q32;q21). Cet événement juxtapose l'oncogène *BCL2* situé sur le chromosome 18q21 et la région codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (IGH) en 14q32. Ce phénomène aboutit à un

réarrangement *IGH/BCL2*. L'oncogène est sous le contrôle du promoteur des *IGH*, cela entraîne une surexpression de *BCL2*, protéine anti-apoptotique (figure 2) (6).

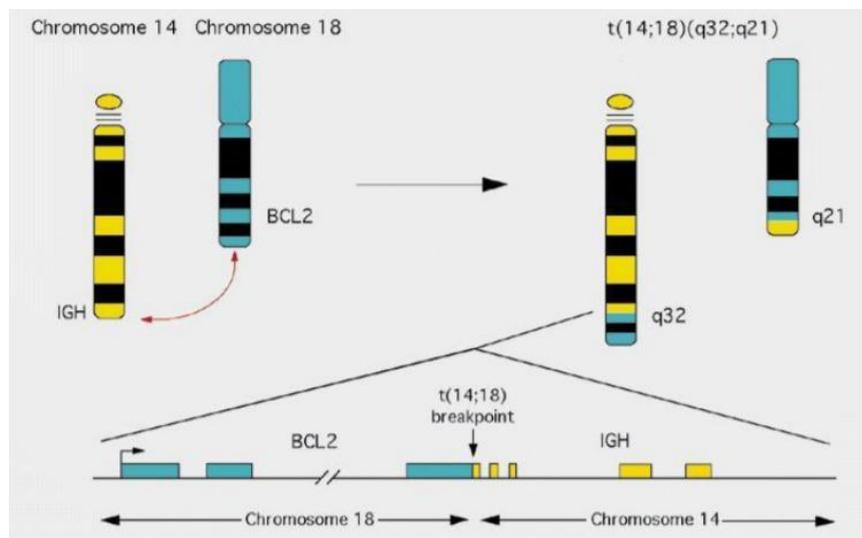


Figure 2 : Mécanisme d'une translocation de type *t(14;18)(q32;q21)*

Pour parvenir à une transformation lymphomateuse, plusieurs événements génétiques sont nécessaires. Elle suit un modèle d'oncogenèse dit « multi-hits ». Effectivement, on retrouve certaines CT chez des patients sains. En 1991, le Dr. Limpens et son équipe ont mis en évidence la CT de type *t(14;18)(q32;q21)* dans des cellules non malignes. Cela suggère que cette translocation, à elle seule, n'est pas suffisante pour produire une tumeur. Elle nécessite la survenue d'autres mécanismes génétiques pour conduire à une cellule maligne, telles que des anomalies du nombre de copies de gènes et/ou des mutations ponctuelles entraînant des gains ou des pertes de fonction (7) (8).

### I. B. 2. Origine cellulaire des lymphomes

Chaque type de lymphomes possède une ressemblance phénotypique avec une cellule B normale, on parle de contrepartie tumorale. En 2005, Küppers et son équipe ont montré le blocage à un stade de différenciation des cellules malignes. Ainsi, l'origine cellulaire des différents lymphomes non hodgkinien (LNH) peut être déduite de l'état de réarrangement du gène des immunoglobulines et de l'étude des marqueurs membranaires (5). Par conséquent, le LB mature du pré-CG semble être la contre partie normale de la plupart des lymphomes à cellules du manteau (MCL), des leucémies lymphoïdes chroniques à *IGH* non mutées (U-CLL, unmutated chronic lymphocytic leukemia) et de son égal ganglionnaire, le lymphome lymphocytaire (SLL). Le lymphome folliculaire (FL), le lymphome lympho-plasmocytaire (LPL), le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBC) et le lymphome du Burkitt (BL) pourraient provenir d'une cellule B du CG. Enfin, le LB mature du post-CG semble être la contre partie de la leucémie lymphoïde chronique au profil *IGH* muté (M-CLL, mutated CLL), des lymphomes de la zone marginale (MZL) et de la leucémie à tricholeucocytes (HCL).

## I. C. Les différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B)

Les SLPC-B sont des proliférations malignes tumorales qui se développent principalement au niveau des ganglions mais parfois au niveau extra-ganglionnaires. On parlera de phase leucémique de la maladie lorsque les cellules cancéreuses diffusent à travers le sang périphérique. Certains SLPC-B sont préférentiellement d'emblée leucémiques contrairement à d'autres qui le sont secondairement.

### I. C. 1. Les formes d'emblée leucémiques

#### I. C. 1. 1. La leucémie lymphoïde chronique (CLL)

Le terme « leucémie » est utilisé car on observe, au cours d'une CLL, une hyperlymphocytose liée à la circulation sanguine des cellules tumorales. Elle possède un analogue d'expression purement tumorale, le SLL. Effectivement, ces deux entités partagent les mêmes caractéristiques physiopathologiques (9) (10).

La CLL est la plus répandue des leucémies chroniques survenant chez l'adulte en Europe et aux USA. En France, on compte 4674 nouveaux cas de CLL/SLL en 2018. L'incidence standardisée sur la population mondiale (TSM) est de 4,4 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 2,2 personnes-années chez les femmes soit un rapport hommes/femmes autour de 2. Il s'agit d'une pathologie du sujet âgé avec un âge médian au diagnostic de 71 ans et un taux d'incidence qui augmente avec l'âge (figure 3) (11).

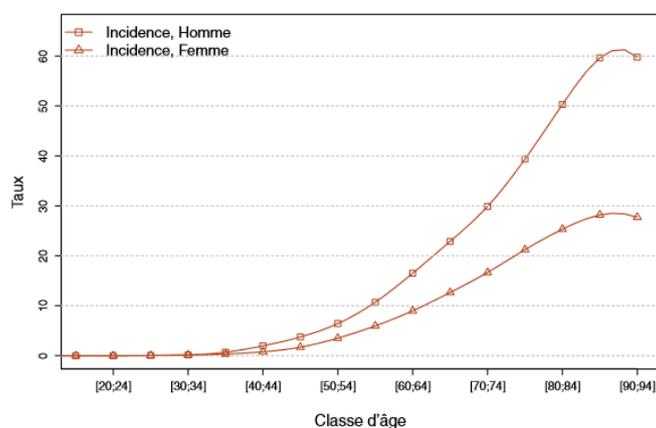


Figure 3 : Taux d'incidence par classe d'âge en France en 2018 pour la CLL/SLL

L'origine cellulaire de la CLL est encore mal connue et débattue. Néanmoins, une hypothèse avance que les premiers événements génétiques ont lieu dans les CSH. D'après l'étude de Kikushige et al en 2011, la transplantation chez des souris de CSH de patients atteints de CLL (CSH-CLL), entraîne le développement chez ces rongeurs, de cellules B monoclonales de phénotype proche de celui de la CLL (12). En effet, ces CSH-CLL ayant subi des événements oncogénétiques, produiraient une population portant toutes les mêmes anomalies. Par la suite, les stimulations antigéniques T dépendantes ou T indépendantes entraînent la formation de deux groupes. Le premier groupe a subi une excitation antigénique par l'intermédiaire des lymphocytes T. Leur maturation passe alors par le CG où le phénomène HMS aura lieu donnant des régions variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHv) mutées (M-CLL). Le second groupe a subi une stimulation antigénique T indépendante et donc une absence de mutation des régions IGHv (U-CLL). L'apparition de nouveaux

événements génétiques et épigénétiques entraîne une sélection clonale et le développement d'une Lymphocytose Monoclonale B (MBL) puis d'une CLL (figure 4) (13).

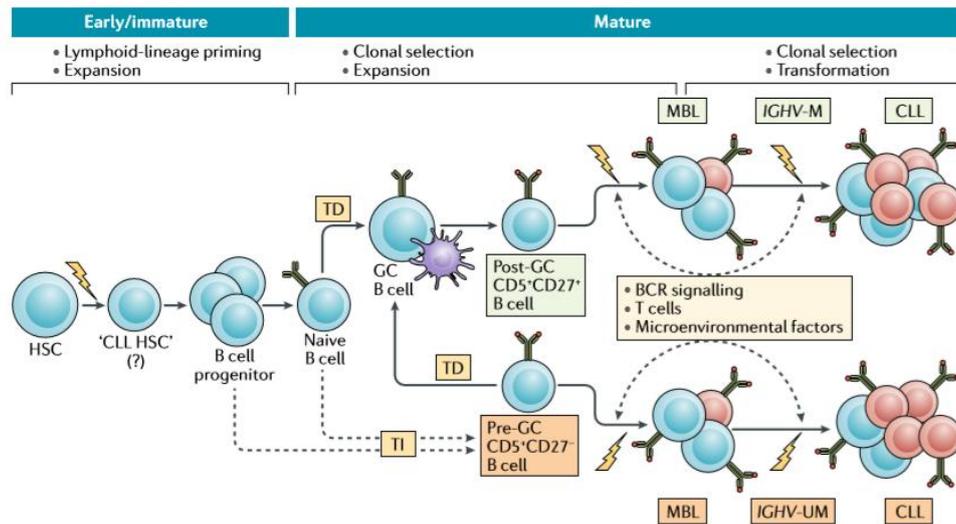


Figure 4 : Origine cellulaire de la CLL. L'acronyme TD représente la stimulation T dépendante, TI la stimulation T indépendante. Les éclairs mettent en évidence la survenue d'aberrations génétiques et épigénétiques

Il s'agit d'une maladie le plus souvent indolente. Cependant, on observe une hétérogénéité d'évolution en fonction des patients. Chez certains, la maladie évolue à bas bruit sans entrainer de retentissement sur le train de vie habituelle. Dans ce cas, une simple surveillance médicale régulière est suffisante. A l'inverse, peuvent apparaître une progression du syndrome tumorale, une hyperlymphocytose majeure, des signes de symptômes B (fièvre, sueur nocturne, perte de poids importante). Une transformation en un lymphome de haut grade agressif se produit dans 2 à 10% des situations (14).

Dans près de 80% des cas, le diagnostic est posé au cours d'un examen de routine alors que les patients sont asymptomatiques.

Le diagnostic de la CLL nécessite la présence dans le sang périphérique de plus de 5 G/L de lymphocytes clonaux pendant au moins 3 mois. En dessous de 5 G/L et en l'absence de signes de maladie active, on parle de MBL. Cette nouvelle entité a été décrite dans la 3<sup>ème</sup> révision de la classification de l'OMS 2008. A l'époque, nous ne savions pas si la MBL était un précurseur de CLL. Il est mentionné depuis 2016 que la MBL précède les cas de CLL ou de SLL. L'édition de l'OMS de 2016 a même différencié deux types de MBL. Le MBL à valeur absolue basse en lymphocytes clonaux < 0,5 G/L et de haut compte entre 0,5 et 5 G/L. Le premier a un faible risque évolutif et ne nécessite pas forcément de suivi à la différence du second (1) (9).

L'analyse du frottis sanguin, nous permet de mettre en évidence de petits lymphocytes matures d'aspect monomorphe avec un rapport nucléocytoplasmique élevé, une chromatine écaillée et un cytoplasme peu abondant. Ces lymphocytes sont accompagnés de cellules éclatées appelées

« ombres de Gumprecht ». Ces ombres sont liées à la fragilité des cellules clonales qui se lysent lors de la réalisation du frottis sanguin (figure 5) (14).

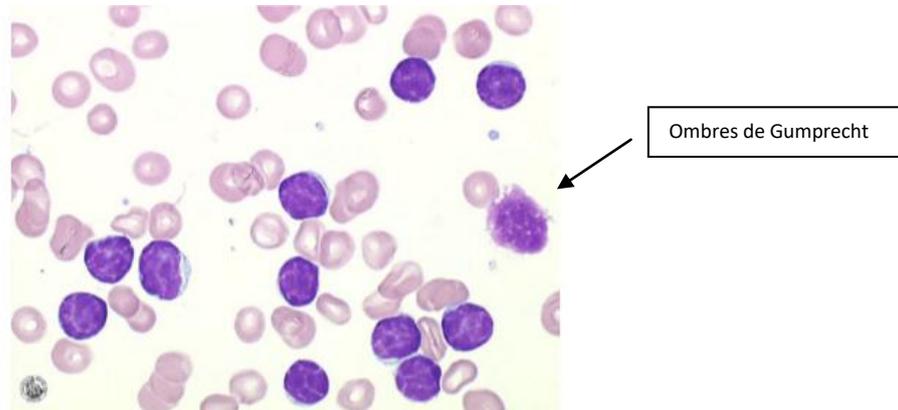


Figure 5 : Frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa à fort grossissement (x1000) d'un patient atteint d'une CLL

Le diagnostic ne peut reposer uniquement sur la cytologie car dans certaines situations, la morphologie des lymphocytes se présente de manière atypique avec des irrégularités nucléaires, un aspect vieilli ou une allure polymphocytoïde. Lorsque les cellules sont de grandes tailles avec une chromatine immature, on pourra évoquer une transformation en lymphome de haut grade (syndrome de Richter).

Variants morphologiques de la CLL (15) :

Figure 6 : CLL d'aspect vieilli avec quelques lymphocytes à rapport nucléocytoplasmique intermédiaire

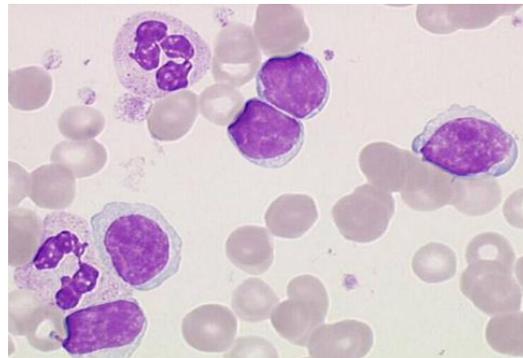


Figure 7 : CLL avec un contour nucléaire irrégulier parfois en « forme de cœur ». Morphologie associée à une trisomie 12

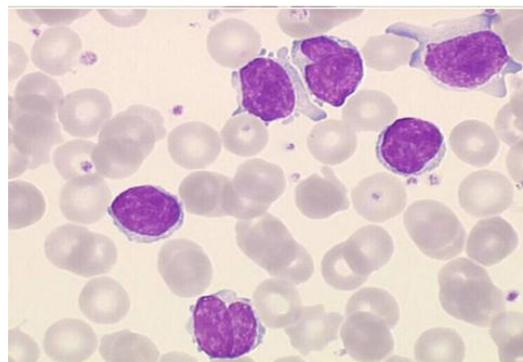
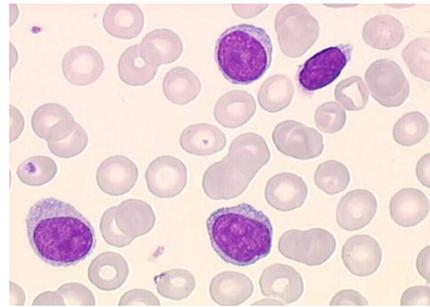


Figure 8 : CLL prolifératoire avec un taux de prolifération inférieur à 55 %



Dans ces situations morphologiques difficiles l'appel à l'immunophénotypage lymphocytaire par l'intermédiaire de la CMF est indispensable, il permet de confirmer le diagnostic. La CMF joue un rôle central dans le diagnostic de la CLL notamment en raison de l'absence d'anomalie moléculaire pathognomonique.

Néanmoins, les études de cytogénétique et de biologie moléculaire sont importantes. Elles jouent notamment un rôle prépondérant dans le pronostic de la pathologie (16).

Les anomalies génomiques sont fréquentes dans la CLL. Plus de 80% des patients possèdent des anomalies récurrentes acquises de plus ou moins bon pronostic. Le groupe francophone de cytogénétique en hématologie rend obligatoire la recherche de la délétion 17p (gène TP53) avant la mise en place d'un traitement (17). En effet, des aberrations sur les gènes TP53 peuvent aboutir à une perte de fonction de la protéine et de son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. L'impact sur le choix thérapeutique est important car ces aberrations entraînent une résistance aux analogues des purines. Ces anomalies sur le gène TP53 peuvent se manifester par la délétion 17p13 entraînant une perte mono-allélique du locus TP53 mais aussi par des mutations de type faux sens, des insertions ou des délétions. Ainsi, nous obtenons différents profils ayant pour conséquence une perte de fonction de la protéine P53. Le profil le plus fréquent étant l'association d'une délétion 17p associée à une mutation TP53 sur l'autre gène (figure 9) (18).

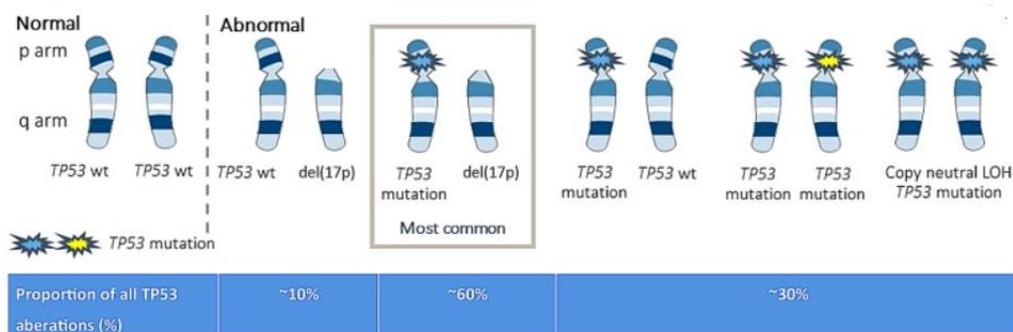


Figure 9 : Représentation des différents profils d'aberrations entraînant la perte de la fonction de la protéine TP53

La délétion 11q22-23 est retrouvée chez 6 à 20% des patients selon les études. Elle est associée à une lymphadénopathie plus importante et des facteurs de mauvais pronostic. De nombreuses autres anomalies cytogénétiques sont observées telles que la trisomie 12 et la délétion 13q14. Un caryotype complexe correspond à la présence d'au moins 3 anomalies chromosomiques. Il est observé chez près de 16% des patients (17).

Le statut mutationnel des IGHV a également un rôle pronostic. Les M-CLL sont généralement de bon pronostic à l'inverse des U-CLL (19).

### I. C. 1. 2. La leucémie à tricholeucocytes (HCL)

La HCL est qualifiée en anglais de « Hairy Cell Leukemia ». Cette appellation est liée à la présence de cellules chevelues sur le frottis sanguin (tricho = cheveu en grec). C'est une entité distincte depuis la classification de 2008.

Il s'agit de l'une des hémopathies lymphoïdes B matures les plus rares en France. On observe 304 nouveaux cas en 2018. Le TSM est de 0,5 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 0,1 pour la femme. On observe une prédominance masculine importante (rapport TSM hommes/femmes égal à 5) (11).

L'événement génétique responsable de la HCL est la survenue d'une mutation ponctuelle du gène BRAF V600E. Elle a été mise en évidence en 2011, par l'équipe du Pr. Tiacci. Il s'agit d'un événement clé dans la pathogénèse de la HCL car elle est retrouvée chez la majorité des patients au diagnostic, dans tous les clones tumoraux et en cas de rechute. Elle peut être retrouvée dans certaines tumeurs solides comme le mélanome mais elle est très spécifique des SLPC-B (20) (21).

Cette mutation ponctuelle, substitution d'une thymine avec une adénine dans l'exon 15, entraîne un changement d'acide aminé d'une valine en glutamate. Cet événement aboutit à une activation constitutive de la voie de signalisation MAP-kinase (RAS-RAF-MEK-ERK). La protéine BRAF mutée phosphoryle, grâce à son rôle de kinase, les protéines MEK1 et MEK2 (pMEK) qui à leurs tours phosphorylent les protéines ERK1 et ERK2 (pERK). Ces dernières, une fois fonctionnelles, migrent dans le noyau de la cellule afin d'agir sur ses substrats nucléaires et de déclencher une réponse transcriptionnelle qui comprend notamment la régulation positive de la cycline D1. Cette voie de signalisation favorise la prolifération et la survie cellulaire (figure 10) (21).

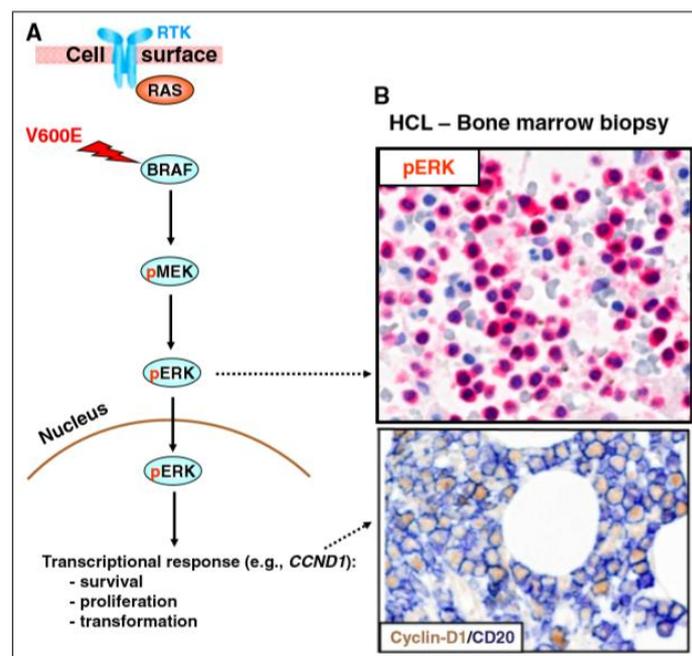


Figure 10 : A. Voie de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK dans le HCL. B. Mise en évidence de l'activation in vivo de la voie RAF-MEK-ERK chez les patients HCL illustrée par l'expression de pERK (rouge) et de la cycline-D1 (marron) dans une biopsie de moelle osseuse

La présentation clinique est indolente et l'évolution de la maladie est lente. Les patients peuvent être asymptomatiques ou présenter de légers symptômes non spécifiques. Nous observons une splénomégalie dans plus de 80% des cas, une hépatomégalie dans 10 à 20 % des cas et dans de très rares situations des adénopathies. Dans 90% des cas, on observe une mono, bi ou pancytopénie. La monocytopénie (quasi-absence de monocytes) est caractéristique. Ces perturbations sur l'hémogramme sont liées à l'envahissement de la moelle osseuse par les cellules clonales.

Le diagnostic peut être posé suite à une analyse du frottis sanguin associée à une étude par cytométrie en flux des lymphocytes circulants.

La population cellulaire est souvent monomorphe. Les lymphocytes sont de taille plus grande qu'un lymphocyte normal. Le rapport nucléo-cytoplasmique est intermédiaire. Le noyau est arrondi ou ovalaire, parfois encoché ou réniforme. La chromatine est plutôt fine par rapport à un lymphocyte mature, sans nucléole. Le cytoplasme est plutôt prépondérant, non basophile, sans grain, avec présence de fins prolongement donnant un aspect chevelu (figures 11-12) (15).

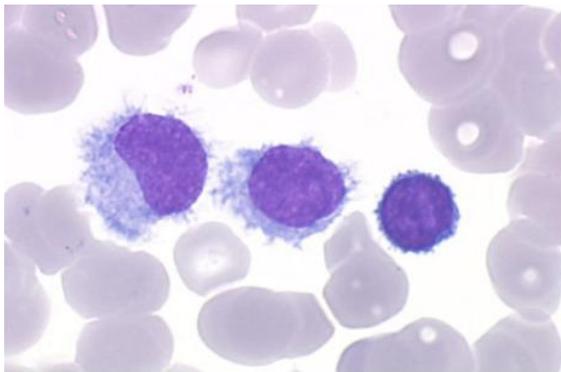


Figure 11 : Tricholeucocytes sur un prélèvement médullaire après colorations au MGG

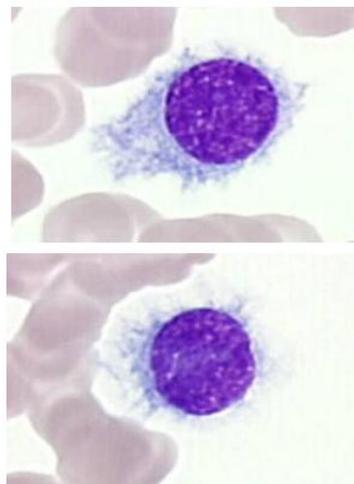


Figure 12 Tricholeucocytes sur un frottis sanguin après colorations au MGG

L'analyse cytogénétique n'est pas pertinente car on ne retrouve pas d'anomalie récurrente.

La découverte de la mutation *BRAF V600E* dans l'exon 15 est un atout supplémentaire pour le diagnostic. Elle est présente dans 80 à 90% des cas. Chez les 10 à 20 % restant, il faut exclure d'éventuelles mutations rares du gène *BRAF* dans l'exon 11. Les données génomiques ont permis de mettre en évidence d'autres mutations à la rechute (annexe 2) (22).

La HCL doit être différenciée de la leucémie à tricholeucocytes variant (v-HCL), du lymphome splénique de la zone marginale (SMZL), et du lymphome à pulpe rouge diffuse splénique (SDRPL). Le diagnostic précis peut être délicat car les symptômes et les caractéristiques morphologiques des cellules sont proches. Effectivement, on observe sur ces différentes entités des lymphocytes avec un aspect villeux. Il est important de les distinguer car elles ont une prise en charge thérapeutique différente.

Sur le frottis sanguin, le v-HCL correspond morphologiquement à une fusion d'un prolymphocyte (avec un nucléole net) et d'un tricholeucocyte (figure 13) (23).

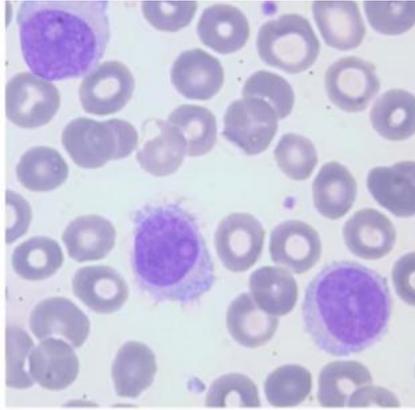


Figure 13 : Tricholeucocytes variants sur un frottis sanguin coloré au MGG

La cytométrie en flux et le profil mutationnel permettent de les distinguer de la HCL. En effet, la v-HCL, le SMZL, et le SDRPL n'ont pas de mutation sur le gène BRAF. Ils ont d'autres mutations distinctes ce qui suggère qu'il pourrait bien s'agir d'entités différentes (annexe 2) (22).

#### I. C. 1. 3. La leucémie prolymphocytaire B (B-PLL)

La première description de la B-PLL a été réalisée en 1974 par le Dr. Galton et al. Ils ont présenté une variante rare de la CLL ayant des caractéristiques cliniques et hématologiques plus agressives (24). Depuis, elle est catégorisée dans un groupe individuel dans les classifications de 2008 et 2016 (1) (9).

Depuis cette découverte en 1974, les événements oncogénétiques et la cellule d'origine sont toujours mal connus.

La B-PLL est une hémopathie lymphoïde maligne B mature rare, estimée à moins de 1% des hémopathies lymphoïdes.

Les observations cliniques, sur les 15 patients faites par l'équipe du Dr. Galton, ont montré une pathologie agressive. Les deux tiers des patients manifestent une symptomatologie B. L'infiltration médullaire et splénique est constante mais d'intensité variable, les adénopathies sont plus rares voire absentes. Une anémie et une thrombopénie sont fréquentes. Elles sont surtout accompagnées d'une hyperlymphocytose importante souvent supérieur à 100 G/L (25) (26).

Selon le groupe franco-américain-britannique (FAB), la B-PLL est définie par la présence d'au moins 55% de prolymphocytes dans le sang. Ces derniers sont des cellules de taille moyenne à grande, au noyau rond, à la chromatine légèrement décondensée et caractérisée par son nucléole proéminent. Les prolymphocytes peuvent être confondus avec d'autres SLPC-B tels que la v-HCL, le MCL sous sa forme pléiomorphe, le SMZL et la T-PLL (figure 14) (26). De plus la quantification des prolymphocytes dans le sang est variable d'un opérateur à un autre. Il est donc difficile de rendre un diagnostic en se basant uniquement sur des critères morphologiques (26).

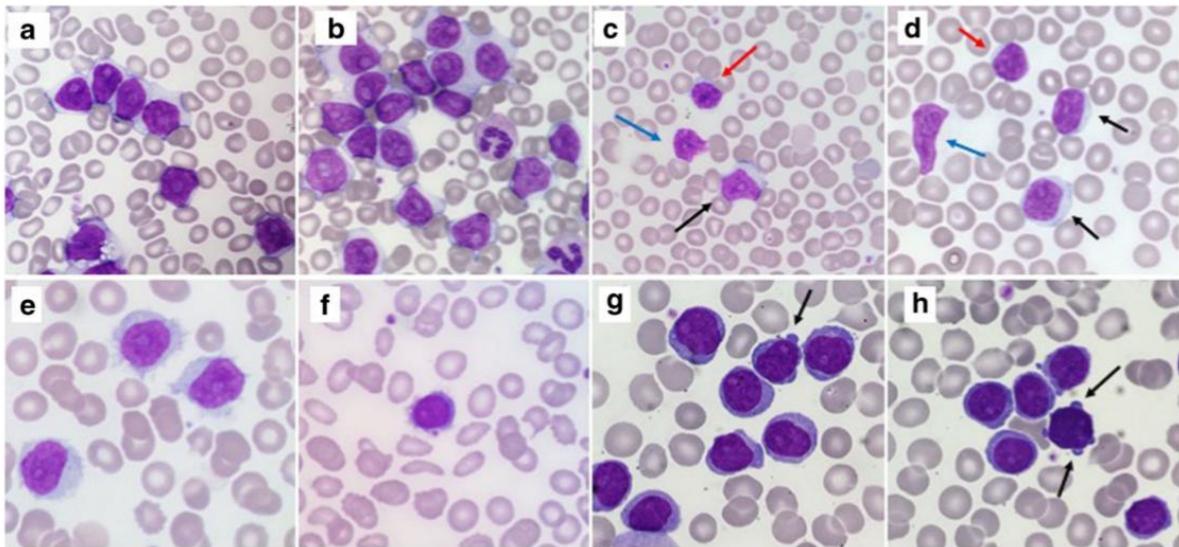


Figure 14 : B-PLL sur un frottis sanguin coloré au MGG a,b Cellules B-PLL avec son nucléole proéminent. c,d Frottis sanguin de CLL avec présence de cellules prolymphocytaires B (flèches noir), de lymphocytes de la CLL (flèches rouge), et des ombres de Gumprecht (flèches bleu). e Cellules de v-HCL avec présence de villosités et d'un nucléole. f Cellule d'un SMZL. g,h Cellules prolymphocytaires T

Cette difficulté pour catégoriser et pour quantifier les B-PLL, nous oblige à y associer des techniques telles que la CMF, la cytogénétique et la biologie moléculaire afin de confirmer le diagnostic.

En ce qui concerne les anomalies chromosomiques, aucun profil clair n'a été trouvé. Ceci s'explique par la rareté de la pathologie et le peu d'études comprenant de grandes séries de patients. Néanmoins quelques aberrations plus ou moins récurrentes sont retrouvées. La délétion du gène codant pour la protéine TP53 est retrouvée dans plus de 50% des cas. Cette dernière peut être associée à une mutation TP53 sur l'autre gène. On observe également des anomalies récurrentes conduisant à une dérégulation de l'oncogène *MYC*. D'autres anomalies sont fréquentes et le caryotype est souvent complexe.

Il est mentionné, depuis la classification de 2008, que les B-PLL avec une translocation t (11;14) (q13;q32) et une hyperexpression de la cycline D1 font parties des variants leucémiques du MCL (26) (27) (28).

### I. C. 2. Les formes lymphomateuses secondairement leucémiques

#### I. C. 2. 1. Les lymphomes de la zone marginale (MZL)

Nous ne parlons pas d'un lymphome de la zone marginale mais des lymphomes de la zone marginale. Effectivement, la classification a bien défini depuis 2008, trois sous-entités histologiques se différenciant par le site d'invasion :

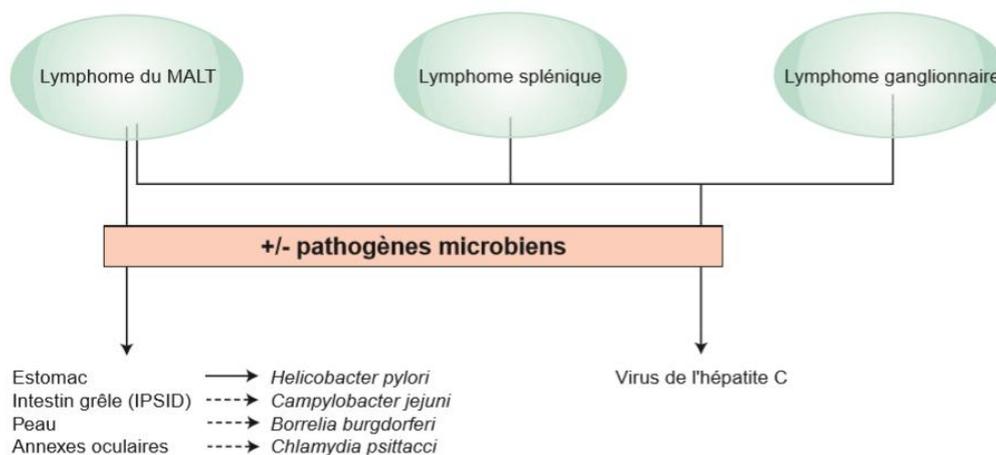
- Le MZL se développant au niveau des tissus lymphoïdes extra-ganglionnaires associés aux muqueuses (MALT)
- le MZL splénique évoluant principalement au niveau de la rate (SMZL)
- le MZL ganglionnaire (NMZL)

Ces 3 sous types sont classés en MZL car on considère qu'ils ont comme origine commune le compartiment marginal des ganglions lymphatiques et de la rate (29). Cependant, il est important de

les différencier à l'aide de la clinique et de la biologie car la prise en charge thérapeutique n'est pas la même.

Ils représentent environ 5 à 15 % des LNH. On estime à 2790 le nombre de nouveaux cas de MZL en France métropolitaine en 2018. L'âge médian au diagnostic est de 69 ans chez l'homme et 72 ans chez la femme (11).

De nombreux arguments sont en faveur d'une association entre les MZL et des stimulations antigéniques chroniques. Ces stimulations peuvent être de deux natures : du « soi » ou du « non soi ». Lorsqu'elles sont d'origines du « non soi », on les appelle des xénoantigènes (*Xenos du grec « étranger »*). Ces xénoantigènes peuvent être des pathogènes microbiens comme avec la bactérie *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) responsable du MALT gastrique (figure 15) (30). Lorsqu'elles sont d'origines du « soi », on les appelle des autoantigènes. Ces autoantigènes sont retrouvés dans des maladies auto-immunes telles que la thyroïdite d'Hashimoto, le syndrome de Gougerot-Sjögren (30).



**Figure 15 : Les principaux pathogènes pouvant être associés aux MZL.**  
IPSID: immunoproliferative small intestinal disease

La première preuve du lien entre MALT gastrique et une infection par la bactérie *H.pylori* a été avancée en 1991. Il a été montré que près de 90% des patients atteints par un MALT gastrique étaient également infectés par *H.pylori* (31). Par la suite, de nombreuses études ont avancé que l'éradication de la bactérie par la prise d'antibiotiques permettait d'induire une rémission histologique complète dans 70% à 80% des cas (32). Cette approche thérapeutique est aujourd'hui en 1<sup>er</sup> ligne pour éradiquer un MALT gastrique. Le virus de l'hépatite C (VHC) est lui associé à des lymphomes du MALT non gastrique. Cette observation a été faite en 1996. Cette relation est confirmée car une mise en place d'un traitement anti-VHC permet une régression du lymphome (33). Il existe d'autres localisations avec des pathogènes impliqués dont le mécanisme reste à être maîtrisé pour permettre une amélioration du diagnostic, du traitement et de la prévention de ces maladies.

### I. C. 2. 1. 1. Les lymphomes du MALT

Ils représentent près de deux tiers des MZL. Leur présentation est hétérogène en fonction du site d'envahissement. En effet, ils peuvent se développer dans tous les organes contenant du tissu lymphoïde. L'estomac en est la localisation préférentielle (autour de 80 %) avec comme agent pathogène la bactérie *H.pylori*. D'autres tissus peuvent être touchés comme le poumon et les glandes salivaires.

Généralement, les lymphomes du MALT se manifestent de manière indolente avec un bon état général et l'absence de symptôme B. La présentation clinique est hétérogène et dépendante de l'organe envahi. Les patients ayant un lymphome gastrique vont ressentir des symptômes tels qu'une dyspepsie et des douleurs abdominales. Ceux avec une localisation intestinale auront des manifestations cliniques à type de diarrhées, amaigrissement. On se rend bien compte qu'aucun de ces signes n'est spécifique. Une dissémination de la maladie est possible après une période prolongée où le lymphome est localisé. Cette dissémination peut se faire dans les organes muqueux ou non muqueux comme la rate, le foie ou la moelle osseuse.

D'un point de vue cytogénétique, on observe 4 translocations distinctes selon le site d'envahissement :

- t (11; 18) (q22; 21) *BIRC3/MALT1* décrite dans les années 1990. Elle est présente dans les formes pulmonaires (30 - 50%), l'intestin (10 - 60%), l'estomac (5 - 25%). Sa recherche par le caryotype ou par la méthode d'hybridation de fluorescence in situ (FISH) est indispensable dans les formes à localisation gastriques. Elle conditionnerait l'efficacité de l'antibiothérapie car elle serait corrélée à une variante indépendante de *H.pylori*. Cette anomalie est spécifique du lymphome du MALT et n'a pas été détectée dans le SMZL et le NMZL (34).

- t (14; 18) (q32; q21) *IGH/MALT1*. Cette CT est retrouvée dans 25% des MALT oculaires et 16% des MALT des glandes salivaires. Elle est différente de celle retrouvée dans le lymphome folliculaire car n'impliquant pas le gène *BCL2*.

- Plus rarement, la t (1; 14) (p22; q32) *BCL10/IGH* et la t (3; 14) (p14; q32) *FOXP1/IGH*.

### I. C. 2. 1. 2. MZL splénique

Le SMZL représente environs 2% des LNH et 20% des MZL. Il est considéré comme une entité pathologique distincte depuis 1991.

Des études récentes ont mis en évidence une entité pouvant être un précurseur du SMZL, de type MBL (MBL - MZ). Ce terme de MBL - MZ a été reconnu dans la dernière mise à jour de la classification de 2016. Il est utilisé lorsque l'on observe une lymphocytose monoclonale B chronique ayant pour origine la zone marginale et l'absence de signes pouvant faire évoquer un lymphome (35).

Le SMZL correspond à une prolifération de petits lymphocytes B au niveau de la pulpe blanche de la rate. On observe une dissémination dans 90% des cas au niveau du sang et de la moelle.

Il s'agit également d'une entité plutôt indolente, mise en évidence de façon fortuite lors d'anomalies à l'hémogramme. Les signes cliniques, lorsqu'ils sont présents, se caractérisent par des douleurs abdominales, dyspepsie, asthénie.

Au niveau de l'examen clinique, on retrouve, comme signe constant, une splénomégalie. Les adénopathies périphériques sont rares. Leur présence doit faire évoquer une dissémination du lymphome.

L'analyse morphologique est possible lors de la phase leucémique. Cependant, aucun critère morphologique caractéristique ne permet d'affirmer le diagnostic. Les atypies sont variables et souvent discrètes. Dans tous les cas, l'aspect général monomorphe de la population lymphocytaire nous guidera vers un SLPC-B.

Le diagnostic de certitude est réalisé grâce à un examen histologique de la rate après splénectomie. Cependant, cette dernière pouvant entraîner des répercussions grave en per et post-opératoire, n'est plus réalisée en 1<sup>er</sup> intention. Il est cependant possible de réaliser un diagnostic de manière fiable avec la combinaison de plusieurs techniques telles qu'un immunophénotypage lymphocytaire et/ou l'étude histologique d'une biopsie ostéomédullaire en cas d'infiltration dans la moelle. A noter, la présence d'une composante monoclonale souvent de type IgM dans 10 à 40 % des cas.

L'étude des anomalies génomiques peuvent également apporter des arguments supplémentaires. L'anomalie cytogénétique la plus spécifique retrouvée dans 25 à 45% des cas est la délétion 7q. D'autres aberrations sont retrouvées mais aucune n'est spécifique. Des études récentes ont montré que le gène NOTCH2 était muté dans près de la moitié des SLZM. L'ensemble de ces altérations géniques peut servir de marqueur moléculaire diagnostique. Dans une minorité de cas, le diagnostic final reste incertain et celui-ci ne pourrait être posé que par une étude histologique de la rate (27)(36).

#### **I. C. 2. 1. 3. Le NMZL**

Ces lymphomes ont été décrits pour la première fois dans les années 1990. Ils concernent moins de 10% des patients atteints de MZL.

Il s'agit d'une atteinte ganglionnaire primitive. Les patients manifestent généralement des atteintes ganglionnaires et/ou viscérales au moment de l'annonce diagnostic.

La réalisation du diagnostic est anatomopathologique.

#### **I. C. 2. 2. Le lymphome du manteau (MCL)**

En 1982 l'équipe du Dr. Weisenburger a montré, sur 12 patients, la présence d'une infiltration lymphoïde formant un manteau autour d'un CG non infiltré (37). C'est à partir de 1994 et la classification de REAL que l'entité « lymphome du manteau » est apparue.

En France, le TSM est de 1,0 pour 100 000 personnes - années chez l'homme et de 0,2 chez la femme. On obtient un rapport de 5 entre les deux sexes, ce qui en fait l'écart le plus élevé des LNH. Maladie du sujet âgé, l'âge médian au diagnostic se situe autour de 70 ans (11).

Les événements conduisant à un MCL sont variés comme dans tous les LNH. Ces anomalies sont de mieux en mieux comprises et ont abouti en 2016 à la séparation en 2 sous types distincts de la maladie : le MCL classique - nodale et le MCL leucémique non nodale.

Dans ces 2 sous-types de la maladie, la première anomalie moléculaire à apparaître est la CT t (11; 14) (q13; q32). Cette translocation va être responsable d'une juxtaposition du gène *CCND1* codant

pour la cycline D1 situé en 11q13 avec le gène des *IGH* situé en 14q32. Cette aberration conduit successivement à la surexpression de la cycline D1 et à la dérégulation du cycle cellulaire entraînant la prolifération accrue des lymphocytes tumoraux. Elle a lieu à un stade précoce de la différenciation lymphocytaire (stade pré-B) au niveau de la moelle osseuse.

Dans le cas du MCL classique - nodale, on observe une surexpression du facteur de transcription SOX11. Cette surexpression est liée probablement à une méthylation au niveau du promoteur du gène. Elle empêche les cellules du MCL de rentrer dans les étapes se situant au niveau du CG. Ainsi, dans cette forme, les cellules vont contourner le CG et posséder des *IGH* non mutées. Dans ce sous type, le nombre d'aberrations géniques est important et la présentation clinique est plus agressive.

Le MCL leucémique non nodale n'a pas de surexpression du facteur de transcription SOX11. Il s'en suit une différenciation au niveau du centre germinatif comme en témoigne les nombreuses mutations aux niveaux des *IGH* (figure 16) (38) (39).

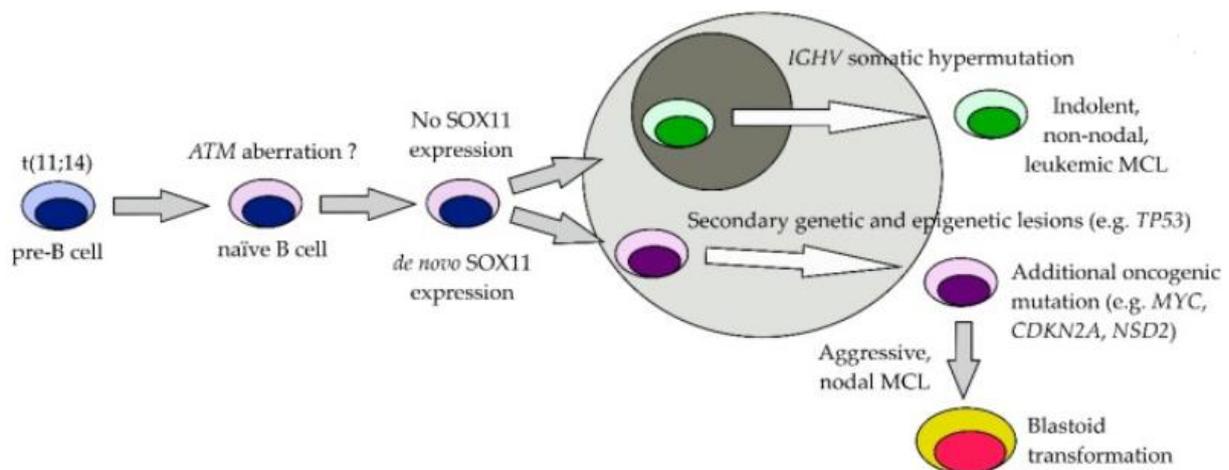


Figure 16 : Pathogénèse du MCL

Ces avancées expliquent les deux types de présentations cliniques.

La plus fréquente est celle du MCL classique entre 80 à 90 % des cas. On observe une atteinte de plusieurs ganglions d'emblée. Une dissémination au niveau extra-ganglionnaire est fréquente (70 % des cas). Elle concerne en majorité la moelle osseuse, la rate et le foie. Une circulation sanguine des lymphocytes clonaux est également fréquente mais pas systématique. Cette forme est agressive et de mauvais pronostic.

La deuxième forme, moins fréquente, est le MCL indolent. Ces patients présentent une dissémination sanguine, parfois une splénomégalie mais pas d'atteinte ganglionnaire (40).

Le diagnostic du MCL repose sur la biopsie ganglionnaire lorsque le ganglion est superficiel. Quand ces derniers ne sont pas faciles d'accès, la dissémination sanguine et/ou médullaire des lymphocytes clonaux permettent une étude cytologique et phénotypique des lymphocytes circulants (41).

Au niveau cytologique, on peut observer plusieurs variants ne facilitant pas le diagnostic :

- La forme classique (42)

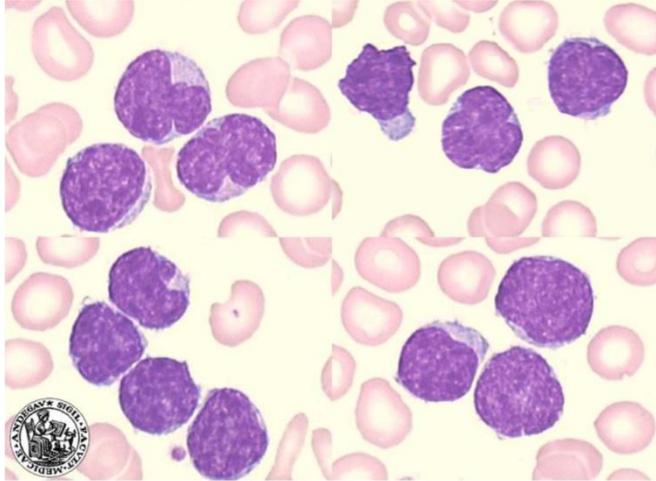


Figure 17 : Dissémination sanguine d'un MCL sous sa forme classique

Dans cette forme classique dite « pléiomorphe », nous pouvons décrire des lymphocytes de taille hétérogène avec un rapport nucléocytoplasmique élevé à très élevé. Le contour nucléaire est irrégulier, cabossé avec parfois de profondes encoches. La chromatine est légèrement décondensée d'aspect motté ou moucheté.

- La forme blastoïde (42)

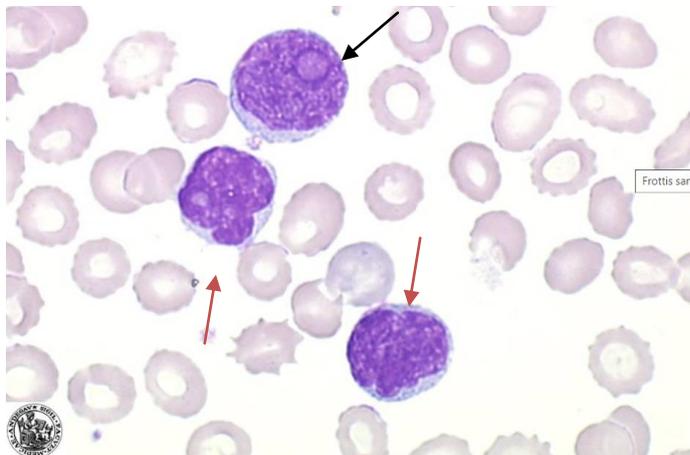


Figure 18 : Dissémination sanguine d'un MCL sous sa forme blastoïde (flèche noir) et forme classique (flèche rouge)

Sous la forme « blastoïde », les lymphocytes sont de plus grandes tailles avec une chromatine plus immature et parfois nucléolée.

Il existe un 3<sup>ème</sup> variant à petites cellules matures. L'aspect évoque celui des lymphocytes matures. L'étude phénotypique permet d'orienter le diagnostic.

Les études morphologiques et phénotypiques doivent être complétées par un caryotype et/ou une FISH. Elles permettront la recherche de la CT t (11; 14) (q13; q32) qui est positive dans 90 % des cas.

Le faible pourcentage restant correspond au sous groupe *CCND1*-négatif avec des réarrangements de la cycline D2 et D3 le plus souvent (27).

Le diagnostic est posé grâce à l'étude de l'ensemble des critères cliniques et biologiques. Dans des situations délicates, celui-ci ne pourra être affirmé que par la réalisation d'une biopsie.

### I. C. 2. 3. Le lymphome folliculaire (FL)

Le FL est le 2<sup>ème</sup> plus répandu des lymphomes dans le monde occidental. A peu près 20 % à 30 % des LNH sont des FL.

En France, on estime à 3066 le nombre de nouveaux cas de FL. Le TSM est de 2,9 pour 100 000 personnes - années chez les hommes et de 2,0 pour 100 000 personnes-années chez les femmes. Maladie du sujet âgé, l'âge médian au diagnostic est autour de 68 ans (11).

La cellule tumorale du FL est localisée au niveau du CG des tissus lymphoïdes où à lieu de nombreux réarrangements géniques tels que les phénomènes HMS et de commutations de classes. L'anomalie génétique primaire a lieu très tôt au niveau de la moelle osseuse dans les cellules B immatures. Il s'agit de la translocation  $t(14; 18)(q32; q21)$ . Cette dernière juxtapose l'oncogène *BCL2* situé sur le chromosome 18q21 et la région codant pour les *IGH* en 14q32. Ce phénomène aboutit à un réarrangement *IGH/BCL2*. L'oncogène est sous le contrôle du promoteur des *IGH*, cela entraîne une surexpression de *BCL2*, protéine anti-apoptotique. Il en résulte une survie cellulaire. Cette résistance à la mort cellulaire permet aux cellules tumorales de rester en vie au niveau du centre germinal où elles vont accumuler différentes anomalies additionnelles au cours des nombreux réarrangements (figure 19) (43).

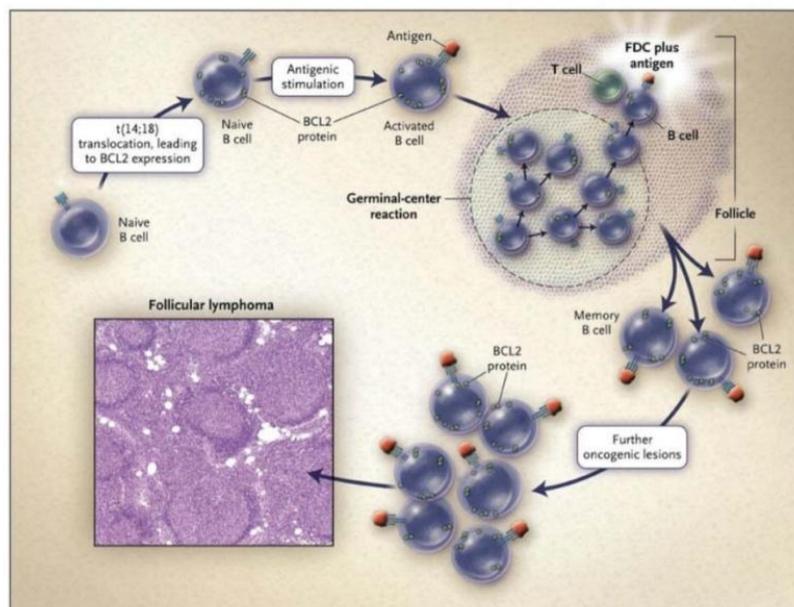


Figure 19 : Développement d'un LF : un processus multi-étape

Ces événements additionnels sont indispensables pour aboutir à un FL. En effet, de nombreuses études ont montré la présence du réarrangement *IGH/BCL2* chez des personnes saines sans qu'elles ne développent pour autant un FL. Ces anomalies ont été mises en évidence grâce au développement du séquençage nouvelle génération (NGS). Il s'agit de mutations précoces de gènes régulateurs de l'épigénétique (*KMT2D*, *CREBBP*, *EZH2*, *MEFB*) (44).

Au niveau clinique, le FL est d'évolution lente avec de longue phase de stabilité. Le syndrome tumoral est généralement la première manifestation avec la présence d'une ou plusieurs adénopathies superficielles ou profondes. Des signes généraux associés sont également observés. Des disséminations aux niveaux médullaire et sanguin sont possibles.

Le diagnostic est réalisé à l'aide d'une biopsie ganglionnaire. Cependant, lorsque cette dernière est difficile d'accès et qu'elle est associée à une dissémination sanguine ou médullaire des cellules clonales, le clinicien peut être aiguillé par la cytologie, la cytométrie en flux, et l'étude génique (45).

Cytologiquement, les lymphocytes ont un aspect dit en « grain de café » avec une taille légèrement plus grande qu'un petit lymphocyte. Leur rapport nucléocytoplasmique est très élevé et le contour nucléaire possède un sillon assez caractéristique du FL lui donnant un aspect centrocytique. La chromatine est dense et non nucléolée. Le cytoplasme est quasi inexistant (figure20) (42).

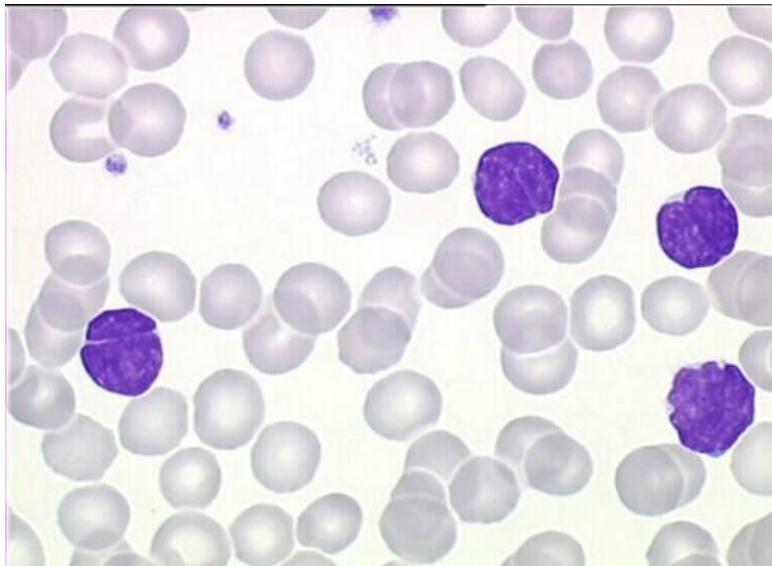


Figure 20 : Aspect au grossissement \*1000 dans le sang d'un FL

Exceptionnellement, les cellules peuvent prendre une morphologie centroblastique de grandes tailles avec un noyau irrégulier et une chromatine immature.

Concernant les profils cytogénétiques et moléculaires du FL, on détecte dans 80 à 90 % des cas la CT t (14; 18) (q32; q21) responsable du réarrangement *IGH/BCL2*. Les 10 à 20 % restant, non négligeables, correspondent soit à des translocations variantes qui aboutissent aux réarrangements *IGK/BCL2*, *IGL/BCL2*, soit à un réarrangement de *BCL6*. Enfin, les approches moléculaires mettent en évidence des mutations de gènes précoces additionnelles comme *KMT2D* muté dans 80 à 90 % des cas, *CREBBP* muté dans 60 % des cas, *EZH2* et *MEF2B* mutés dans 15 à 20 % des cas (27).

#### I. C. 2. 4. La macroglobulinémie de Waldenström (WM)

La WM ou maladie de Waldenström fait partie du groupe des lymphomes lymphoplasmocytaires (LPL). Les LPL sont caractérisés par une infiltration médullaire d'un continuum de lymphocytes matures, lymphoplasmocytes et de plasmocytes monoclonaux. Lorsque cet infiltrat est associé à la présence d'une IgM monoclonale, sécrétée par le clone tumoral, on parle de WM.

La WM doit son nom au Pr. Jan Gösta Waldenström à l'origine de sa découverte dans les années 1944. Il a observé, chez deux patients, un tableau clinique proche composé principalement d'épistaxis, gingivorragies associées à des adénopathies et une hypergammaglobulinémie. De plus, il constate la présence d'une infiltration médullaire par des lymphocytes en « forme de fuseau ». A la différence du myélome multiple, il n'observe pas d'infiltration médullaire plasmocytaire, ni de signes radiologiques, ni de douleurs osseuses. L'une des propriétés les plus notables sur leur sérum est leur viscosité importante. Cette dernière est liée à la présence d'une globuline de haut poids moléculaire appelée « macroglobuline ». Cette protéine est une immunoglobuline d'isotype M (IgM). C'est la seule ayant la capacité de s'assembler et de former un pentamère de haut poids moléculaire de 900 KDa (figure 21) (46) (47).

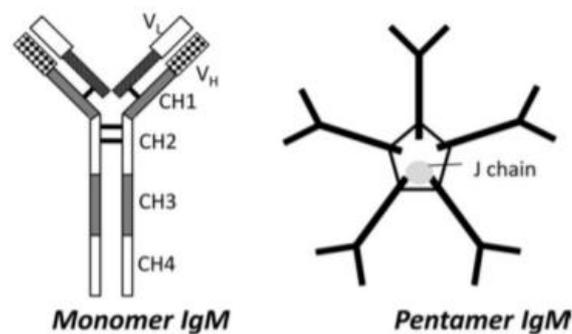


Figure 21 : Schéma d'une IgM monomère et d'un modèle pentamérisé formant une macroglobuline

Il s'agit d'une pathologie rare. Ce syndrome est responsable de 1 à 2 % des LNH. On estime à 1317 le nombre de nouveaux cas incidents en 2018 en France avec une prédominance masculine importante.

De nombreuses avancées ont permis de comprendre un peu mieux l'origine cellulaire du clone. Il s'agirait d'une cellule B post-germinale centrale ayant les caractéristiques des cellules B « mémoire ». L'étude du statut mutationnel des chaînes d'immunoglobulines du clone par l'équipe de Sahota et al a montré que le phénomène HMS avait eu lieu mais pas celui de commutation isotypique de classe (48). Ces deux éléments nous laissent penser que la cellule B est bloquée dans son processus de maturation après son passage dans le CG et avant le stade de plasmocyte (figure 22) (49). On observe également l'absence de marqueurs phénotypiques des cellules du CG (50).

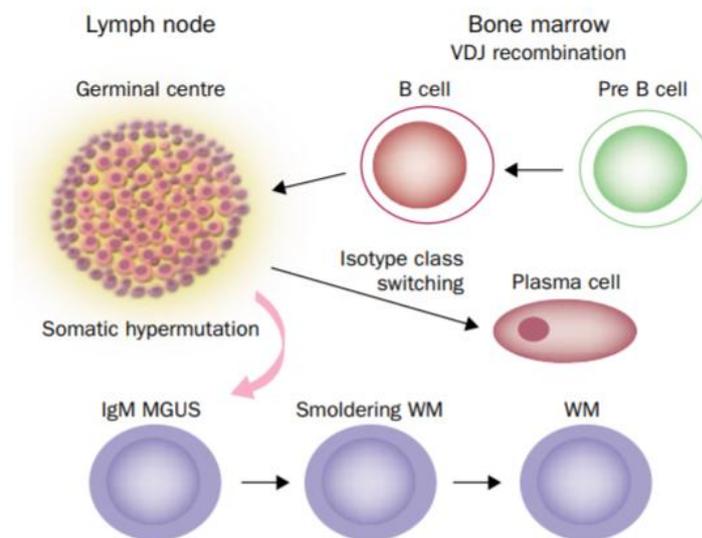


Figure 22 : Blocage de maturation de la cellule B dans la WM

La présentation clinique des patients atteints de la WM est hétérogène. Certains symptômes peuvent être attribués à l'infiltration tumorale, d'autres peuvent être la conséquence des propriétés physico-chimiques et immunologiques de l'IgM.

Tout d'abord, l'infiltration tumorale a lieu dans la moelle osseuse entraînant un dysfonctionnement de celle-ci. On observera un défaut de production des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs, plaquettes). Ce déficit de production peut être responsable de l'apparition d'une pâleur cutanée, d'un essoufflement au moindre effort et d'une fatigue, conséquence de l'anémie mais également des épistaxis, des gingivorragies et d'une susceptibilité plus importante aux agents microbiens résultat de la thrombopénie et de la leuco-neutropénie. L'infiltration dans les organes peut entraîner une hépato-splénomégalie et/ou des adénopathies. L'atteinte des tissus extra-nodaux est rare.

L'anémie souvent présente, retrouvée chez les deux patients du Pr. Jan Gösta Waldenström, peut également être consécutive à la sécrétion d'hepcidine par le clone tumoral. Il s'agit d'une hormone peptidique régulant le métabolisme ferrique (51).

L'immunoglobuline monoclonale de type IgM peut être responsable par ses propriétés physico-chimiques de plusieurs manifestations cliniques:

- Un syndrome d'hyperviscosité se manifestant par des troubles visuels, des troubles neurologiques, des saignements muqueux ou des manifestations cardiaques ;
- Un syndrome hémorragique via son interaction avec des protéines de la coagulation ou avec le facteur de Willebrand ;
- Une cryoglobulinémie de type 1 ;

- Une amylose AL qui correspond à des dépôts de la paraprotéine aux niveaux des organes. Les tissus principalement touchés sont le cœur, le rein, le foie et les nerfs périphériques.

De plus, par ses propriétés antigéniques, l'IgM peut reconnaître des antigènes des nerfs périphériques et engendrer une neuropathie périphérique. Elle peut également cibler un antigène de surface érythrocytaire et aboutir à une anémie hémolytique à agglutinine froide. Lorsque l'IgM possède une activité de type facteur rhumatoïde, elle peut être responsable de la formation d'un cryoprécipité au niveau de petits vaisseaux. On parle alors de cryoglobulinémie de type II.

Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une Immunoglobuline de type IgM associée à une infiltration lymphocytaire médullaire.

La découverte d'un pic monoclonal à IgM est démontrée par l'électrophorèse des protéines sanguines. Elle doit être suivie par une immunofixation sérique afin de confirmer et caractériser la protéine monoclonale.

La biopsie ostéo-médullaire est indispensable pour apprécier de manière fiable l'infiltration lymphocytaire. Cependant cette dernière est invasive et n'est pas forcément conseillée chez les sujets âgés et chez les patients dont un traitement n'est pas envisagé. Elle pourra être remplacée par une simple aspiration de moelle osseuse associée à un immunophénotypage des lymphocytes (52).

L'infiltration médullaire est caractérisée par un continuum polymorphe composé de lymphocytes matures, de lympho-plasmocytes et d'un petit nombre de plasmocytes. On observe également la présence de mastocytes sans atypie (figure 23) (42).

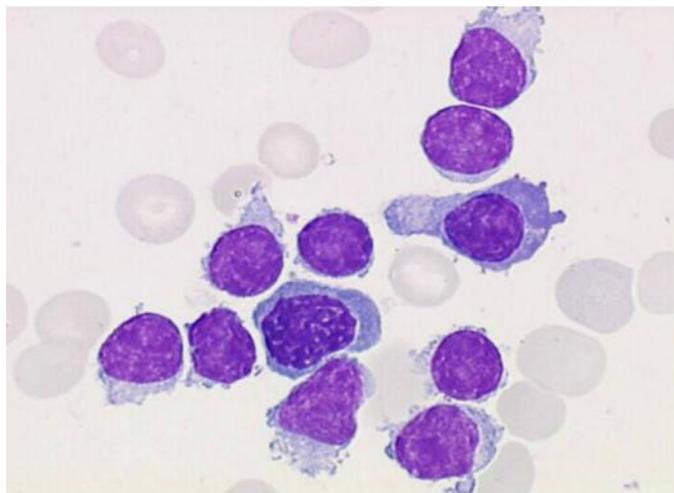


Figure 23 : Infiltrat polymorphe médullaire chez un patient atteint de WM suite à une aspiration de moelle osseuse

L'aspect cytologique est parfois compliqué à décrire. De plus, la présence de l'IgM est non spécifique de la WM. Nous sommes alors obligés d'étudier les critères phénotypiques des lymphocytes par CMF ainsi que les critères moléculaires.

La CMF joue un rôle primordial dans le diagnostic afin d'affirmer le caractère monoclonal et de mettre en évidence les marqueurs antigéniques de la WM.

Au niveau de la biologie moléculaire, les travaux du Dr. Treon et al en 2012 ont mis en évidence grâce au séquençage entier du génome, la présence d'une mutation récurrente *MYD88* L265P chez la majorité des patients de son étude (53). Elle est retrouvée dans 80 à 90 % des situations en fonction des études. Sa recherche est conseillée par la nouvelle classification de 2016. Cependant, à elle seule, elle ne permet pas de poser le diagnostic. En effet, on la retrouve dans les gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) à IgM et dans certains SLPC-B tels que la LLC ou le MZL. De plus dans 5 à 10 % des cas de WM, la mutation est absente (54).

Les anomalies chromosomiques récurrentes sont peu décrites dans la littérature car il est difficile d'obtenir des cellules en métaphases. Certaines d'entre-elles sont retrouvées dans d'autres SLPC-B comme les del13q, del11q, del17p, tri12. Cependant il est tout de même possible de définir un profil cytogénétique assez spécifique de la WM avec la présence d'une tri4 et/ou del6q (27).

### I. C. 2. 5. Le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL)

Le DLBCL est le plus fréquent des LNH dans le monde. Il constitue autour de 30 % des LNH. En France, le TSM est de 4,7 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 3,2 pour 100 000 personnes-années chez la femme (11).

Le DLBCL est caractérisé par une prolifération diffuse de grandes cellules au niveau ganglionnaire effaçant ainsi la structure de ce dernier.

Le Dr. Alizadeh s'est intéressé dans les années 2000 à l'étude de l'expression des gènes afin d'améliorer la compréhension des différentes lymphopathies B dont le DLBCL. Son travail a abouti à la mise en évidence de trois sous types de DLBCL qui se différencient par une surexpression ou non de certains gènes. La comparaison de leur profil d'expression avec les lymphocytes B normaux a permis de classer ces différents sous types. Le premier est semblable aux cellules B du CG (DLBCL-GCB), le deuxième est proche des cellules B activées (DLBCL-ABC), enfin le troisième est hétérogène et mal défini. De plus il a montré que les patients atteints d'un DLBCL-GCB avaient un pronostic plus favorable par rapport aux autres (55) (56). Cependant la technique utilisée pour distinguer les différents sous-types n'est pas réalisée en routine car elle est trop coûteuse. Différents algorithmes ont alors été créés afin de les corrélés à cette classification moléculaire en utilisant la technique d'immunohistochimie (IHC). C'est l'algorithme de Hans qui est utilisé en pratique même si sa fiabilité a souvent été remise en question dans de nombreuses études. Il utilise les marqueurs CD10, BCL6 et MUM1 pour différencier les DLBCL-GCB et les DLBCL non-GCB (figure 24) (57).

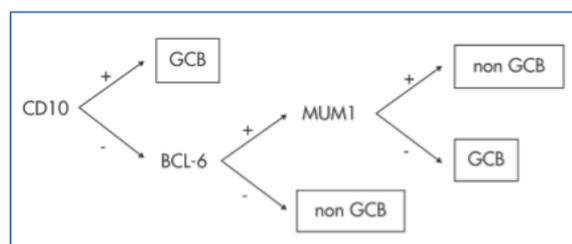


Figure 24 : Algorithme selon Hans

La mise en évidence de différents sous-types de DLBCL en fonction de la cellule d'origine explique l'hétérogénéité clinique, biologique et pronostique.

Sur le plan clinique, la plupart des patients se présentent avec des adénopathies localisées qui progressent rapidement. Elles peuvent également envahir la moelle osseuse, le cerveau, les reins et d'autres organes. Des masses ganglionnaires plus profondes (médiastinales ou abdominales) peuvent également être envahies. La présence de symptômes B est très fréquente (56).

Le diagnostic repose sur l'étude d'une biopsie où seront réalisées des analyses histologiques, phénotypiques et moléculaires.

Lorsque les cellules du DLBCL circulent dans le sang ou dans la moelle osseuse, le prélèvement est plus simple à réaliser. Le DLBCL devient alors accessible à l'étude microscopique du frottis sanguin et à l'étude phénotypique par CMF. Celles-ci ne sont pas faciles en raison de l'hétérogénéité des DLBCL. Les lymphocytes sont plutôt de grandes tailles parfois même immenses avec un rapport nucléocytoplasmique élevé à intermédiaire. Leur chromatine est immature voir blastique avec un ou plusieurs nucléoles et leur cytoplasme est hyperbasophile (figure 25) (15).

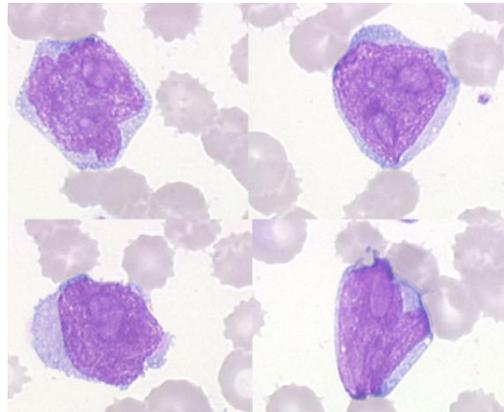


Figure 25 : Mise en évidence de cellules d'un DLBCL sur un frottis sanguin

Les anomalies cytogénétiques sont récurrentes et non spécifiques. Elles sont mises en évidence par l'intermédiaire du caryotype et/ou de la FISH. Dans la plupart des cas, on retrouve un caryotype complexe avec au moins 3 anomalies. L'anomalie de structure la plus fréquemment retrouvée est le réarrangement chromosomique. Parmi les différents types de réarrangements, la région 3q27 du gène *BCL6* est touchée dans 30 % des cas. Le gène *BCL2* est également réarrangé dans 15 % des cas. Quant au réarrangement codant le gène *MYC*, il est observé dans 10 % des cas. D'autres types d'anomalies peuvent survenir et être mises en évidence comme les gains et les pertes de chromosomes. La présence d'un double, d'un triple ou d'un quadruple réarrangements d'oncogènes est de très mauvais pronostic (27).

Nous allons à présent faire des rappels sur la CMF et de son importance dans la démarche diagnostique des différents SLPC-B.

## I. D. Le rôle de la cytométrie en flux dans le diagnostic des SLPC-B

La CMF est une technique qui permet de différencier les populations et les sous populations cellulaires. Elle les classe en fonction de différents paramètres tels que la taille des cellules, la granularité cellulaire et la présence de molécules à la surface ou dans le cytoplasme cellulaire appelées marqueurs phénotypiques. Ces derniers sont mis en évidence grâce à des anticorps marqués par un fluorochrome (figure 26) (58). Ils vont émettre une fluorescence lors de leur passage devant un rayon laser d'excitation. Cette fluorescence sera détectée par des capteurs spécifiques et elle sera proportionnelle à l'expression du marqueur.

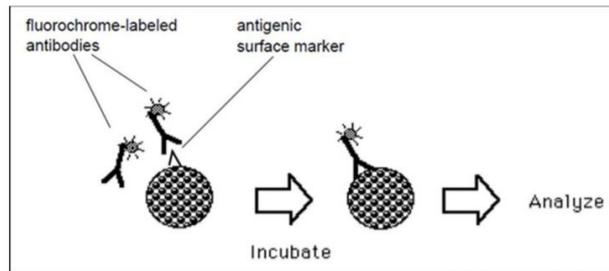


Figure 26 : Marquage des cellules par l'intermédiaire d'un anticorps couplé à un fluorochrome

Lors d'une suspicion d'un SLPC-B, nous réalisons un immunophénotypage lymphocytaire à la recherche d'un caractère clonal à cette prolifération. Cet immunophénotypage est réalisé par l'intermédiaire de la CMF à partir de suspensions cellulaires comme les prélèvements sanguins, médullaires ou les liquides de ponction.

### I. D. 1. L'intérêt de l'immunophénotypage dans les SLPC-B

La nature tumorale de la prolifération est mise en évidence par la monotypie kappa ou lambda. Elle est un critère essentiel pour affirmer la présence d'un SLPC-B. La taille, la structure et le profil phénotypique permettent, grâce à une démarche précise et séquentielle, de déterminer l'origine B de la lignée lymphoïde et donc d'aider à la classification du lymphome.

Parmi les différents SLPC-B, la CLL est celui dont les caractéristiques phénotypiques sont les mieux maîtrisées. On le doit aux travaux du Dr. Matutes et de son équipe en 1994 qui ont établi un score permettant de poser le diagnostic de la CLL (59). Ce score a été réévalué en 1997 par Moreau (60).

#### I. D. 1. 1. Les caractéristiques phénotypiques de la CLL

Comme indiqué précédemment, les tumeurs malignes B matures comprennent de nombreuses entités différentes. Il est important de diagnostiquer de manière précise le type de SLPC-B afin de proposer une prise en charge et un traitement adapté. C'est dans cet objectif que les travaux du Dr. Matutes et du Dr. Moreau ont permis d'établir un score pour différencier les CLL des non-CLL. Celui-ci est basé sur l'analyse d'un panel de 5 marqueurs (CD5, CD23, CD79b ratio, FMC7, Ig de surface). Ils ont donné une valeur de 1 point à chacun des éléments suivant : positivité du CD5 et du CD23, négativité ou faible expression du FMC7 et du CD79b ou du CD22, faible intensité d'expression de l'immunoglobuline de l'Ig de surface (tableau 2) (61).

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

Tableau 2 : Score de Matutes et Moreau

Chez les patients atteints d'une CLL, la somme des points obtenus est strictement supérieure ou égale à 4. Quand cette somme est de 1 ou 2, nous pouvons exclure le diagnostic de CLL. Un score de 3 ne permet pas de différencier une CLL atypique d'un autre SLPC-B. L'analyse de l'ensemble du contexte clinique et biologique, ainsi que l'étude de nouveaux marqueurs tels que le CD200, le CD43, ROR1 permettront d'orienter le diagnostic des cas litigieux.

#### I. D. 1. 2. Les caractéristiques phénotypiques de la HCL

D'un point de vue morphologique, la HCL est proche de certains SLPC-B. Cependant, son profil phénotypique est distinct des autres SLPC-B. La CMF est donc une étape essentielle à son diagnostic. En effet, la HCL n'exprime généralement pas le CD5, le CD10, ni le CD23. Néanmoins, elle exprime les antigènes CD19, CD20, CD22, CD79b, FMC7, CD11c, CD25, CD103, et le CD123. La coexpression des 4 derniers marqueurs (CD11c, CD25, CD103 et CD123) est propre à la HCL. Le *Score Royal Marsden* a été créé en utilisant l'expression de ces 4 antigènes (62) (63). L'expression d'un de ces marqueurs attribue 1 point. Un score supérieur ou égale à 3 est observé dans 98 % des HCL alors que dans les autres SLPC-B le score est faible (21).

A ce jour, les profils phénotypiques de la CLL et de la HCL sont ceux qui sont le mieux caractérisés. Pour les autres SLPC-B, bien que nous connaissions les profils d'expression « classiques » de chaque entité (tableau 3), il n'y a pas de consensus à suivre pour aider à orienter le diagnostic par l'intermédiaire de la CMF. L'utilisation et l'introduction de nouveaux marqueurs (CD180, CD200, ROR1) ont permis de mieux classer et d'orienter le diagnostic différentiel des SLPC-B.

	CLL	B-PLL	MCL	FL	MZL	HCL	SLVL	LPL
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	-	+	-	-/+	-	-/+	-
CD23	+	-	-	-/+	-	-	-/+	-
Expression de l'ig de surface	Faible ou -	++	++	++	++	+++	+++	Faible à moyenne
FMC7	Faible ou -	+	+	+	++	++	+++	+/-
CD22	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	+
CD79b	Faible ou -	+	+	+	+	+	++	+
CD10	-	-/+	-	+/-	-	-/+	-	-
CD103	-	-	-	-	-/+	+	-	-
CD11c	-/+	-	-	-	+/-	+	+	-
CD25	-/+	-	-	-	+/-	+	-	+
CD43	+	-	-/+	-	-	-/+	-	-
CD20	Faiblement +	+	+	+	+	++	++	+

Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques des SLPC-B

### **I. D. 1. 3. CD200**

La molécule CD200 correspond à une glycoprotéine transmembranaire de type Ia. Elle fait partie de la superfamille des Ig. Sa structure comprend une partie extracellulaire semblable à une chaîne légère d'Ig avec un domaine variable et un domaine constant, une partie transmembranaire et une queue cytoplasmique (64).

Elle est exprimée au niveau des lymphocytes B, des lymphocytes T activés, des thymocytes, des cellules endothéliales, et des neurones. Cette glycoprotéine se lie à un récepteur CD200R1 situé sur les cellules myéloïdes et lymphoïdes. La liaison CD200/CD200R1 génère une réponse immunosuppressive avec l'inhibition des macrophages et l'induction des lymphocytes T régulateurs (65). Cette signalisation est utilisée en physiologie pour éviter une activation inappropriée des cellules immunitaires. Les cellules tumorales utilisent cette voie à leur avantage comme échappatoire à la réponse anti-tumorale (66).

### **I. D. 1. 4. ROR1**

ROR1 est un récepteur qui fait partie de la grande famille des Récepteurs à activité Tyrosine Kinase (RTK). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire avec 3 parties. Une partie extracellulaire comportant le domaine de liaison au ligand, une partie transmembranaire et un domaine extracellulaire comportant une région à activité tyrosine kinase (67).

Ce récepteur est présent à différents stades embryonnaires permettant l'organogénèse du système respiratoire, cardiaque et du système nerveux central. Son expression est diminuée après la naissance. Cependant, on observe une surexpression dans certains cancers tels que la CLL et d'autres hémopathies lymphoïdes. L'activation de ROR1 et le déclenchement de sa cascade de signalisation favorisent la survie, la prolifération et les métastases des cellules tumorales. Ainsi, le développement de thérapies ayant pour but d'inhiber la voie de signalisation du récepteur ROR1, permettrait de faire entrer en apoptose les cellules tumorales (68).

L'expression différentielle de ROR1 dans les différents SLPC-B est un argument supplémentaire pour aider le biologiste à faire le diagnostic de ces derniers.

### **I. D. 1. 5. CD180**

Le CD180 est une protéine de surface cellulaire exprimée au niveau des CPA et des LB. C'est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des Toll-like récepteurs (TLR). Cette grande famille est capable de reconnaître, grâce à son domaine extracellulaire, des composants d'agents microbiens. Par exemple, le CD180 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries à gram négatif. Cette capacité à reconnaître des composants microbiens lui confère un rôle important dans les réponses immunitaires innées et adaptatives (67).

Plusieurs études ont montré une expression différentielle de ce marqueur dans les différents SLPC-B. En effet, l'étude de 2013 du Dr. Miguet a montré que les lymphomes d'origine splénique tels que le SMZL ou le SDRPL, avaient une plus forte expression du CD180 que la CLL ou le MCL (69).

## II. Matériel et méthode

L'objectif principal de notre étude est de développer un algorithme pour aider le biologiste à établir un diagnostic différentiel des principaux SLPC-B. Pour cela, nous avons réalisé une étude rétrospective chez les patients ayant eu un immunophénotypage lymphocytaire à la recherche d'un SLPC-B entre mars 2016 et mai 2019.

### II. A. Sélection des échantillons

Les données d'immunophénotypage des échantillons ont été récoltées par l'intermédiaire du système de laboratoire MOLIS. A partir de ces données, nous avons colligé sur un tableur Excel l'intensité d'expression de chaque marqueur par les cellules tumorales B CD19+, exprimée en pourcentage ou en valeur moyenne de fluorescence (MFI). Parmi les échantillons analysés, nous avons exclu les patients avec plusieurs clones tumoraux et les patients avec des MBL. Nous avons un total de 644 prélèvements avec 3 types de matrices différentes (443 de sang périphérique, 187 de moelle osseuse et 14 de liquide d'épanchement). A partir des données cliniques, des résultats de la cytologie, de la cytogénétique, de la biologie moléculaire, et de l'anatomopathologie, nous avons catégorisé chaque patient en accord avec la classification de l'OMS. La répartition des différents SLPC-B est représentée sur l'histogramme ci-dessous.

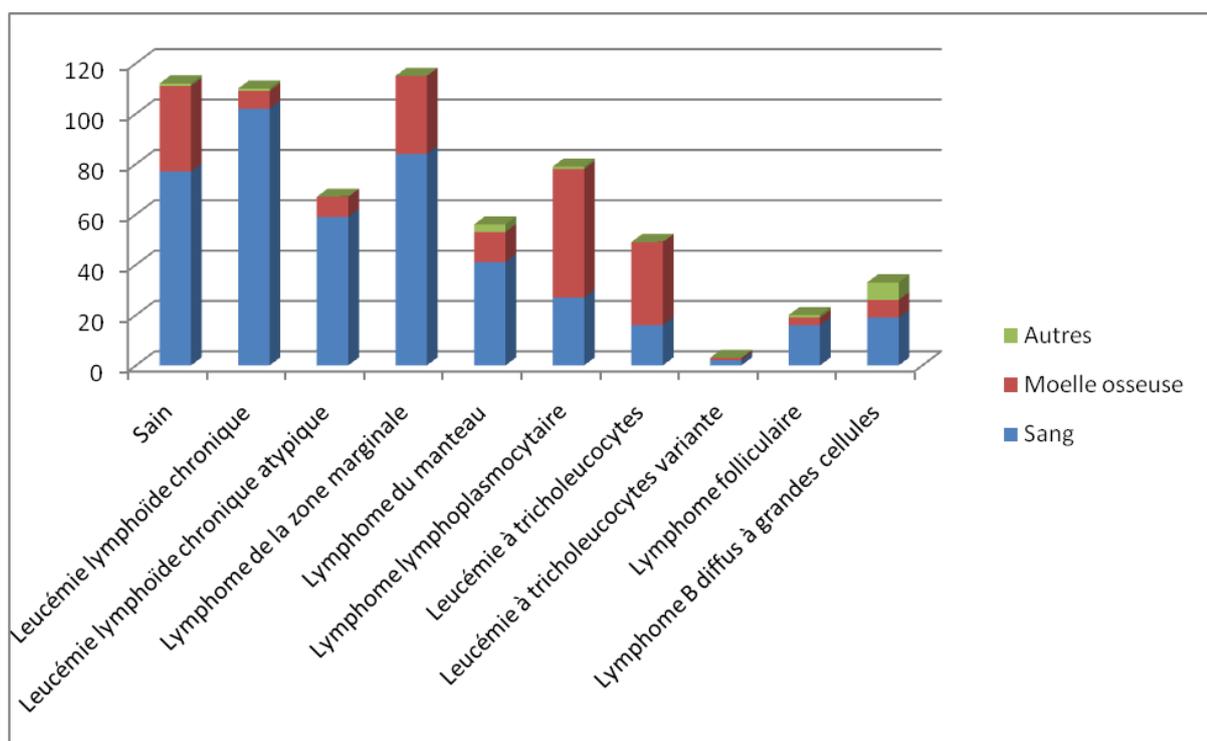


Figure 27: Répartition des différents SLPC-B en fonction du type d'échantillon

## **II. B. Appareil d'analyse et marquage des populations lymphocytaires**

### **II. B. 1. Appareil d'analyse**

Nous avons à notre disposition 3 appareils Navios® de Beckman-Coulteur 10 couleurs. Ces derniers vont nous permettre d'acquérir les différents événements cellulaires. Ces événements seront traités à l'aide du logiciel Kaluza®.

### **II. B. 2. Marquage des populations lymphocytaires**

Tout en respectant les recommandations du Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL), on utilise plusieurs panels d'anticorps dirigés contre certains marqueurs afin de différencier les sous populations lymphocytaires.

Le 1<sup>er</sup> panel d'anticorps permet de différencier les populations lymphocytaires T, B et NK. Il est constitué d'un marqueur pan-leucocytaire (CD45), de marqueurs associés aux LT (CD3, CD4, CD8), de marqueurs associés aux LNK (CD16 et CD56) et enfin d'un marqueur des LB (CD19). Par l'intermédiaire de ce panel, nous allons pouvoir isoler la population lymphocytaire à l'aide de l'histogramme CD45/SSC (Side scatter). Le SSC reflète la granularité des cellules du sang. Celui des lymphocytes est faible par rapport aux autres globules blancs. Une fois la population lymphocytaire ciblée, nous allons pouvoir différencier les LB par l'intermédiaire de l'histogramme CD19/SSC.

Le marquage des LB est réalisé par plusieurs panels d'anticorps :

En systématique, on utilise un premier panel permettant de calculer le score de Matutes. Ce panel est constitué d'anticorps fluorescents dirigés contre les antigènes CD5, CD19, CD23, CD45, CD79b, FMC7, Kappa et Lambda.

Un second panel d'anticorps permet d'orienter le biologiste en cas de score de Matutes  $\leq 3$ . Il est, lui, constitué d'anticorps fluorescents anti-CD19, CD20, CD45, CD22, CD25, CD10, CD180, CD200, CD43 et ROR1.

Lorsque notre population de LB est ciblée, l'intensité d'expression de chaque antigène est exprimée en pourcentage ou en MFI. Pour certains marqueurs comme le CD79b, les chaînes libres Kappa et Lambda, on calcule un ratio médian de fluorescence. Il correspond au rapport des MFI de notre population cible (LB) par rapport au MFI d'une population négative (LT). On considère que l'expression du marqueur est forte si ce ratio est supérieur à 10.

## **II. C. Analyse des résultats**

Pour établir notre algorithme décisionnel, nous avons étudié le pouvoir discriminant de chaque marqueur sur nos populations étudiées.

Afin d'évaluer de façon non biaisée ce pouvoir discriminant, nous avons réalisé des courbes de ROC (Receiver Operating Characteristic). Une courbe de ROC est une représentation graphique de la relation entre la sensibilité et la spécificité d'un test/d'un marqueur pour toutes les valeurs seuils possibles. En ordonnée, nous avons la sensibilité et en abscisse le calcul :  $[1 - \text{spécificité}]$ . Elle sera donc le reflet de la sensibilité et de la spécificité que possède un marqueur pour différencier un lymphome donné des autres SLPC-B.

Pour exploiter une courbe de ROC, nous regardons l'allure générale de cette dernière et nous calculons l'aire sous la courbe (AUC). Le calcul des différentes AUC nous permettra d'analyser les performances diagnostiques de chaque marqueur. Un marqueur qui distinguerait parfaitement un lymphome a une sensibilité et une spécificité de 100%. Ceci se traduira graphiquement par une AUC égale à 1 et une courbe passant par le point de coordonnées (0 ; 1). A l'inverse, si la distribution n'est pas discriminante alors l'AUC sera proche de 0,5 et l'utilisation de ce marqueur sera moins pertinente pour notre algorithme.

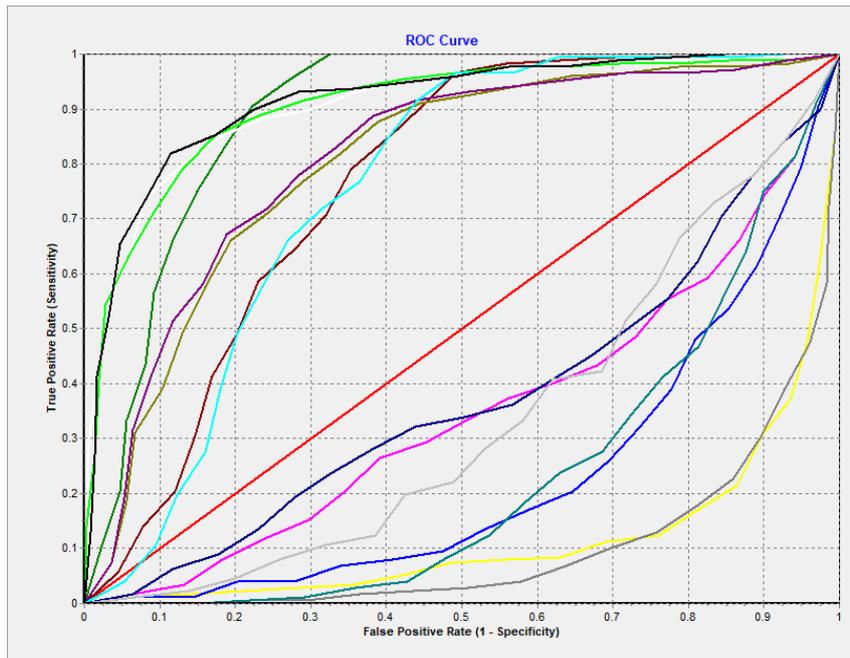


Figure 28 : Courbes de ROC des différents marqueurs dans le but de différencier les CLL/aCLL des autres SLPC-B

Sur la figure 28 ci-dessus est représenté un exemple de la réalisation de courbes de ROC afin de distinguer les CLL/aCLL des autres SLPC-B. Chaque courbe de couleurs différentes correspond à une courbe de ROC pour un marqueur donnée. Par exemple, en jaune est représenté les performances diagnostiques du marqueur CD79b pour différencier les CLL/aCLL des autres SLPC-B. Lorsque l'on analyse l'allure de cette courbe, nous observons qu'elle possède une AUC importante par rapport au marqueur CD180 (courbe gris clair). Dans cet exemple, nous pouvons conclure que l'utilisation du CD79b est plus judicieuse que celle du CD180 pour différencier les CLL/aCLL des autres SLPC-B.

Ainsi, nous avons exploité les valeurs d'AUC de chaque marqueur pour les différents SLPC-B. Nous avons retranscrit l'ensemble de ces AUC sur un tableau et défini un code couleur. Sur le tableau 5 ci-dessous est représenté l'exemple d'un tableau récapitulatif des AUC obtenues.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
MZL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
LPL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
FL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
DLBCL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
Moyenne des AUC	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des AUC obtenues pour différencier les SLPC-B

Les valeurs d'AUC proche de 1 (marqueur performant) sont de couleur jaune alors que les AUC proche de 0,5 sont bleues. La couleur blanche représente les valeurs proches de 0,75. Ensuite, nous avons réalisé la moyenne des AUC d'un marqueur pour chaque SLPC-B étudié. Cette moyenne résume l'ensemble des données d'AUC obtenue pour les courbes de ROC. Le marqueur le plus pertinent à utiliser dans l'algorithme sera celui avec une moyenne des AUC la plus proche de 1. Dans notre exemple du tableau 5, le marqueur le plus intéressant pour séparer ces 4 SLPC-B sera le CD10%.

Une fois le marqueur choisi, les seuils sont calculés selon la méthode de Fayyad et Irani (70). Ce seuil va nous permettre de classer nos données patients et de définir les nouvelles populations. A partir de ces nouvelles populations, nous allons réaliser de nouvelles courbes de ROC afin d'établir un nouveau marqueur qui permettra de séparer les SLPC-B.

### III. Résultats

Avant l'élaboration de notre algorithme décisionnel, nous allons nous intéresser à l'expression, sur notre cohorte, des 3 marqueurs introduits en 2016 : le CD200, le ROR1 et le CD180. Nous allons réaliser des diagrammes pour chaque marqueur afin de visualiser leur expression au sein des patients sains et de chaque lymphome.

#### III. A. Répartition des différents syndromes lymphoprolifératifs B en fonction de l'expression des marqueurs ROR1, CD180, CD200

##### III. A. 1. Expression du ROR1 dans les SLPC-B

Sur le diagramme ci-dessous, nous pouvons observer les intensités moyennes de fluorescence (MFI, à gauche) et le pourcentage d'expression du ROR1 (à droite) pour chaque SLPC-B.

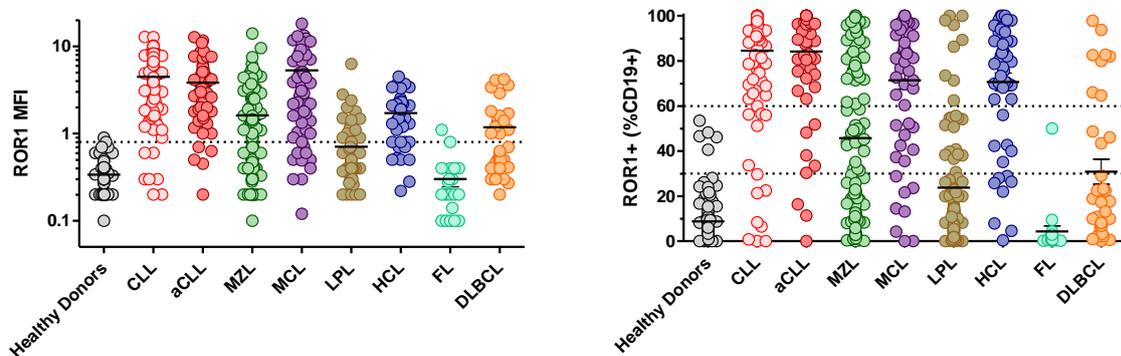


Figure 29 : MFI du ROR1 (à gauche) et pourcentage de positivité du ROR1 (à droite) en fonction des types de SLPC-B

L'analyse de la variance nous permet de comparer les populations et de conclure à une différence significative ou non de l'expression du marqueur (tableau en annexe 3).

Les patients sains ont une expression faible de ROR1 en MFI et en pourcentage. Cette expression est significativement plus faible comparée aux autres SLPC-B, excepté pour le FL (en MFI et en pourcentage) et pour les DLBCL et les LPL (en pourcentage uniquement).

Les SLPC-B avec une expression la plus élevée de ROR1 sont la CLL et la aCLL en MFI et en pourcentage. A l'inverse, celui avec l'expression la plus faible est le FL.

### III. A. 2. Expression du CD180 dans les SLPC-B

L'expression du CD180 chez les patients sains est élevée (Figure 30). Elle est significativement plus élevée par rapport à tous les SLPC-B, que ce soit en MFI ou en pourcentage de positivité, excepté pour la HCL.

Nous observons pour ce marqueur 2 groupes. Un premier groupe avec une expression élevée du CD180 où l'on retrouve les patients sains et ceux atteints de HCL et de MZL. Un second groupe, avec une expression intermédiaire du CD180, qui comprend tous les autres SLPC-B.

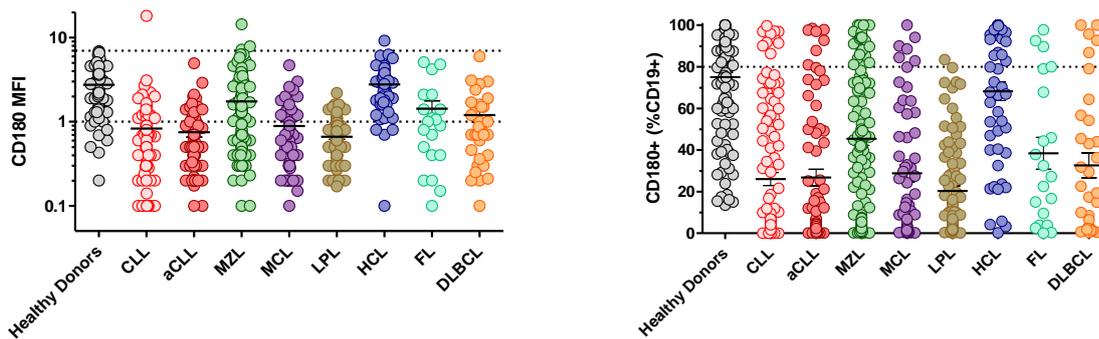


Figure 30 : Répartition des SLPC-B en fonction de la MFI du CD180 (à gauche) et du pourcentage de positivité du CD180 (à droite)

### III. A. 3. Expression du CD200 au sein de chaque SLPC-B

D'après la figure 31, les MFI et le pourcentage de positivité du CD200, sont significativement différents entre les sujets sains et tous les autres SLPC-B sauf pour le FL et le DLBCL (en MFI et en pourcentage) et le MZL et la HCL (en pourcentage uniquement).

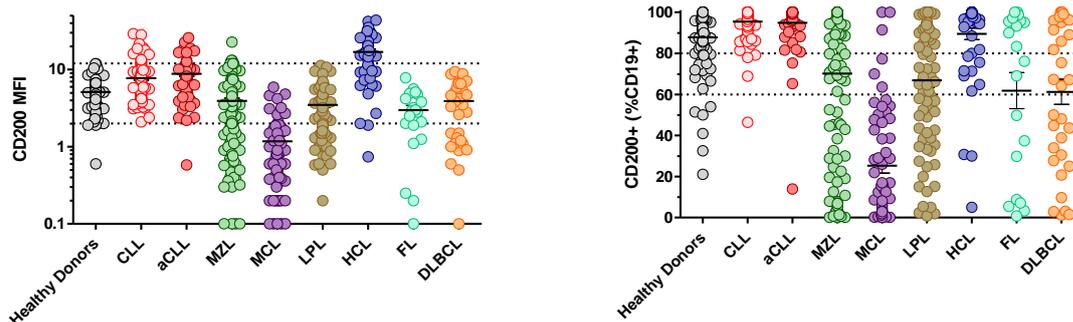


Figure 31 : Répartition des SLPC-B en fonction de la MFI du CD200 (à gauche) et du pourcentage de positivité du CD200 (à droite)

Nous remarquons que la CLL, la aCLL et la HCL ont les MFI et les pourcentages d'expression du CD200 les plus élevés tandis que le MCL est le lymphome avec l'expression la plus faible.

On observe pour ces trois marqueurs (ROR1, CD180, CD200), une expression significativement différente entre les patients sains et les patients atteint d'un SLPC-B.

Lorsque l'on compare la répartition entre les différents SLPC-B, on voit qu'il est impossible de fixer un seuil permettant de les séparer. L'expression est, en effet, hétérogène, même au sein de chaque groupe de lymphome. On ne peut donc pas utiliser, de manière simple, ces nouveaux marqueurs pour orienter le diagnostic de SLPC-B. La réalisation d'un algorithme ou d'un score diagnostique est une façon d'utiliser ces marqueurs de façon pertinente.

Nous avons choisi la réalisation d'un algorithme qui nous a paru plus judicieux à cause du nombre important de sous-type de SLPC-B et de l'hétérogénéité d'expression des marqueurs au sein de ces groupes.

### III. B. Réalisation de l'algorithme

#### III. B. 1. Etude des marqueurs sur la cohorte initiale

Nous nous sommes intéressés à l'ensemble de notre population ayant un SLPC-B. Cela correspond à 532 patients. La prévalence des différents SLPC-B de notre population initiale est représentée sur l'histogramme ci-dessous.

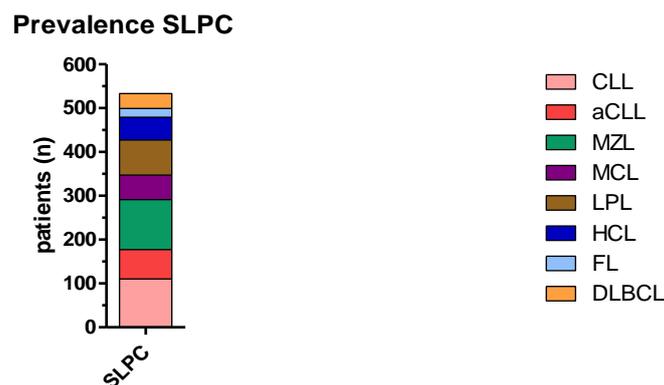


Figure 32 : Histogramme représentant la prévalence des différents SLPC-B dans notre population de malades

Parmi les SLPC-B de notre population, le groupe CLL/aCLL est le plus représenté avec 33,3% des patients. Ils sont suivis par le MZL et le LPL avec respectivement 22% et 15%. Le MCL se situe autour de 10%. Enfin avec des pourcentages inférieurs à 10%, nous retrouvons la HCL, le DLBCL et le FL (figure 32).

A partir de cette population initiale, nous avons réalisé des courbes de ROC. Ces dernières, nous permettront de mettre en évidence la capacité des marqueurs à différencier un lymphome donné des autres SLPC-B. Dans l'exemple ci-dessous, nous avons choisi d'illustrer la capacité des différents marqueurs à séparer le FL des autres SLPC-B (non-FL) de la population de départ (figure 33).

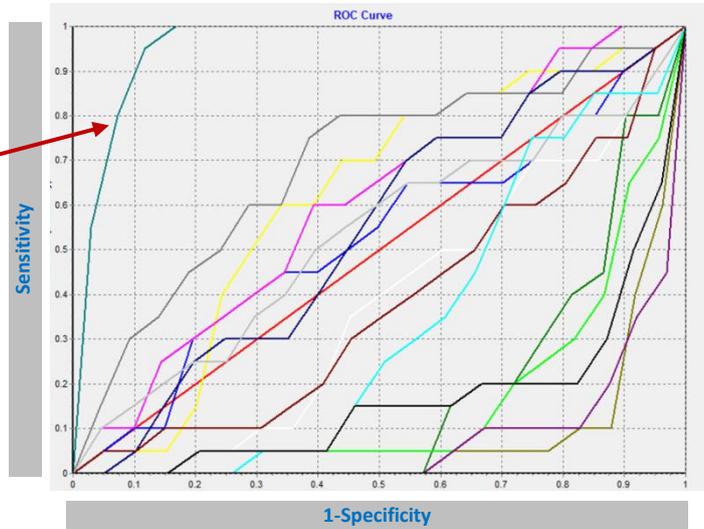
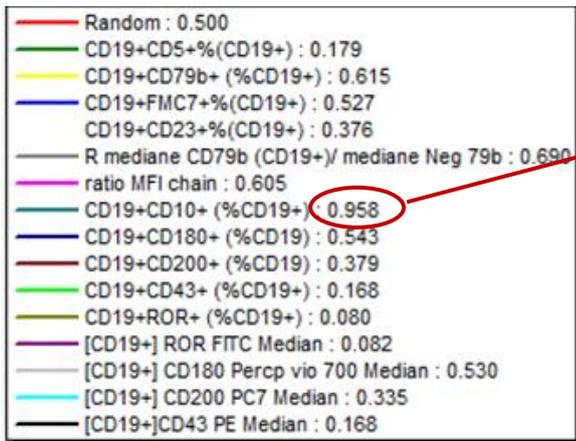


Figure 33 : Courbes de ROC pour distinguer le FL des formes non-FL

Les marqueurs avec une AUC proche de 1 ou de 0 sont pertinents pour distinguer respectivement de manière positive ou négative les FL des non-FL. Pour le FL nous remarquons que le CD10 est judicieux pour séparer les FL des non-FL. Il possède une AUC à 0,958.

Une fois toutes les courbes de ROC réalisées, nous avons retranscrit les AUC sur un tableau. Nous avons matérialisé à l'aide d'un code couleur la capacité du marqueur à différencier le lymphome étudié des autres lymphomes. Ci-dessous, voici le tableau récapitulatif du pouvoir discriminant de chaque marqueur pour permettre de différencier les SLPC-B de notre population initiale.

	CD5%	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	ROR%	ROR MFI	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
CLL															
MZL															
MCL															
LPL															
HCL															
DLBCL															
FL															
Moyenne des AUC	<b>0,76</b>	0,67	0,68	0,70	0,69	0,63	0,68	0,61	0,67	0,69	0,71	0,71	0,63	0,72	0,70

Tableau 5 : Tableau représentant la capacité des marqueurs à différencier les différents SLPC-B

D'après le tableau 6, le marqueur le plus intéressant à utiliser dans cette population est le CD5. En effet, ce dernier possède une moyenne des AUC à 0.76. Il s'agit de la moyenne des AUC la plus proche de 1. Le CD5 est donc le premier marqueur choisi pour notre algorithme.

Par la suite nous avons utilisé les seuils obtenus pour le CD5, selon la méthode de Fayyad-Irani, et établi des diagrammes afin d'étudier la répartition des SLPC-B en fonction de l'expression du marqueur.

Pour le CD5 (figure 34), le logiciel nous propose 2 seuils. Un premier seuil à 31,69% et un second à 91,99%.

Source	Intervals	Cutpoints
CD19+CD5+%(CD19+)	3	( 31.6901 ; 91.9868 )
CD19+CD79b+ (%CD19+)	2	( 35.6666 )
CD19+FMC7+%(CD19+)	2	( 86.6061 )
CD19+CD23+%(CD19+)	3	( 24.2433 ; 85.7000 )
R mediane CD79b (CD19+)/ mediane I neg 79b	3	( 1.7025 ; 4.8950 )
ratio MFI chain	2	( 9.7500 )
CD19+CD10+ (%CD19+)	3	( 2.5881 ; 10.9610 )
CD19+CD180+ (%CD19)	2	( 20.3183 )
CD19+CD200+ (%CD19)	2	( 77.6354 )
CD19+CD43+ (%CD19+)	4	( 11.4835 ; 51.5294 ; 95.3086 )
CD19+ROR+ (%CD19+)	2	( 55.8359 )
[CD19+] ROR FITC Median	3	( 1.1605 ; 4.5635 )
[CD19+] CD180 Percp vio 700 Median	2	( 1.5245 )
[CD19+] CD200 PC7 Median	4	( 3.0250 ; 5.9500 ; 13.3000 )
[CD19+]CD43 PE Median	4	( 0.3625 ; 3.0000 ; 17.1150 )

Figure 34 : Seuils obtenus pour chaque marqueur sur la cohorte initiale

Ces 2 seuils nous permettront de différencier 3 groupes :

- les SLPC-B avec une expression de CD5 forte (>90%) : « CD5 high »
- les SLPC-B avec une expression de CD5 modérée (30% ≤ CD5% ≤ 90%) : « CD5 mid »
- les SLPC-B avec une expression faible de CD5 (<30%) : « CD5 neg »

Sur l'histogramme ci-dessous est représentée la répartition des SLPC-B en fonction de l'expression du CD5.

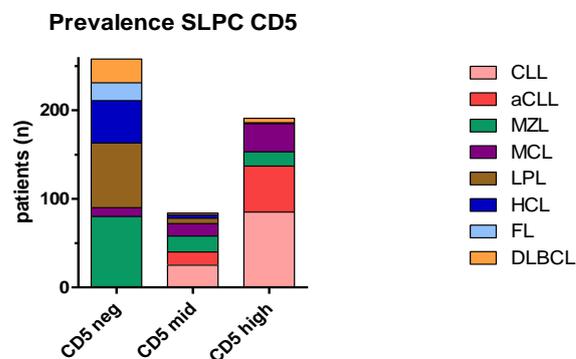


Figure 35 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B en fonction de l'expression du CD5

A présent, nous allons établir notre algorithme en réalisant systématiquement de nouvelles courbes de ROC pour chaque groupe et en analysant ces dernières avec le même cheminement que précédemment.

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux SLPC-B avec une expression forte du CD5.

### III. B. 2. Etude des marqueurs sur la population CD5 high

Notre population CD5 high est représentée par 191 patients. Comme nous pouvons le voir sur la figure 35, on retrouve principalement 3 types de SLPC-B. Le plus représenté est le groupe CLL/aCLL. Il représente 72% des SLPC-B CD5 high. Ensuite, nous retrouvons le MCL et le MZL respectivement autour de 17% et 8% des SLPC-B CD5 high.

A partir de cette population CD5 high, nous avons réalisé des courbes de ROC et résumé nos résultats sur ce tableau ci-dessous.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	ROR%	ROR MFI	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
CLL	0,87	0,80	0,88	0,89	0,74	0,60	0,57	0,81	0,82	0,63	0,61	0,57	0,84	0,85
MZL														
MCL														
Moyenne des AUC	0,87	0,80	0,88	0,89	0,74	0,60	0,57	0,81	0,82	0,63	0,61	0,57	0,84	0,85

Tableau 6 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5 high

D'après le tableau 7, le marqueur le plus discriminant pour différencier la population de SLPC-B CD5 high est le CD79b ratio. En effet, ce dernier possède une moyenne des AUC autour de 0,89.

Nous disposons d'un seul seuil pour le CD79b ratio. Ce seuil est de 8. Il permet de distinguer 2 groupes : le premier groupe constitué des SLPC-B CD5high-CD79bratio **high** (>8) et le second avec des SLPC-B CD5 high-CD79bratio **low** ( $\leq 8$ ).

Prevalence SLPC CD5highCD79R

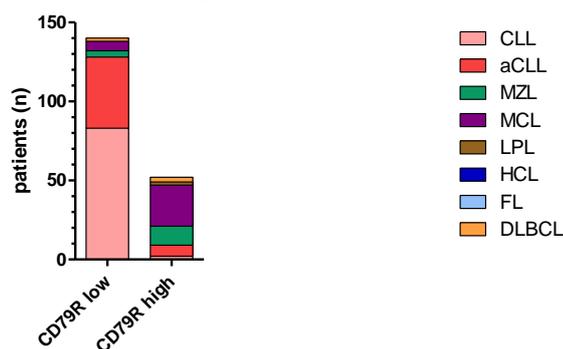


Figure 36 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5 high en fonction de l'expression du CD79b ratio

Sur l'histogramme ci-dessus nous pouvons observer que la population CD5high-CD79bratio **low** est représentée à 91,4% par des patients atteints de CLL/aCLL. Le second SLPC-B le plus présent dans cette population est le MCL (4,3%). Notre objectif était donc de séparer les CLL/aCLL des MCL. Pour cela, en suivant le même raisonnement que précédemment, nous avons sélectionné le marqueur

CD23 avec un seuil de 30%. Par l'intermédiaire de ce marqueur, nous avons pu séparer les patients atteints de MCL de ceux atteints de CLL/aCLL.

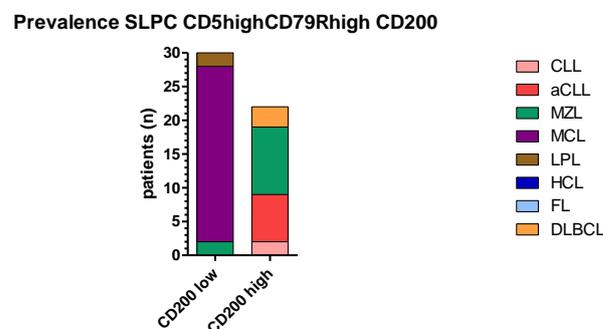
La population CD5high-CD79bratio **high** est constituée par 51% de patients atteints de MCL. Les autres SLPC-B représentés sont respectivement par ordre décroissant de fréquence le MZL (24%), la CLL et la aCLL (17,6%), le DLBCL (6%) et le LPL (2%). Nous allons essayer de séparer les différents SLPC-B de ce groupe. Ci-dessous, le tableau synthétise les données des AUC pour la population CD5high-CD79bratio **high**.

	FMC7%	CD23%	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	ROR%	ROR MFI	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
CLL	0,68	0,81	0,56	0,58	0,61	0,88	0,71	0,58	0,59	0,60	0,88	0,67
MZL	0,68	0,81	0,56	0,58	0,61	0,88	0,71	0,58	0,59	0,60	0,88	0,67
MCL	0,68	0,81	0,56	0,58	0,61	0,88	0,71	0,58	0,59	0,60	0,88	0,67
Moyenne des AUC	0,68	0,81	0,56	0,58	0,61	0,88	0,71	0,58	0,59	0,60	0,88	0,67

**Tableau 7 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5 high-CD79bratio high**

D'après le tableau 8, le CD200 % est le marqueur le plus intéressant avec une moyenne des AUC la plus élevée autour de 0,88. Pour ce marqueur, un seul seuil est proposé à 70 %. Nous distinguerons donc les CD5high-CD79bratiohigh-CD200 **low** des CD5high-CD79bratiohigh-CD200 **high**.

Dans la population CD5high-CD79bratiohigh-CD200 **low**, le MCL est le SLPC-B le plus représenté avec une prévalence de 89,6%. Les autres SLPC-B que l'on retrouve sont le MZL et le LPL (figure 37). Ce marqueur nous permet de séparer les MCL qui ont une expression faible du CD200 des autres SLPC-B.



**Figure 37 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5high-CD79bratiohigh en fonction de l'expression du CD200**

En ce qui concerne la population CD5high-CD79bratiohigh-CD200 **high**, on peut noter la présence en quantité à peu près équivalente de patients atteints de CLL/aCLL et de patients atteints de MZL. Il est donc pertinent d'utiliser un nouveau marqueur pour essayer de séparer ces pathologies. D'après l'analyse des courbes de ROC, le marqueur CD43% est le plus judicieux avec une moyenne des AUC à 0,91 et un seuil de 15%. Nous obtenons ainsi une population CD5high-CD79bratiohigh-CD200high-CD43 **low** regroupant 90% de patients atteints de MZL et une population CD5high-CD79bratiohigh-CD200high-CD43 **high** constituée de 75% de patients atteints de CLL/aCLL.

Ci-dessous est résumé notre algorithme décisionnel pour les patients avec un SLPC-B CD5high.

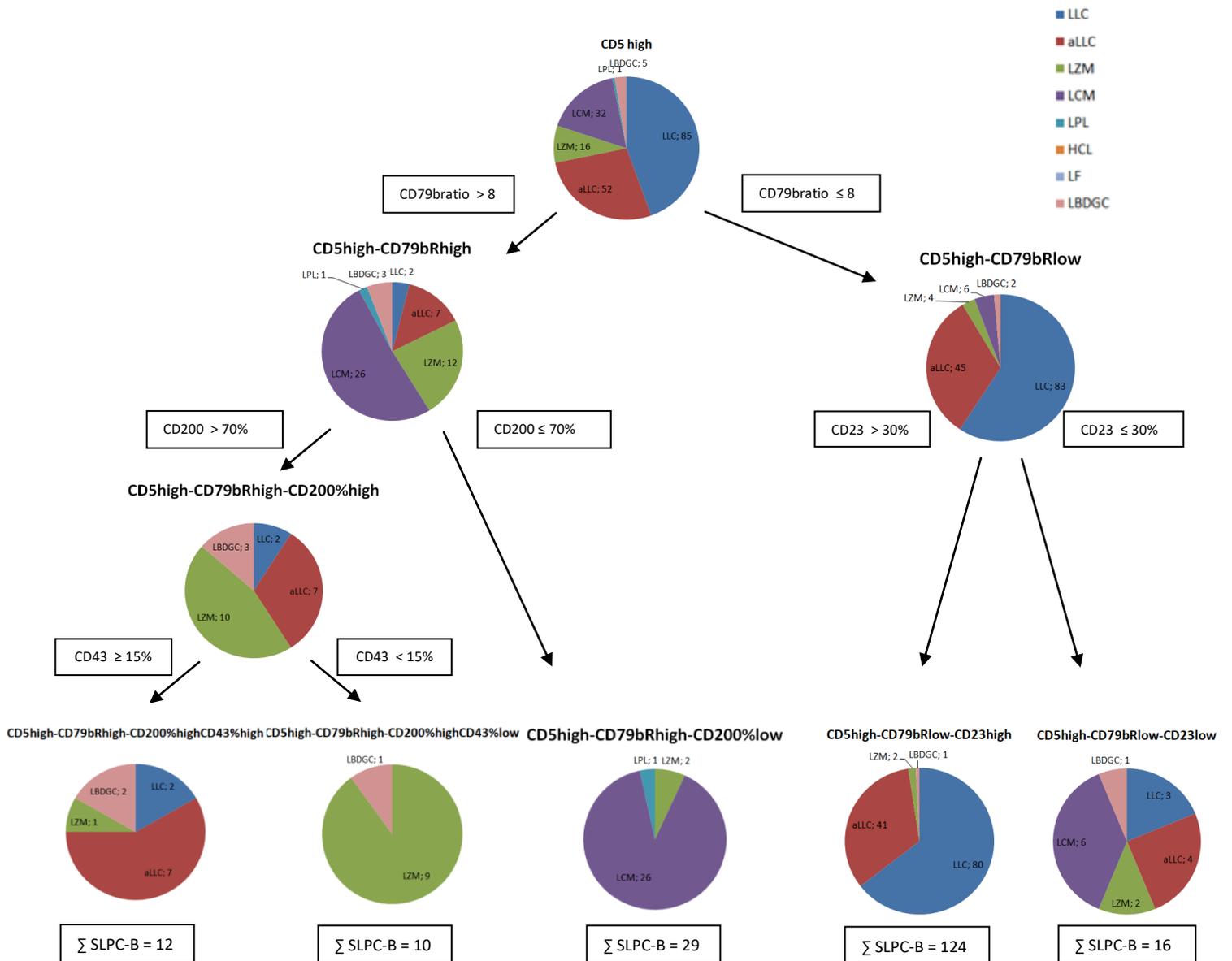


Figure 38 : Algorithme décisionnel de la population CD5 high

En analysant l'algorithme, nous pouvons remarquer que certains diagrammes circulaires permettent d'isoler un type de SLPC-B.

Par exemple, la population CD5high-CD79bratiohigh-CD200high-CD43low est principalement constituée de patients atteints d'un MZL. Lorsque nous appliquons l'algorithme, si on aboutit à cette population cela nous permet d'évoquer un MZL avec une valeur prédictive positive (VPP) de 90% et une valeur prédictive négative (VPN) de 79,7%. La spécificité est de 99,8%.

En utilisant ce raisonnement et cette même démarche, nous pouvons calculer les performances diagnostiques de l'algorithme pour la population CD5 High.

Phénotype	Diagnostic probable selon l'algorithme	VP	VN	FP	FN	VPP	VPN	Spécificité
CD5high-CD79bratiohigh-CD200high-CD43low	<b>MZL</b>	9	416	1	106	<b>90%</b>	<b>79,70%</b>	<b>99,80%</b>
CD5high-CD79bratiohigh-CD200low	<b>MCL</b>	26	473	3	30	<b>89,60%</b>	<b>94%</b>	<b>99,40%</b>
CD5high-CD79bratiolow-CD23high	<b>CLL/aCLL</b>	121	352	3	56	<b>97,60%</b>	<b>86,30%</b>	<b>99,20%</b>
CD5high-CD79bratiohigh-CD200high-CD43high	<b>CLL/aCLL</b>	9	352	3	168	<b>75%</b>	<b>67,70%</b>	<b>99,10%</b>

Tableau 8 : Tableau résumant les performances de l'algorithme de la population CD5 high avec VP (vrai positif), VN (vrai négatif), FP (Faux positif), FN (faux négatif), VPP (valeur prédictive positive), VPN (valeur prédictive négative)

La population CD5high-CD79bratiolow-CD23low ne permet pas d'obtenir un diagnostic probable à choix unique. Cependant, pour ce phénotype, on observe deux SLPC-B majoritaires (cf figure 38) qui sont la CLL/aCLL et le MCL. Le diagnostic probable selon notre algorithme sera donc la présence d'une CLL/aCLL ou d'un MCL.

### III. B. 3. Etude des marqueurs sur la population CD5 mid

Notre population CD5mid est la plus petite avec 84 patients. Comme pour la population CD5 high, les 3 SLPC-B les plus représentés sont la CLL/aCLL, le MZL et le MCL. On retrouve 47,6% de patients avec une CLL/aCLL, 21,4% de patients atteints de MZL, 16,7% de MCL, 7,1% de LPL, 4,8% de HCL et enfin 2,4% de DLBCL (figure 35 ; page 52).

D'après le tableau des AUC ci-dessous, le CD23 est le marqueur le plus discriminant à utiliser avec une moyenne des AUC autour de 0,80.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	ROR%	ROR MFI	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
CLL	0,74	0,68	0,80	0,78	0,67	0,65	0,57	0,76	0,69	0,60	0,61	0,58	0,78	0,69
MZL	0,74	0,68	0,80	0,78	0,67	0,65	0,57	0,76	0,69	0,60	0,61	0,58	0,78	0,69
MCL	0,74	0,68	0,80	0,78	0,67	0,65	0,57	0,76	0,69	0,60	0,61	0,58	0,78	0,69
Moyenne AUC	0,74	0,68	0,80	0,78	0,67	0,65	0,57	0,76	0,69	0,60	0,61	0,58	0,78	0,69

Tableau 9 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5mid

Avec l'utilisation d'un seuil d'expression à 70%, nous obtenons une population CD5mid-CD23 **high** (CD23 >70%) et une population CD5mid-CD23 **low** (CD23 ≤70%).

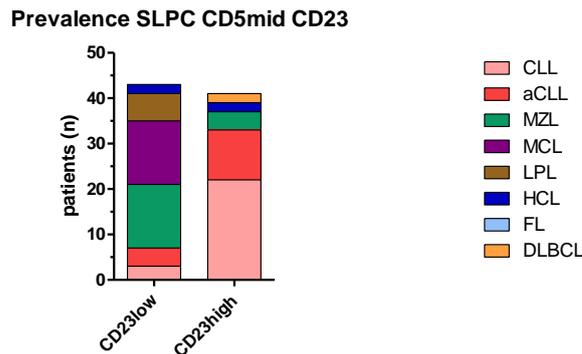


Figure 39 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5mid en fonction de l'expression du CD23

La population CD5mid-CD23 **high** est constituée à 80,5% de patients atteints de CLL/aCLL. Les autres SLPC-B sont le MZL (9,7%), le HCL et le DLBCL (4,9%). La réalisation de courbe de ROC sur cette population, nous montre que l'utilisation du CD79b ratio à un seuil de 5 est le meilleur marqueur pour séparer les CLL/aCLL des autres SLPC-B. Cela nous permet d'obtenir une population CD5mid-CD23high-CD79bratio **low** où l'on retrouve que des patients atteints de CLL/aCLL et une population CD5mid-CD23high-CD79bratio **high** constituée de 13 patients. Cette dernière est composée d'un ensemble hétérogène de SLPC-B. Aucun marqueur ne permet de discriminer de manière significative les SLPC-B de ce groupe.

La population CD5mid-CD23low est constituée à plus de 65% par des patients atteints de MZL et de MCL. Les autres SLPC-B représentés sont le LPL, la CLL/aCLL et la HCL. L'utilisation successive du CD200 à un seuil d'expression de 80% et du ROR avec un seuil de 60% est intéressante pour séparer les différents SLPC-B de ce groupe hétérogène.

Ci-dessous est résumé notre algorithme décisionnel pour les patients avec un SLPC-B CD5mid.

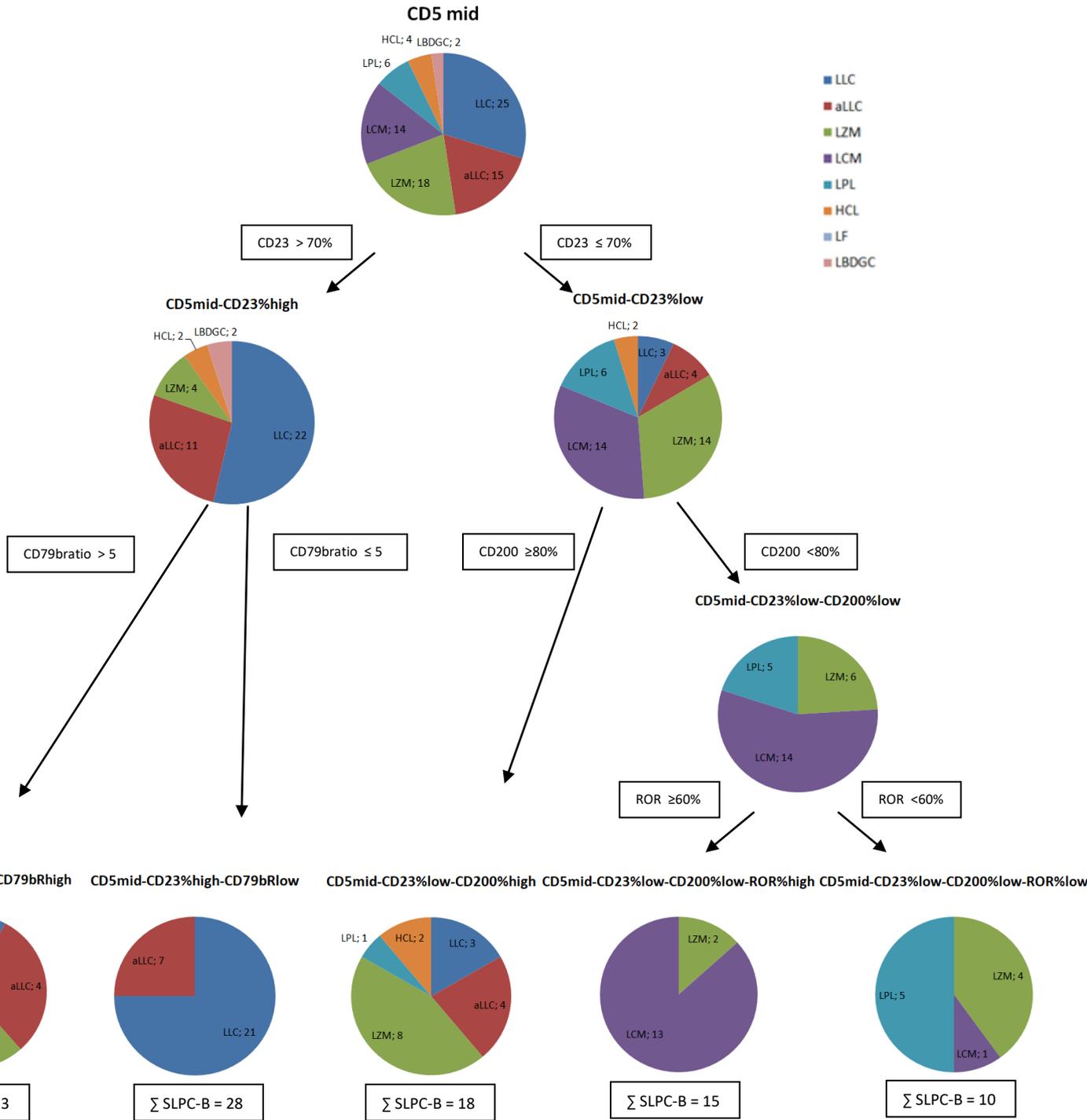


Figure 40 : Algorithme décisionnel pour la population CD5 mid

Le tableau ci-dessous représente les performances de l'algorithme permettant de séparer les SLPC-B CD5 mid.

Phénotype	Diagnostic probable selon l'algorithme	VP	VN	FP	FN	VPP	VPN	Spécificité
CD5mid-CD23high-CD79bratiolow	<b>CLL/aCLL</b>	28	355	0	149	<b>100%</b>	<b>70,40%</b>	<b>100%</b>
CD5mid-CD23low-CD200low-RORhigh	<b>MCL</b>	13	474	2	43	<b>86,70%</b>	<b>91,70%</b>	<b>99,60%</b>

**Tableau 10 : Tableau résumant les performances de l'algorithme de la population CD5 mid avec VP (vrai positif), VN (vrai négatif), FP (Faux positif), FN (faux négatif), VPP (valeur prédictive positive), VPN (valeur prédictive négative)**

Parmi les différents phénotypes, 3 groupes ne permettent pas d'avancer un diagnostic à choix unique. Cependant, pour chacune de ces populations, nous pouvons proposer un diagnostic à choix multiples car nous retrouvons deux SPLC-B majoritaires :

- Diagnostic probable de CLL/aCLL ou MZL pour la population CD5mid-CD23high-CD79bratiohigh
- Diagnostic probable de CLL/aCLL ou MZL pour la population CD5mid-CD23low-CD200high
- Diagnostic probable de LPL ou MZL pour la population CD5mid-CD23low-CD200low-RORlow

### III. B. 4. Etude des marqueurs sur la population CD5 low

Notre population CD5low est constituée de 257 patients. Parmi ces patients, on retrouve 31% de MZL, 28% de LPL, 19% de HCL, 10% de DLBCL, 8% de FL et 4% de MCL (figure 35 ; page 52).

Le ROR est le marqueur le plus intéressant pour distinguer les SPLC-B de cette population. En effet, il possède une moyenne des AUC de 0,67 (tableau 12).

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	ROR%	ROR MFI	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
LPL														
MZL														
FL														
DLBCL														
HCL														
moyenne	0,58	0,67	0,55	0,60	0,61	0,65	0,64	0,60	0,66	0,67	0,67	0,66	0,66	0,66

Tableau 11 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs pour différencier les SLPC-B CD5low

Nous observons 2 seuils pour le ROR. Ces 2 seuils nous permettrons de distinguer 3 groupes :

- Les SLPC-B CD5low-ROR **high** (ROR >55%)
- Les SLPC-B CD5low-ROR **mid** (5% ≤ ROR% ≤ 55)
- Les SLPC-B CD5low-ROR **low** (ROR < 5%)

Prevalence SLPC CD5neg ROR

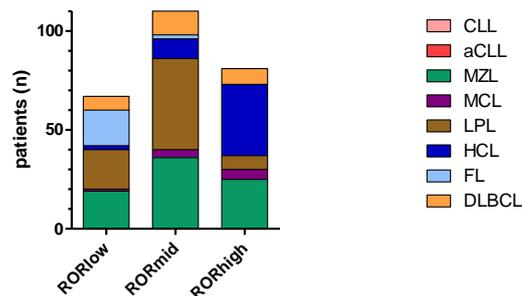


Figure 41 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5low en fonction de l'expression du ROR

Sur la figure 41, nous observons que les 3 populations sont encore très hétérogènes. D'autres marqueurs seront nécessaires pour séparer les différents SLPC-B de ces 3 groupes.

#### III. B. 4. 1. Etude des marqueurs sur la population CD5low-ROR high

Dans cette population, le MZL et le HCL représentent plus de 75% des SLPC-B. D'après l'analyse des courbes de ROC, le CD200MFI est le marqueur le plus judicieux à sélectionner. Il possède la moyenne des AUC la plus élevée autour de 0,83.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
MZL												
HCL												
Moyenne des AUC	0,70	0,60	0,53	0,62	0,55	0,62	0,75	0,66	0,60	0,76	0,83	0,58

Tableau 12 : Tableau récapitulatif représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5low-RORhigh

Il nous permet d'obtenir une population CD5low-RORhigh-CD200MFI **high** (CD200MFI  $\geq 9$ ) avec près de 88% de patients atteints de la HCL et une population CD5low-RORhigh-CD200MFI **low** (CD200MFI  $< 9$ ) avec une répartition hétérogène des différents SLPC-B (figure 42).

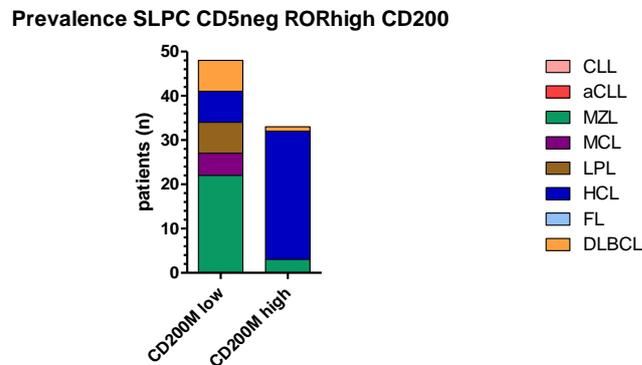


Figure 42 : Histogramme représentant la répartition des différents SLPC-B CD5lowRORhigh en fonction de la MFI du CD200

Sur cette dernière population CD5low-RORhigh-CD200MFIlow, le FMC7 se révèle comme étant le marqueur avec une AUC la plus intéressante. Avec un seuil de 60%, cela nous permet de séparer la majorité des LPL des autres SLPC-B.

### III. B. 4. 2. Etude des marqueurs sur la population CD5low-ROR mid

Dans cette population, on retrouve principalement le MZL et le LPL. A eux deux, ils constituent près de 75% des SLPC-B de cette catégorie.

D'après le tableau des AUC ci-dessous, on observe que le FMC7 est le marqueur le plus pertinent avec une moyenne des AUC de 0,74.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
MZL	0,63	0,74	0,60	0,66	0,59	0,66	0,68	0,57	0,74	0,69	0,55	0,70
LPL	0,63	0,74	0,60	0,66	0,59	0,66	0,68	0,57	0,74	0,69	0,55	0,70
DLBCL	0,63	0,74	0,60	0,66	0,59	0,66	0,68	0,57	0,74	0,69	0,55	0,70
Moyenne des AUC	0,63	0,74	0,60	0,66	0,59	0,66	0,68	0,57	0,74	0,69	0,55	0,70

Tableau 13 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5low-RORmid

Ce dernier nous permet d'obtenir une population CD5low-RORmid-FMC7 **high** (FMC7  $> 99\%$ ) et une population CD5low-RORmid-FMC7 **low** (FMC7  $\leq 99\%$ ). Le premier groupe est constitué à 88% par des patients atteints de MZL. Le reste du groupe est représenté par des patients atteints de DLBCL. Le second groupe est toujours hétérogène. Il nécessite l'utilisation du CD180MFI pour améliorer l'algorithme. Ce dernier marqueur permet notamment de regrouper les LPL dans une population CD5low-RORmid-FMC7low-CD180MFI **low**.

### III. B. 4. 3. Etudes des marqueurs sur la population CD5low-ROR low

Dans cette catégorie, on retrouve 3 SLPC-B en quantité à peu près équivalente. Ils constituent 85% des SLPC-B de ce groupe. Il s'agit du MZL, du FL et du LPL.

Le marqueur le plus pertinent à utiliser d'après le tableau 15 est le CD10. Il possède une moyenne des AUC de 0,74 et permettra de séparer l'ensemble des FL des autres SLPC-B de ce groupe.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD10%	CD180%	CD200%	CD43%	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
MZL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
LPL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
FL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
DLBCL	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67
Moyenne des AUC	0,54	0,66	0,56	0,59	0,68	0,74	0,64	0,59	0,65	0,60	0,58	0,67

Tableau 14 : Tableau récapitulatif représentant la capacité des différents marqueurs pour différencier les SLPC-B CD5low-RORlow

En utilisant un seuil de 10%, on obtient une population CD5low-RORlow-CD10 **high** (CD10 >10%) avec 67% de FL et une population CD5low-RORlow-CD10 **low** d'allure assez hétérogène.

Par la suite, l'analyse de nouvelles courbes de ROC sur la population CD5low-RORlow-CD10low a permis de choisir le FMC7 comme dernier marqueur pour distinguer les différents SLPC-B de ce groupe. Il possède une moyenne des AUC de 0,87 (tableau 16). Avec un seuil de FMC7 à 97%, on obtient une population CD5low-RORlow-CD10low-FMC7 **high** (FMC7 ≥97%) avec 80% de patients atteints d'un MZL et une population CD5low-RORlow-CD10low-FMC7 **low** (FMC7 <97%) avec 71% de LPL.

	CD79b%	FMC7%	CD23%	CD79b ratio	Chain ratio	CD180%	CD200%	CD43%	ROR MFI	CD180 MFI	CD200 MFI	CD43 MFI
MZL	0,63	0,87	0,58	0,70	0,71	0,74	0,56	0,70	0,58	0,75	0,52	0,78
LPL	0,63	0,87	0,58	0,70	0,71	0,74	0,56	0,70	0,58	0,75	0,52	0,78
Moyenne des AUC	0,63	0,87	0,58	0,70	0,71	0,74	0,56	0,70	0,58	0,75	0,52	0,78

Tableau 15 : Tableau représentant la capacité des différents marqueurs à différencier les SLPC-B CD5low-RORlow-CD10low

Ci-dessous est résumé notre algorithme décisionnel pour les patients avec un SLPC-B CD5low.

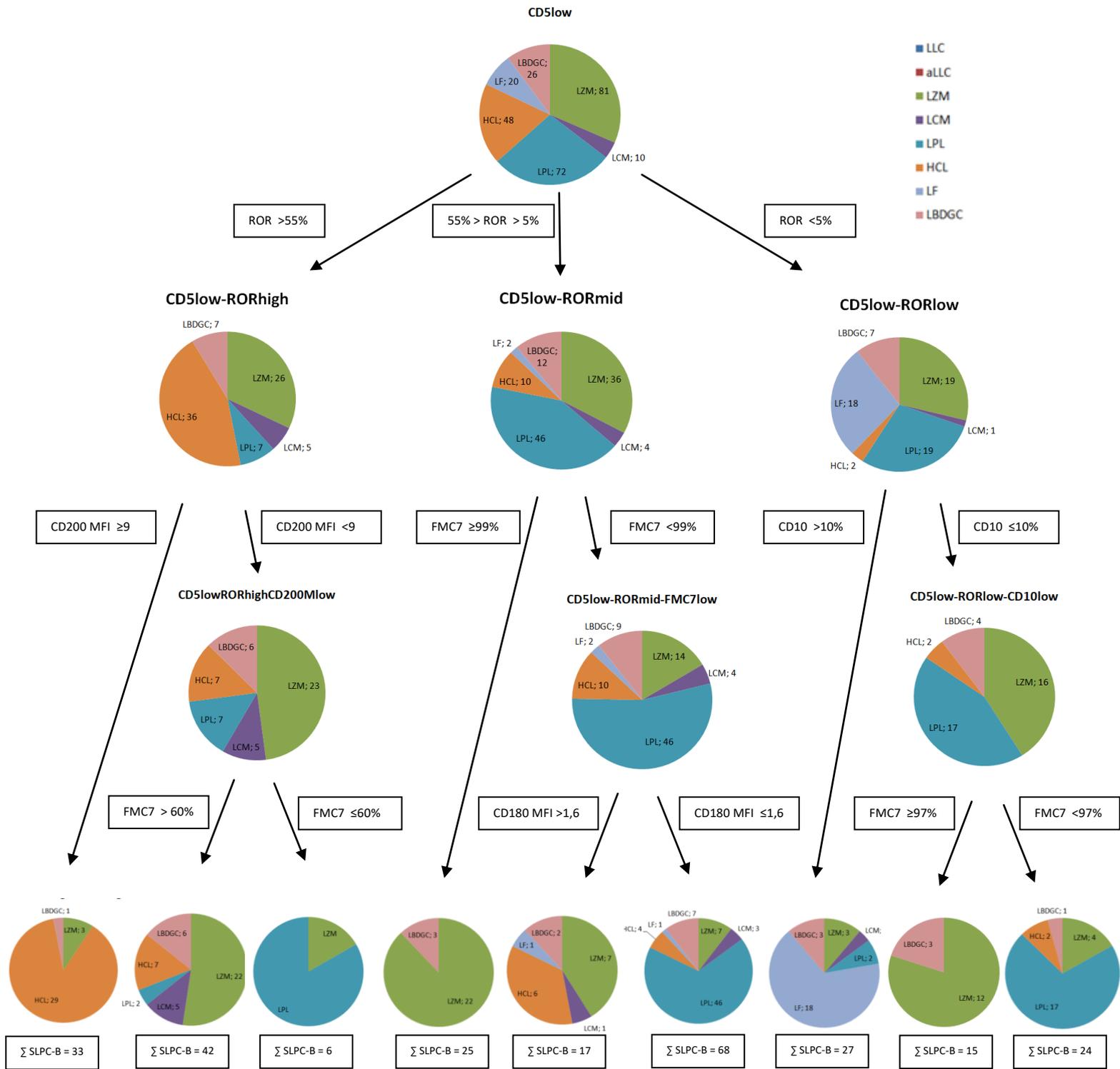


Figure 43 : Algorithme décisionnel de la population CD5 low

Ci-dessous sont représentées les performances diagnostiques de l’algorithme pour la population CD5 low.

Phénotype	Diagnostic probable selon l'algorithme	VP	VN	FP	FN	VPP	VPN	Spécificité
CD5low-RORhigh-CD200MFIhigh	HCL	29	476	4	23	88%	95,40%	99,20%
CD5low-RORhigh-CD200MFIlowFMC7high	MZL	22	397	20	93	52,40%	81%	95,40%
CD5low-RORhigh-CD200MFIlowFMC7low	LPL	5	452	1	74	83,30%	85,90%	99,90%
CD5low-RORmid-FMC7high	MZL	22	414	3	93	88%	81,70%	99,30%
CD5low-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow	LPL	46	431	22	33	67,60%	92,90%	95,10%
CD5low-RORlow-CD10high	FL	18	503	9	2	66,70%	99,60%	98,20%
CD5low-RORlow-CD10low-FMC7high	MZL	12	414	3	103	80%	80,10%	99,30%
CD5low-RORlow-CD10low-FMC7low	LPL	17	446	7	62	70,80%	87,80%	98,40%

Tableau 16 : Tableau résumant les performances de l’algorithme de la population CD5 low avec VP (vrai positif), VN (vrai négatif), FP (Faux positif), FN (faux négatif), VPP (valeur prédictive positive), VPN (valeur prédictive négative)

La population CD5low-RORmid-FMC7low-CD180MFIhigh ne permet pas d’obtenir un diagnostic probable à choix unique. Cependant, pour ce phénotype, on observe deux SLPC-B majoritaires qui sont la HCL et le MZL. Le diagnostic probable selon notre algorithme sera donc la présence d’une HCL ou d’un MZL.

### III. C. Hétérogénéité des SLPC-B

Suite à la réalisation de l’algorithme, une importante hétérogénéité phénotypique a été relevée au sein de certains lymphomes.

Nous avons réalisé un diagramme en bandes afin de mettre en évidence les lymphomes présentant, ou non, une grande hétérogénéité.

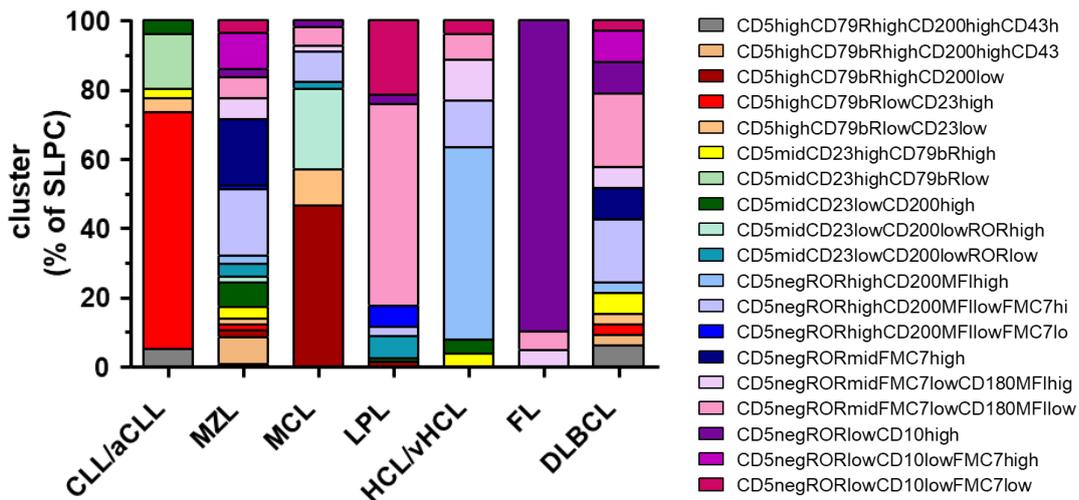


Figure 44 : Représentation graphique des différents clusters en pourcentage au sein des SLPC-B

D'après la figure 44, nous observons que tous les SLPC-B possèdent de nombreux clusters avec des phénotypes différents. Cependant, certains SLPC-B ont une hétérogénéité plus marquée que d'autres.

Les SLPC-B comme la CLL/aCLL, le MCL, le LPL, le HCL et le FL ont un ou deux clusters principaux :

- Pour la CLL/aCLL, les deux clusters principaux sont de phénotypes CD5high-CD79bratiolow-CD23high et CD5mid-CD23high-CD79bratiolow. Ces deux groupes comprennent 84% des CLL/aCLL
- Pour le MCL, les deux clusters principaux sont de phénotypes CD5high-CD79bratiohigh-CD200low et CD5mid-CD23low-CD200low-RORhigh. Ils comprennent 70% des MCL
- Pour le LPL, les deux clusters principaux sont de phénotypes CD5low-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow et le CD5low-RORlow-CD10low-FMC7low. A eux deux, ils comprennent 80% des LPL
- Le FL possède un seul cluster majoritaire de phénotype CD5low-RORlow-CD10high. Ce phénotype comprend 90% des FL de la cohorte
- Enfin, pour la HCL un seul cluster regroupe 56% des HCL de la cohorte avec un phénotype CD5low-RORhigh-CD200MFIhigh

A l'inverse, le MZL et le DLBCL ont une hétérogénéité plus importante. En effet, pour chacun, leurs deux principaux phénotypes regroupent seulement 38% et 39%.

### III. D. Validation de l'algorithme

Afin de tester notre algorithme, nous avons réalisé une cohorte de validation. Cette cohorte a été constituée entre avril et juin 2020. Elle est constituée de 35 patients. Le diagramme en bandes ci-dessous résume la composition de notre cohorte de validation.

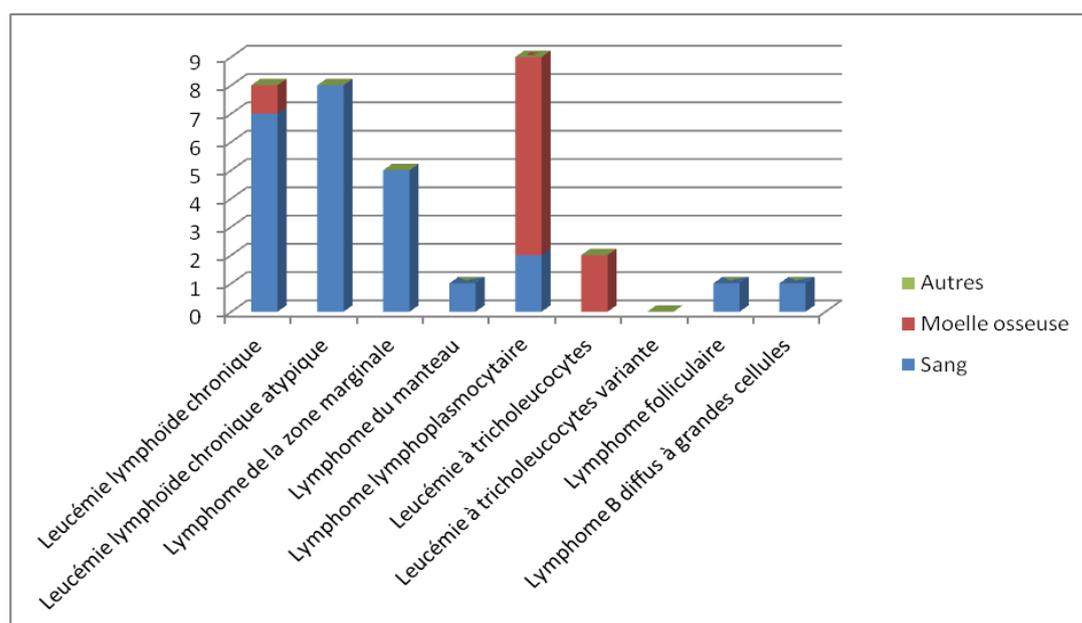


Figure 45 : Répartition des SLPC-B de notre cohorte de validation en fonction du type d'échantillon

Notre cohorte est principalement constituée de patients atteints de la CLL, de la aCLL, du LPL et du MZL. A eux 4, ils constituent 85,7% des SLPC-B.

Dans le tableau ci-dessous, nous allons représenter les résultats de la cohorte de validation en fonction des phénotypes obtenus pour chaque patient.

Patient	Diagnostic	Phénotype	Diagnostic probable selon l'algorithme
1	MCL	CD5high-CD79bratiohigh-CD200low	MCL
2	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
3	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
4	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
5	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
6	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
7	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
8	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
9	CLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
10	aCLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
11	aCLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
12	aCLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
13	aCLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
14	aCLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
15	aCLL	CD5high-CD79bRlow-CD23high	CLL/aCLL
16	FL	CD5mid-CD23high-CD79bRhigh	CLL/aCLL/MZL
17	aCLL	CD5mid-CD23low-CD200high	CLL/aCLL/MZL
18	aCLL	CD5mid-CD23low-CD200high	CLL/aCLL/MZL
19	MZL	CD5mid-CD23low-CD200high	CLL/aCLL/MZL
20	MZL	CD5mid-CD23low-CD200high	CLL/aCLL/MZL
21	LPL	CD5mid-CD23low-CD200high	CLL/aCLL/MZL
22	LPL	CD5mid-CD23low-CD200low-RORlow	LPL/MZL
23	HCL	CD5neg-RORhigh-CD200MFIhigh	HCL
24	HCL	CD5neg-RORhigh-CD200MFIlow-FMC7high	MZL
25	MZL	CD5neg-RORlow-CD10low-FMC7high	MZL
26	MZL	CD5neg-RORlow-CD10low-FMC7high	MZL
27	LPL	CD5neg-RORlow-CD10low-FMC7low	LPL
28	LPL	CD5neg-RORlow-CD10low-FMC7low	LPL
29	LPL	CD5neg-RORlow-CD10low-FMC7low	LPL
30	MZL	CD5neg-RORmid-FMC7high	MZL
31	LPL	CD5neg-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow	LPL
32	LPL	CD5neg-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow	LPL
33	LPL	CD5neg-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow	LPL
34	LPL	CD5neg-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow	LPL
35	DLBCL	CD5neg-RORmid-FMC7low-CD180MFIlow	LPL

Tableau 17 : Recueil des résultats de notre cohorte de validation après application de l'algorithme décisionnel

D'après le tableau 18, nous pouvons voir que sur 26 des 35 patients le résultat de notre algorithme abouti à un choix unique et ce choix est correct. Pour 5 des 35 patients, l'algorithme permet d'obtenir un choix multiple (2 lymphomes proposés) et le diagnostic est juste pour les 5 patients. Cependant, pour 4 patients, l'algorithme ne permet pas d'aboutir au bon diagnostic. Il s'agit des patients n°16, 21, 24 et 35 respectivement atteints d'un FL CD10-, d'un LPL CD5+, d'une HCL CD200 faible et d'un DLBCL.

## IV. Discussion

La réalisation d'un immunophénotypage lymphocytaire à la recherche d'un SLPC-B est un outil de première intention pour orienter le clinicien. Il joue un rôle majeur dans le diagnostic rapide à partir d'un prélèvement de sang, de moelle ou de tous autres fluides corporels.

La répartition des SLPC-B en fonction des trois marqueurs intégrés dans notre panel depuis 2016 (ROR1, CD180, CD200), nous montre bien que l'utilisation isolée de ces marqueurs n'a pas de pertinence diagnostique. Ce constat a également été fait par le Dr.Könhke pour l'ensemble des marqueurs utilisés en CMF. En effet, nous ne disposons pas de seuil discriminant un lymphome donné (71).

De nos jours, nous n'avons également pas de consensus sur le nombre de marqueurs à utiliser pour établir un diagnostic de lymphome.

Il est néanmoins possible d'utiliser ces marqueurs en les intégrant dans un score diagnostique ou dans un algorithme décisionnel. Nous avons choisi de réaliser un algorithme car il nous permet d'apprécier rapidement la répartition des différents SLPC-B en fonction des marqueurs utilisés. De plus, il pourrait permettre d'aider le biologiste à établir une conclusion plus précise sur son compte rendu.

Notre cohorte est importante (532 patients) mais n'a cependant permis d'utiliser que 4 marqueurs discriminants au maximum pour constituer les clusters phénotypiques, sur les 15 à notre disposition. Certains sous-groupes, de petit nombre, reste hétérogène par manque d'effectif pour continuer à utiliser notre méthode de discrimination à l'aide de courbes ROC.

Cependant, grâce à la réalisation de notre algorithme sous forme de diagrammes circulaires, nous avons, pour de nombreux cas, obtenu des valeurs prédictives très satisfaisantes. Ces bons résultats associés à la validation de cet algorithme par notre cohorte de validation, laissent entrevoir la possibilité d'une utilisation régulière de ce dernier dans la routine du cytométriste.

Malgré ces résultats, on observe que certains SLPC-B sont dispersés dans de nombreux diagrammes. En effet, les MZL et les DLBCL possèdent plusieurs profils phénotypiques différents. Ils sont présents dans la majorité des diagrammes circulaires finaux (18/19 pour les MZL et 13/19 pour les DLBCL). Ceci est le reflet de l'hétérogénéité importante de ces derniers. Il est donc parfois difficile à l'aide de l'algorithme et de la seule cytométrie d'orienter le clinicien sur un diagnostic. Ceci nous montre bien la difficulté que l'on peut avoir dans certaines situations à interpréter un immunophénotypage lymphocytaire.

Dans la littérature, c'est la première fois qu'une équipe présente ces résultats en réalisant des courbes de ROC sur chaque population pour choisir le marqueur le plus pertinent en vue de différencier les SLPC-B. Auparavant, en 2008 Fiona E.Craig a proposé dans Blood une classification basée sur la cytométrie en flux. Elle permettait de distinguer 4 groupes en fonction de l'expression du CD5 et du CD10 (72). Par exemple, la présence de LB matures avec un profil CD5+/CD10- augmentait la probabilité d'avoir une CLL/aCLL, un MCL, un MZL, un LPL ou un DLBCL. De nombreuses critiques ont été attribuées à ce mode de classification (69). Notre approche permet d'apprécier la répartition des SLPC-B à partir d'une cohorte de 532 patients pour éventuellement guider le clinicien vers d'autres analyses complémentaires, plus onéreuses et parfois plus invasives, et compléter ainsi la prise en charge et confirmer le diagnostic.

D'après notre étude, le marqueur CD5 est un marqueur clé comme le propose également le Dr Debord dans son algorithme (73). En effet, il est à la tête de notre arbre décisionnel et permet d'éliminer les CLL/aCLL du groupe CD5 low. Il permet également de séparer la majorité des MCL du groupe CD5 low. Nous retrouvons un peu plus de MCL CD5 low que dans la littérature (18% contre 5%) (74). Nous avons vérifié le diagnostic de chacun de ces patients atteints d'un MCL CD5 low et nous n'avons pas d'explication à ce pourcentage élevé.

Pour un seuil de positivité de CD5 à 30%, seuil de positivité du laboratoire de l'Oncopole de Toulouse et seuil proposé par le Dr. Matutes, nous retrouvons autour de 93,5% de patients atteints d'un des 4 SLPC-B suivant : la CLL et la aCLL (64,4%), le MCL (16,7%) et le MZL (12,4%). Ces résultats étaient attendus et retrouvés dans la littérature (75).

De plus, nous pouvons remarquer que les 3 marqueurs (CD200, ROR, CD180) intégrés dans notre nouveau panel en 2016 prennent une place importante dans cet algorithme.

Le CD200 est utilisé 3 fois dans notre arbre décisionnel. En analysant les populations pour lesquelles le CD200 est choisi comme marqueur le plus judicieux, on se rend compte qu'il est utilisé 2 fois pour isoler les MCL et 1 fois pour les HCL. En effet, le CD200 est exprimé de manière faible dans le MCL. Il permet de bien séparer le MCL des autres SLPC-B du groupe CD5 high et CD5 mid.

A l'inverse, la HCL possède une expression importante du CD200 et cela permet d'isoler les HCL CD5 neg des autres SLPC-B. De nombreuses études s'étaient déjà intéressées à l'expression du CD200 dans les différents SLPC-B et avaient trouvé des résultats similaires (76) (77).

Si l'on s'intéresse aux 3 HCLv de notre cohorte, nous observons que 2 d'entre eux se retrouvent dans la population CD5neg-RORhigh-CD200Mlow-FMC7high et 1 HCLv se retrouve dans la population CD5neg-RORhigh-CD200Mhigh avec une expression du CD200MFI à 9,60. Nous n'avons pas suffisamment de HCLv pour faire une comparaison de l'expression du CD200 entre la HCL et la HCLv. Cependant, dans notre cohorte la tendance est à une expression du CD200 plus faible dans le groupe des HCLv (moyenne des CD200MFI à 8) par rapport au HCL (moyenne des CD200MFI à 18). Une étude, réalisée par l'équipe du Dr. Salem en 2019, sur 59 patients atteints de HCL et 15 patients atteints de HCLv a trouvé des résultats similaires (78).

Le marqueur ROR prend également une place importante dans notre algorithme. Il est situé en haut de notre arbre décisionnel pour la population de CD5 low. Il est alors le marqueur le plus intéressant à utiliser pour discriminer la population de CD5 low. De nos jours aucune étude ne s'est intéressée à son utilisation dans le diagnostic différentiel des SLPC-B CD5 low. De nombreuses équipes ont montré son intérêt dans le diagnostic des CLL notamment les aCLL car il est généralement fortement exprimé dans ces pathologies (79). De plus, il est utilisé dans notre population CD5mid-CD23%low-CD200%low pour séparer la majorité des MCL des autres SLPC-B. Il s'agit également d'un marqueur connu pour être fortement exprimé dans les MCL (80).

Le CD180 est lui utilisé une fois dans notre algorithme pour la population CD5low-RORmid-FMC7low. Ce groupe principalement constitué du LPL, du MZL, de la HCL et du DLBCL utilise le marqueur CD180 pour différencier les HCL et les MZL, avec une expression moyenne de CD180 élevée, des autres LNH. Cette observation a déjà été mise en évidence notamment sur une étude multicentrique sur 4 CHU de France (81).

Nous remarquons que pour les deux grandes populations de CLL/aCLL, notre algorithme propose trois marqueurs identiques : le CD5, le CD23 et le CD79bratio. Ces deux populations (CD5high-CD79bratiolow-CD23high et CD5mid-CD23high-CD79bratiolow) comprennent 84% des patients de notre cohorte atteints de CLL/aCLL. Malgré la découverte de nouveaux marqueurs intéressants pour le diagnostic des CLL/aCLL comme le CD200 et le ROR1, les marqueurs proposés par le Dr. Matutes en 1994, restent, selon notre étude, les plus pertinents pour diagnostiquer les CLL (57).

Nous obtenons, au sein de notre algorithme, une association atypique. Il s'agit du phénotype CD5high-CD79bratiolow-CD23low qui est en faveur soit d'un MCL ou d'une CLL/aCLL. Il serait intéressant de réaliser des analyses complémentaires pour savoir si ces lymphomes possèdent également des anomalies cytogénétiques ou moléculaires caractéristiques.

Nous avons testé cet algorithme à l'aide d'une cohorte de validation de 35 patients. Nous avons obtenu un bon diagnostic dans 88,6% des patients. Ces résultats sont encourageants. Néanmoins, 4 patients sur 35 ne présentaient pas le bon diagnostic. Sur ces 4 patients, un patient était atteint d'un FL et un autre d'un DLBCL. Or, il s'agissait des seuls patients de notre cohorte de validation atteints par ces pathologies. Il serait donc intéressant de recueillir d'autres patients atteints par ces deux lymphomes afin de vérifier la concordance de notre algorithme. C'est également le cas pour le troisième patient qui était atteint d'une HCL : seulement 2 patients souffraient de ce SLPC-B dans notre cohorte de validation. Enfin, le dernier patient ne présentant pas le bon diagnostic était atteint d'un LPL. Il s'agit du seul patient qui n'a pas été bien diagnostiqué sur 9 patients souffrant d'un LPL.

L'application de cet algorithme ne permet pas d'établir un diagnostic de certitude en raison de l'hétérogénéité phénotypique. Pour interpréter un immunophénotypage lymphocytaire, il est important d'y associer les données cliniques, cytologiques, cytogénétiques et moléculaires. L'interprétation de l'ensemble de ces données médicales chez de nombreux patients et leurs intégrations dans un modèle d'intelligence artificielle pourraient, dans le futur, permettre d'établir un algorithme pour le diagnostic des SLPC-B.

La CMF est une technique largement pratiquée dans les laboratoires de biologie médicale. Afin que notre algorithme soit utilisé par d'autres laboratoires, il est indispensable d'avoir une technique et des procédures harmonisées. Cependant, la cytométrie est une technique multiparamétrique donc plus compliquée à harmoniser. Pour pouvoir rendre nos résultats comparables entre les laboratoires cela nécessite d'être homogène sur l'ensemble des étapes du processus multiparamétrique (préparation des échantillons, configuration des instruments, conception du panel AC, le choix des fluorochromes, l'analyse des données) (82). Or, la variabilité inter-laboratoires est pour le moment trop importante et une étude prospective multicentrique doit être réalisée pour permettre une utilisation à plus grande ampleur de notre algorithme. De plus, pour appliquer ce dernier, cela nécessite d'utiliser des panels avec l'ensemble des anticorps présent dans notre algorithme. Or de nombreux laboratoires n'ont pas la possibilité d'obtenir certains anticorps. Par conséquent, pour le moment, notre algorithme ne peut être utilisé qu'au sein de l'institut universitaire du cancer de Toulouse (IUCT-O).

La CMF permet de donner des informations complémentaires sur le pronostic par l'intermédiaire des 3 marqueurs suivant le CD38, le CD49d et le ZAP70 (83) (84) (85). Nous nous sommes donc demandé si les différentes populations de CLL et aCLL retrouvées dans notre algorithme pouvaient avoir un

impact pronostic. Pour cela, nous avons analysé les populations entre elles pour savoir si elles avaient des marqueurs de plus ou moins bon pronostic. Nous avons récupéré des données correspondant à la présence d'une délétion ou d'une mutation TP53, au statut des IGHv, au taux de  $\beta$ 2-microglobuline et au stade clinique de Binet. Nous avons choisi en priorité ces 4 paramètres car ils font partis du score pronostic CLL-IPI réalisé sur une cohorte européenne de 3472 patients (83). De plus, nous avons aussi récupéré l'ensemble des données du caryotype pour analyser la répartition des patients avec une trisomie 12, une délétion 13q et/ou la présence d'un caryotype complexe. Aucun résultat ne permet de conclure à une différence significative. Cependant, de nombreuses données n'ont pas pu être récoltées. Il serait intéressant de refaire cette étude avec un plus grand nombre de patients atteints de CLL/aCLL et avec l'ensemble des données pour chaque patient.

## V. Conclusion

La CMF est largement utilisée dans le diagnostic des SLCP-B. Elle est un outil indispensable pour aiguiller de façon rapide et efficace le clinicien à partir d'un prélèvement sanguin, de moelle ou de tout autres liquides corporels. Elle permet, en effet, de confirmer la présence d'un clone dans un liquide de suspension cellulaire et, par l'intermédiaire d'un panel d'anticorps, d'orienter le type de SLPC-B. Notre objectif était de réaliser un algorithme décisionnel pour le diagnostic différentiel des SLPC-B à l'aide des marqueurs phénotypiques utilisés à IUCT-O.

A partir de notre cohorte de 532 patients, nous avons pu créer celui-ci à l'aide de courbes de ROC pour chaque population obtenue. En s'intéressant à la répartition des SLPC-B de notre cohorte, nous avons noté que la plupart des diagrammes circulaires finaux permettaient de bien séparer les différents SLPC-B.

Afin de valider notre algorithme, nous l'avons testé sur une cohorte de validation de 35 patients. Les résultats sont prometteurs car nous obtenons le bon diagnostic pour 31 des 35 patients. Il mériterait d'être utilisé sur une plus grande population.

Cet algorithme permet au biologiste d'apprécier la répartition des SLPC-B en fonction de l'expression des différents marqueurs. L'analyse de cette répartition lui permettra d'être plus pertinent dans son interprétation lors de la validation des immunophénotypes lymphocytaires. De plus, elle lui permettra de guider ses décisions pour choisir les marqueurs phénotypiques afin d'élaborer de nouveaux panels d'anticorps monoclonaux.

L'application de cet algorithme ne permet pas d'établir un diagnostic de certitude en raison de l'hétérogénéité phénotypique mais il peut permettre d'orienter de façon rapide le biologiste et le clinicien afin de guider les investigations supplémentaires à mener, souvent plus coûteuses et plus invasives (biopsie tissulaire, cytogénétique, biologie moléculaire).

Nous n'avons pas mis en évidence d'impact pronostic de notre algorithme pour les différentes populations de CLL/aCLL. Cependant de nombreuses données pronostics étaient manquantes pour comparer de manière fiable les populations. Il serait intéressant d'effectuer une étude complémentaire sur les différentes populations de CLL/aCLL pour observer si notre algorithme pourrait avoir un impact pronostic. Pour cela, il faudrait pour chaque patient récolter l'intégralité des données ayant un rôle dans le pronostic de la maladie.

1. Jaffe E, Harris N, Stein H, Isaacson P. Classification of lymphoid neoplasms: The microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 1 janv 2009;112:4384-99.
2. Tumors of the Hematopoietic System. Atlas of Tumor Pathology. *Ann Intern Med*. 1 sept 1967;67(3\_Part\_1):686.
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 1 sept 1994;84(5):1361-92.
4. Bruneau J, Canioni D, Jo Molina T. Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures : ce qui va changer dans la pratique quotidienne. *Rev Francoph Lab*. 1 janv 2017;2017(488):39-48.
5. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. avr 2005;5(4):251-62.
6. Louissaint - HARVARD MEDICAL SCHOOL.pdf [Internet]. [cité 20 avr 2020]. Disponible sur: <http://cpo-media.net/ECP/2019/Congress-Presentations/1191/-Unlicensed-ECP%202019%20Talk%20F.pdf>
7. Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, van Ommen GJ, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene*. déc 1991;6(12):2271-6.
8. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1 avr 1993;9(4):138-41.
9. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 19 2016;127(20):2375-90.
10. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 15 juin 2008;111(12):5446-56.
11. Le Guyader-Peyrou S, Defossez G, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Vol. 2. 2019. 169 p.
12. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 16 août 2011;20(2):246-59.
13. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. nov 2019;16(11):684-701.
14. Parikh SA, Kay NE, Shanafelt TD. How we treat Richter syndrome. *Blood*. 13 mars 2014;123(11):1647-57.
15. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 22 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/62-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-lymphoide/121-leucemie-lymphoide-chronique-llc>

16. Rawstron AC, Kreuzer K-A, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018;94(1):121-8.
17. Nguyen-Khac F, Borie C, Callet-Bauchu E, Eclache V, Struski S. Cytogenetics in the management of chronic lymphocytic leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* 1 oct 2016;74(5):561-7.
18. Campo E, Cymbalista F, Ghia P, Jäger U, Pospisilova S, Rosenquist R, et al. TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *Haematologica.* déc 2018;103(12):1956-68.
19. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 15 sept 1999;94(6):1848-54.
20. Tiacci E, Trifonov V, Schiavoni G, Holmes A, Kern W, Martelli MP, et al. BRAF MUTATIONS IN HAIRY CELL LEUKEMIA. *N Engl J Med.* 16 juin 2011;364(24):2305-15.
21. Falini B, Martelli MP, Tiacci E. BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside. *Blood.* 13 2016;128(15):1918-27.
22. Maitre E, Cornet E, Troussard X. Hairy cell leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(12):1413-22.
23. Troussard X, Cornet E. Hairy cell leukemia 2018: Update on diagnosis, risk-stratification, and treatment. *Am J Hematol.* déc 2017;92(12):1382-90.
24. Galton D a. G, Goldman JM, Wiltshaw E, Catovsky D, Henry K, Goldenberg GJ. Prolymphocytic Leukaemia. *Br J Haematol.* 1974;27(1):7-23.
25. Nguyen-Khac F. Leucémie prolymphocytaire B. *Rev Francoph Lab.* 1 févr 2006;2006(379):45-7.
26. Collignon A, Wanquet A, Maitre E, Cornet E, Troussard X, Aurrant-Schleinitz T. Prolymphocytic Leukemia: New Insights in Diagnosis and in Treatment. *Curr Oncol Rep.* avr 2017;19(4):29.
27. Lefebvre C, Callet-Bauchu E, Chapiro E, Nadal N, Penther D, Poirel H-A. Cytogenetics in the management of lymphomas and lymphoproliferative disorders in adults and children: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* 1 oct 2016;74(5):568-87.
28. Kay NE, Hanson CA. B-cell prolymphocytic leukemia has 3 subsets. *Blood.* 21 2019;134(21):1777-8.
29. Thieblemont C, Felman P, Callet-Bauchu E, Traverse-Glehen A, Salles G, Berger F, et al. Splenic marginal-zone lymphoma: a distinct clinical and pathological entity. *Lancet Oncol.* févr 2003;4(2):95-103.
30. Thieblemont C, Leblond V. Lymphomes de la zone marginale. EMC Elsevier Masson SAS Paris. 2008;13:16-A-31.

31. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet*. 9 nov 1991;338(8776):1175-6.
32. Thiede C, Wündisch T, Neubauer B. *Gastrointestinal Lymphoma: Future Perspectives*. 1<sup>re</sup> éd. Libgen Librarian; 2000. 145/147 p.
33. Luppi M, Longo G, Ferrari MG, Ferrara L, Marasca R, Barozzi P, et al. Additional neoplasms and HCV infection in low-grade lymphoma of MALT type. *Br J Haematol*. août 1996;94(2):373-5.
34. Schreuder MI, van den Brand M, Hebeda KM, Groenen PJTA, van Krieken JH, Scheijen B. Novel developments in the pathogenesis and diagnosis of extranodal marginal zone lymphoma. *J Hematop*. 25 sept 2017;10(3-4):91-107.
35. Xochelli A, Oscier D, Stamatopoulos K. Clonal B-cell lymphocytosis of marginal zone origin. *Best Pract Res Clin Haematol*. juin 2017;30(1-2):77-83.
36. Zucca E, Arcaini L, Buske C, et al. Marginal zone lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines. 2020;31(1):17-29.
37. Weisenburger DD, Kim H, Rappaport H. Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer*. 1 avr 1982;49(7):1429-38.
38. Puente XS, Jares P, Campo E. Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: crossroads of genetic and microenvironment interactions. *Blood*. 24 2018;131(21):2283-96.
39. Klener P. Advances in Molecular Biology and Targeted Therapy of Mantle Cell Lymphoma. *Int J Mol Sci*. janv 2019;20(18):4417.
40. Fernandez V, Salamero O, Espinet B, Solé F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and Gene Expression Profiling Defines Indolent Forms of Mantle Cell Lymphoma. *Cancer Res*. 15 févr 2010;70:1408-18.
41. Dreyling M, Campo E, Hermine O, Jerkeman M, Le Gouill S, Rule S, et al. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. juill 2017;28:iv62-71.
42. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 30 mars 2020]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/62-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-lymhoide/124-lymphomes-zone-marginale-tricho-variante-folliculaire-manteau-sezary-mycosis-fungoides-lymphocytose-a-lymphocytes-granuleux>
43. Staudt LM. A Closer Look at Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*. 15 févr 2007;356(7):741-2.
44. Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. *Epigenetics*. 20 janv 2017;12(5):370-7.
45. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, Salles G, Vitolo U, Ladetto M. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. sept 2016;27:v83-90.
46. Sapparapu G, Planque S, Mitsuda Y, McLean G, Nishiyama Y, Paul S. Constant Domain-regulated Antibody Catalysis. *J Biol Chem*. 19 oct 2012;287(43):36096-104.

47. Waldenström J. Incipient myelomatosis or «essential» hyperglobulinemia with fibrinogenopenia — a new syndrome? *Acta Med Scand.* 12 janv 1944;117(3-4):216-47.
48. Sahota SS, Forconi F, Ottensmeier CH, Provan D, Oscier DG, Hamblin TJ, et al. Typical Waldenstrom macroglobulinemia is derived from a B-cell arrested after cessation of somatic mutation but prior to isotype switch events. *Blood.* 15 août 2002;100(4):1505-7.
49. Ghobrial IM, Gertz MA, Fonseca R. Waldenström macroglobulinaemia. *Lancet Oncol.* nov 2003;4(11):679-85.
50. García-Sanz R, Jiménez C, Puig N, Paiva B, Gutiérrez NC, Rodríguez-Otero P, et al. Origin of Waldenstrom's macroglobulinaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2016;29(2):136-47.
51. Treon SP, Tripsas CK, Ciccarelli BT, Manning RJ, Patterson CJ, Sheehy P, et al. Patients With Waldenström Macroglobulinemia Commonly Present With Iron Deficiency and Those With Severely Depressed Transferrin Saturation Levels Show Response to Parenteral Iron Administration. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* avr 2013;13(2):241-3.
52. Poulain S, Wemeau M, Balkaran S, Hivert B, Hauteceur A, Rossignol J, et al. Macroglobulinémie de Waldenström. /data/revues/02488663/v31i5/S0248866310000901/ [Internet]. 7 mai 2010 [cité 8 avr 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/251186>
53. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1200710>. Massachusetts Medical Society; 2012 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1200710?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1200710?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)
54. Kastiris E, Leblond V, Dimopoulos MA, Kimby E, Staber P, Kersten MJ, et al. Waldenström's macroglobulinaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 01 2018;29(Suppl 4):iv41-50.
55. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature.* 3 févr 2000;403(6769):503-11.
56. Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94(5):604-16.
57. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 1 janv 2004;103(1):275-82.
58. Longobardi Givan A. *Flow Cytometry First Principles.* 2ème. Wiley-Liss; 2001. 292 p.
59. Matutes E, Catovsky D. The value of scoring systems for the diagnosis of biphenotypic leukemia and mature B-cell disorders. *Leuk Lymphoma.* 1994;13 Suppl 1:11-4.
60. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol.* oct 1997;108(4):378-82.

61. Garff-Tavernier ML, Costopoulos M, Merle-Béral H. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B. *Rev Francoph Lab.* 1 mai 2013;2013(452):37-48.
62. Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Houliham A, Meeus P, Catovsky D. The immunophenotype of hairy cell leukemia (HCL). Proposal for a scoring system to distinguish HCL from B-cell disorders with hairy or villous lymphocytes. *Leuk Lymphoma.* 1994;14 Suppl 1:57-61.
63. Stetler-Stevenson M, Tembhare PR. Diagnosis of hairy cell leukemia by flow cytometry. *Leuk Lymphoma.* juin 2011;52 Suppl 2:11-3.
64. Challagundla P, Medeiros LJ, Kanagal-Shamanna R, Miranda RN, Jorgensen JL. Differential Expression of CD200 in B-Cell Neoplasms by Flow Cytometry Can Assist in Diagnosis, Subclassification, and Bone Marrow Staging. *Am J Clin Pathol.* 1 déc 2014;142(6):837-44.
65. Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J, Klein B. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1 févr 2008;366(1):117-22.
66. Rygiel TP, Karnam G, Goverse G, van der Marel APJ, Greuter MJ, van Schaarenburg RA, et al. CD200-CD200R signaling suppresses anti-tumor responses independently of CD200 expression on the tumor. *Oncogene.* 14 juin 2012;31(24):2979-88.
67. Hojjat-Farsangi M, Moshfegh A, Daneshmanesh AH, Khan AS, Mikaelsson E, Osterborg A, et al. The receptor tyrosine kinase ROR1--an oncofetal antigen for targeted cancer therapy. *Semin Cancer Biol.* déc 2014;29:21-31.
68. Hojjat-Farsangi M, Daneshmanesh AH, Khan AS, Shetye J, Mozaffari F, Kharaziha P, et al. First-in-class oral small molecule inhibitor of the tyrosine kinase ROR1 (KAN0439834) induced significant apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia.* oct 2018;32(10):2291-5.
69. Miguet L, Lennon S, Baseggio L, Traverse-Glehen A, Berger F, Perrusson N, et al. Cell-surface expression of the TLR homolog CD180 in circulating cells from splenic and nodal marginal zone lymphomas. *Leukemia.* août 2013;27(8):1748-50.
70. Fayyad UM, Irani KB. On the handling of continuous-valued attributes in decision tree generation. *Mach Learn.* janv 1992;8(1):87-102.
71. Köhnke T, Wittmann VK, Bücklein VL, Lichtenegger F, Pasalic Z, Hiddemann W, et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. *Br J Haematol.* 2017;179(3):480-7.
72. Full Text PDF [Internet]. [cité 20 août 2020]. Disponible sur: <https://ashpublications.org/blood/article-pdf/111/8/3941/1299467/zh800808003941.pdf>
73. Debord C, Wuillème S, Eveillard M, Theisen O, Godon C, Bris YL, et al. Flow cytometry in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Int J Lab Hematol.* 2020;42(S1):113-20.
74. Saksena A, Miao Y, Lin P, Wang M, Yin CC, Li J, et al. CD5 Negative Mantle Cell Lymphoma: Clinicopathologic Correlations and Outcome in 58 Cases. *Blood.* 2 déc 2016;128(22):2964-2964.
75. Seegmiller AC, Hsi ED, Craig FE. The current role of clinical flow cytometry in the evaluation of mature B-cell neoplasms. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019;96(1):20-9.

76. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* mars 2014;86(2):98-105.
77. Desoukey NAE, Afify RAA, Amin DG, Mohammed RF. CD200 Expression in B-Cell Chronic Lymphoproliferative Disorders. *J Investig Med.* 1 janv 2012;60(1):56-61.
78. Salem DA, Scott D, McCoy CS, Liewehr DJ, Venzon DJ, Arons E, et al. Differential Expression of CD43, CD81, and CD200 in Classic Versus Variant Hairy Cell Leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019;96(4):275-82.
79. Daneshmanesh AH, Mikaelsson E, Jeddi-Tehrani M, Bayat AA, Ghods R, Ostadkarampour M, et al. Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy. *Int J Cancer.* 1 sept 2008;123(5):1190-5.
80. Barna G, Mihalik R, Timár B, Tömböl J, Csende Z, Sebestyén A, et al. ROR1 expression is not a unique marker of CLL. *Hematol Oncol.* mars 2011;29(1):17-21.
81. Mayeur-Rousse C, Guy J, Miguet L, Bouyer S, Geneviève F, Robillard N, et al. CD180 expression in B-cell lymphomas: A multicenter GEIL study. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016;90(5):462-6.
82. Solly F, Rigollet L, Baseggio L, Guy J, Borgeot J, Guérin E, et al. Comparable flow cytometry data can be obtained with two types of instruments, Canto II, and Navios. A GEIL study. *Cytometry A.* 2013;83(12):1066-72.
83. Dürig J, Naschar M, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia.* janv 2002;16(1):30-5.
84. CD49d shows superior performance characteristics for flow cytometric prognostic testing in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma [Internet]. [cité 29 août 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cyto.b.21384>
85. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood.* 15 juin 2003;101(12):4944-51.

## ANNEXE

### Annexe 2. Altérations génomiques dans le HCL, le HCL-V, le SDRPL et le SMZL (22)

	HCL	HCL-V	SDRPL	SMZL
<b>MAPK pathway</b>				
BRAF V600E	70% <sup>24</sup> -100% <sup>37,38,85</sup>	0% <sup>37,38,85</sup>	0% <sup>45,47</sup> -2% (G469A) <sup>43</sup>	0% <sup>85</sup> -2% <sup>43</sup>
MAP2K1 <sup>a</sup>	0% <sup>37,38,43</sup> -22% <sup>24</sup>	38% <sup>38</sup> -42% <sup>24</sup>	7%(VH4-34-) <sup>43</sup> -12% <sup>45</sup>	0% <sup>43</sup>
<b>Cell cycle</b>				
COKN1B (p27)	10% <sup>25,38</sup> -16% <sup>37</sup>	0% <sup>25,37,38</sup>	4% <sup>45</sup>	
CCND3	0% <sup>38</sup>	13% <sup>38</sup>	21% <sup>43</sup> -24% <sup>45</sup>	13% <sup>43</sup>
<b>NFKB pathway</b>				
MYD88	0% <sup>25,43</sup>		0% <sup>43</sup>	9% <sup>43</sup>
TNFAIP3	0% <sup>43</sup>		0% <sup>43</sup>	20% <sup>43</sup>
KLF2	13% <sup>43</sup> -15% <sup>25</sup> -16% <sup>42</sup>	0% <sup>25</sup>	2% <sup>43</sup> -4% <sup>45</sup>	20% <sup>42</sup> -30% <sup>43</sup>
<b>Spliceosome</b>				
U2AF1	0% <sup>24,38</sup>	13% <sup>24,38</sup>		
TP53	2% <sup>38</sup> -28% <sup>40</sup>	8% <sup>24</sup> -38% <sup>38</sup>	0% <sup>47</sup>	
<b>Notch pathway</b>				
NOTCH1	4% <sup>38</sup> -13% <sup>43</sup>	0% <sup>38</sup>	2% <sup>43</sup>	9% <sup>43</sup>
NOTCH2	0% <sup>25,43,87</sup> -4% <sup>38</sup>	0% <sup>38</sup>	10% <sup>43</sup>	17% <sup>43</sup> -25% <sup>87</sup>
<b>Epigenetic regulators</b>				
KMT2C (histone methyltransferase)	15% <sup>38</sup>	25% <sup>38</sup>		
ARID1A (SWI/SNF family)	4% <sup>24</sup> -5% <sup>25</sup>	4% <sup>24</sup>	8% <sup>45</sup>	
KDM6A (histone demethylase)	0% <sup>25</sup> -2% <sup>38</sup>	12.5% <sup>38</sup> -50% <sup>25</sup>	2% <sup>43</sup>	0% <sup>43</sup>
CBEBBP	5% <sup>25</sup> -6% <sup>38</sup>	12.5% <sup>38</sup> -25% <sup>25</sup>		
<b>TF repressor</b>				
BCOR	0% <sup>43</sup> -5% <sup>25</sup>	0% <sup>25</sup>	24% <sup>43</sup>	2% <sup>43</sup>

<sup>a</sup>MAP2K1 mutations in 6/7 VH4-34+ HCL patients and in 4/9 VH4-34+ HCL-V patients.<sup>24</sup>

**Annexe 3 : Analyse de la variance pour les marqueurs ROR1, CD180 et CD200**

<b>Table Analyzed</b>	<b>ROR1 MFI 2020</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	358,1		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Healthy Donors vs CLL	-374,3	Yes	***
Healthy Donors vs aCLL	-350,6	Yes	***
Healthy Donors vs MZL	-173,8	Yes	***
Healthy Donors vs MCL	-327,2	Yes	***
Healthy Donors vs LPL	-99,1	Yes	*
Healthy Donors vs HCL	-255,4	Yes	***
Healthy Donors vs FL	33,82	No	ns
Healthy Donors vs DLBCL	-171,5	Yes	***
CLL vs aCLL	23,7	No	ns
CLL vs MZL	200,5	Yes	***
CLL vs MCL	47,11	No	ns
CLL vs LPL	275,2	Yes	***
CLL vs HCL	118,9	Yes	**
CLL vs FL	408,1	Yes	***
CLL vs DLBCL	202,8	Yes	***
aCLL vs MZL	176,8	Yes	***
aCLL vs MCL	23,41	No	ns
aCLL vs LPL	251,5	Yes	***
aCLL vs HCL	95,21	No	ns
aCLL vs FL	384,4	Yes	***
aCLL vs DLBCL	179,1	Yes	***
MZL vs MCL	-153,4	Yes	***
MZL vs LPL	74,72	No	ns
MZL vs HCL	-81,59	No	ns
MZL vs FL	207,6	Yes	***
MZL vs DLBCL	2,284	No	ns
MCL vs LPL	228,1	Yes	***
MCL vs HCL	71,8	No	ns
MCL vs FL	361	Yes	***
MCL vs DLBCL	155,7	Yes	**
LPL vs HCL	-156,3	Yes	***
LPL vs FL	132,9	No	ns
LPL vs DLBCL	-72,43	No	ns
HCL vs FL	289,2	Yes	***
HCL vs DLBCL	83,88	No	ns
FL vs DLBCL	-205,4	Yes	**

<b>Table Analyzed</b>	<b>ROR1 %</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	330,8		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Healthy Donors vs CLL	-339,9	Yes	***
Healthy Donors vs aCLL	-343,1	Yes	***
Healthy Donors vs MZL	-159,5	Yes	***
Healthy Donors vs MCL	-273,8	Yes	***
Healthy Donors vs LPL	-72,18	No	ns
Healthy Donors vs HCL	-268	Yes	***
Healthy Donors vs FL	68,58	No	ns
Healthy Donors vs DLBCL	-107	No	ns
CLL vs aCLL	-3,227	No	ns
CLL vs MZL	180,4	Yes	***
CLL vs MCL	66,1	No	ns
CLL vs LPL	267,7	Yes	***
CLL vs HCL	71,91	No	ns
CLL vs FL	408,5	Yes	***
CLL vs DLBCL	232,8	Yes	***
aCLL vs MZL	183,6	Yes	***
aCLL vs MCL	69,32	No	ns
aCLL vs LPL	270,9	Yes	***
aCLL vs HCL	75,13	No	ns
aCLL vs FL	411,7	Yes	***
aCLL vs DLBCL	236,1	Yes	***
MZL vs MCL	-114,3	Yes	**
MZL vs LPL	87,29	Yes	*
MZL vs HCL	-108,5	Yes	*
MZL vs FL	228	Yes	***
MZL vs DLBCL	52,43	No	ns
MCL vs LPL	201,6	Yes	***
MCL vs HCL	5,81	No	ns
MCL vs FL	342,4	Yes	***
MCL vs DLBCL	166,7	Yes	**
LPL vs HCL	-195,8	Yes	***
LPL vs FL	140,8	No	ns
LPL vs DLBCL	-34,86	No	ns
HCL vs FL	336,5	Yes	***
HCL vs DLBCL	160,9	Yes	**
FL vs DLBCL	-175,6	Yes	*

<b>Table Analyzed</b>	<b>CD180 MFI</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	aussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	249,8		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Healthy Donors vs CLL	294	Yes	***
Healthy Donors vs aCLL	286	Yes	***
Healthy Donors vs MZL	154,2	Yes	***
Healthy Donors vs MCL	259,4	Yes	***
Healthy Donors vs LPL	283,6	Yes	***
Healthy Donors vs HCL	7,647	No	ns
Healthy Donors vs FL	196,2	Yes	***
Healthy Donors vs DLBCL	211,2	Yes	***
CLL vs aCLL	-7,986	No	ns
CLL vs MZL	-139,7	Yes	***
CLL vs MCL	-34,55	No	ns
CLL vs LPL	-10,34	No	ns
CLL vs HCL	-286,3	Yes	***
CLL vs FL	-97,79	No	ns
CLL vs DLBCL	-82,74	No	ns
aCLL vs MZL	-131,7	Yes	***
aCLL vs MCL	-26,56	No	ns
aCLL vs LPL	-2,356	No	ns
aCLL vs HCL	-278,3	Yes	***
aCLL vs FL	-89,8	No	ns
aCLL vs DLBCL	-74,75	No	ns
MZL vs MCL	105,2	Yes	*
MZL vs LPL	129,4	Yes	***
MZL vs HCL	-146,6	Yes	***
MZL vs FL	41,92	No	ns
MZL vs DLBCL	56,97	No	ns
MCL vs LPL	24,21	No	ns
MCL vs HCL	-251,8	Yes	***
MCL vs FL	-63,24	No	ns
MCL vs DLBCL	-48,19	No	ns
LPL vs HCL	-276	Yes	***
LPL vs FL	-87,44	No	ns
LPL vs DLBCL	-72,39	No	ns
HCL vs FL	188,5	Yes	**
HCL vs DLBCL	203,6	Yes	***
FL vs DLBCL	15,05	No	ns

<b>Table Analyzed</b>	<b>CD180 %</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	188		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Healthy Donors vs CLL	258,8	Yes	***
Healthy Donors vs aCLL	245,4	Yes	***
Healthy Donors vs MZL	143,7	Yes	***
Healthy Donors vs MCL	232	Yes	***
Healthy Donors vs LPL	260,4	Yes	***
Healthy Donors vs HCL	28,4	No	ns
Healthy Donors vs FL	178,8	Yes	**
Healthy Donors vs DLBCL	214,9	Yes	***
CLL vs aCLL	-13,43	No	ns
CLL vs MZL	-115,1	Yes	***
CLL vs MCL	-26,8	No	ns
CLL vs LPL	1,605	No	ns
CLL vs HCL	-230,4	Yes	***
CLL vs FL	-80,01	No	ns
CLL vs DLBCL	-43,83	No	ns
aCLL vs MZL	-101,6	Yes	*
aCLL vs MCL	-13,38	No	ns
aCLL vs LPL	15,03	No	ns
aCLL vs HCL	-217	Yes	***
aCLL vs FL	-66,59	No	ns
aCLL vs DLBCL	-30,4	No	ns
MZL vs MCL	88,25	No	ns
MZL vs LPL	116,7	Yes	***
MZL vs HCL	-115,3	Yes	**
MZL vs FL	35,04	No	ns
MZL vs DLBCL	71,22	No	ns
MCL vs LPL	28,41	No	ns
MCL vs HCL	-203,6	Yes	***
MCL vs FL	-53,21	No	ns
MCL vs DLBCL	-17,02	No	ns
LPL vs HCL	-232	Yes	***
LPL vs FL	-81,62	No	ns
LPL vs DLBCL	-45,43	No	ns
HCL vs FL	150,4	No	ns
HCL vs DLBCL	186,6	Yes	***
FL vs DLBCL	36,19	No	ns

<b>Table Analyzed</b>	<b>CD200 MFI 2020</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	287,4		
<b>Dunn's Multiple Comparison Test</b>	<b>Difference in rank sum</b>	<b>Significant? P &lt; 0.05?</b>	<b>Summary</b>
Healthy Donors vs CLL	-88,76	Yes	*
Healthy Donors vs aCLL	-121,8	Yes	***
Healthy Donors vs MZL	89,55	Yes	*
Healthy Donors vs MCL	252,2	Yes	***
Healthy Donors vs LPL	109,6	Yes	**
Healthy Donors vs HCL	-209,5	Yes	***
Healthy Donors vs FL	131,4	No	ns
Healthy Donors vs DLBCL	76,36	No	ns
CLL vs aCLL	-33,04	No	ns
CLL vs MZL	178,3	Yes	***
CLL vs MCL	340,9	Yes	***
CLL vs LPL	198,4	Yes	***
CLL vs HCL	-120,8	Yes	**
CLL vs FL	220,1	Yes	***
CLL vs DLBCL	165,1	Yes	***
aCLL vs MZL	211,3	Yes	***
aCLL vs MCL	374	Yes	***
aCLL vs LPL	231,4	Yes	***
aCLL vs HCL	-87,72	No	ns
aCLL vs FL	253,2	Yes	***
aCLL vs DLBCL	198,2	Yes	***
MZL vs MCL	162,6	Yes	***
MZL vs LPL	20,08	No	ns
MZL vs HCL	-299,1	Yes	***
MZL vs FL	41,84	No	ns
MZL vs DLBCL	-13,19	No	ns
MCL vs LPL	-142,6	Yes	***
MCL vs HCL	-461,7	Yes	***
MCL vs FL	-120,8	No	ns
MCL vs DLBCL	-175,8	Yes	***
LPL vs HCL	-319,1	Yes	***
LPL vs FL	21,76	No	ns
LPL vs DLBCL	-33,26	No	ns
HCL vs FL	340,9	Yes	***
HCL vs DLBCL	285,9	Yes	***
FL vs DLBCL	-55,02	No	ns

<b>Table Analyzed</b>	<b>CD200 %</b>		
Kruskal-Wallis test			
P value	P<0.0001		
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation		
P value summary	***		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)	Yes		
Number of groups	9		
Kruskal-Wallis statistic	197,4		
Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
Healthy Donors vs CLL	-95,68	Yes	**
Healthy Donors vs aCLL	-107	Yes	**
Healthy Donors vs MZL	45,5	No	ns
Healthy Donors vs MCL	247,8	Yes	***
Healthy Donors vs LPL	92,84	Yes	*
Healthy Donors vs HCL	-76,79	No	ns
Healthy Donors vs FL	95,02	No	ns
Healthy Donors vs DLBCL	100,4	No	ns
CLL vs aCLL	-11,37	No	ns
CLL vs MZL	141,2	Yes	***
CLL vs MCL	343,5	Yes	***
CLL vs LPL	188,5	Yes	***
CLL vs HCL	18,89	No	ns
CLL vs FL	190,7	Yes	***
CLL vs DLBCL	196,1	Yes	***
aCLL vs MZL	152,5	Yes	***
aCLL vs MCL	354,9	Yes	***
aCLL vs LPL	199,9	Yes	***
aCLL vs HCL	30,26	No	ns
aCLL vs FL	202,1	Yes	***
aCLL vs DLBCL	207,5	Yes	***
MZL vs MCL	202,3	Yes	***
MZL vs LPL	47,35	No	ns
MZL vs HCL	-122,3	Yes	**
MZL vs FL	49,52	No	ns
MZL vs DLBCL	54,92	No	ns
MCL vs LPL	-155	Yes	***
MCL vs HCL	-324,6	Yes	***
MCL vs FL	-152,8	No	ns
MCL vs DLBCL	-147,4	Yes	**
LPL vs HCL	-169,6	Yes	***
LPL vs FL	2,175	No	ns
LPL vs DLBCL	7,572	No	ns
HCL vs FL	171,8	Yes	*
HCL vs DLBCL	177,2	Yes	***
FL vs DLBCL	5,397	No	ns

## **MISE EN PLACE D'UN ALGORITHME DECISIONNEL POUR LE DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL, PAR CYTOMETRIE DE FLUX, DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS CHRONIQUES-B**

---

La cytométrie de flux (CMF) est un outil indispensable et est largement utilisée pour étayer le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B). Notre objectif est d'établir un algorithme décisionnel pour le diagnostic différentiel des SLPC-B à l'aide de marqueurs phénotypiques utilisés au sein de l'institut universitaire du cancer de Toulouse (IUCT-O). A partir de notre cohorte de 532 patients étalés sur la période de 2016 à 2019, nous avons par l'intermédiaire de courbe de ROC évalué les marqueurs les plus intéressants à utiliser pour discriminer les différents lymphomes. La réalisation de cet algorithme a permis d'apprécier la répartition des SLPC-B en fonction des marqueurs phénotypiques utilisés. Il permettra d'aider le biologiste dans son interprétation de l'immunophénotypage lymphocytaire afin d'orienter le clinicien et de mettre en avant les marqueurs les plus pertinents et les plus judicieux à choisir dans les panels d'anticorps dans un but d'harmonisation des techniques de laboratoires.

---

Flow cytometry (CMF) is a fundamental and widely used tool for supporting the diagnosis of chronic Lymphoproliferative disorders B (SLPC-B). Our goal is to develop a decision algorithm for the differential diagnosis of SLPC-B by using phenotype markers, at the Cancer University Institute of Toulouse (IUCT-O). Within our cohort of 532 patients extending from 2016 to 2019, we evaluated, via the ROC curve, the most interesting markers to use in order to discriminate the different lymphomas. The implementation of this algorithm allowed to classify SLPC-B as a function of the phenotype markers used. It will allow to support biologists in their interpretation of lymphocyte immunophenotyping, in order to guide clinicians and highlight the most pertinent and appropriate markers to select among the antibody panels, with the purpose of harmonizing laboratory techniques.

---

**DISCIPLINE administrative** : Pharmacie – Biologie médicale

---

**MOTS-CLES** : Syndromes lymphoprolifératifs chroniques B, Cytométrie de flux, Immunophénotypage lymphocytaire, Algorithme décisionnel.

---

Université Toulouse III - Paul Sabatier - Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
35 chemin des maraîchers  
31062 Toulouse Cedex 4

**Directeur de thèse** : Monsieur le Docteur François VERGEZ