



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Les immunoglobulines de surface et intracytoplasmiques par cytométrie par flux: application à la détection précoce de pathologies lymphoïdes chroniques B

Delestienne, Laurence

*Award date:*  
1992

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix  
FACULTE DES SCIENCES  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Tél. 081/72.41.11 - Télex 59222 Facnam-b - Téléfax 081/72.44.20

## **Les immunoglobulines de surface et intracytoplasmiques par cytométrie de flux. Application à la détection précoce des pathologies lymphoïdes chroniques B.**

DELESTIENNE Laurence

### Résumé

L'analyse immunophénotypique des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B par cytofluorimétrie est particulièrement intéressante. Cependant le phénotype lymphocytaire est confronté à un problème : les cellules pathologiques n'expriment qu'en faible quantité certains antigènes de surface. Dès lors, le marquage de ces antigènes par des anticorps monoclonaux est faible et les profils de fluorescence ne montrent pas toujours de pics bien définis.

La technique de marquage indirect, amplifiant les signaux de fluorescence trouve une application judicieuse dans l'étude des syndromes lymphoprolifératifs (surtout LLC).

L'amélioration des profils de fluorescence obtenus grâce à un réactif non conjugué (CD20, CD19) permet de discriminer davantage la population B pathologique. De plus, un double marquage associant ce même réactif non conjugué à un réactif reconnaissant les immunoglobulines de surface permet d'objectiver plus facilement le caractère monoclonal des éléments B pathologiques. L'étude des immunoglobulines intracytoplasmiques, après perméabilisation à la saponine, semble en outre intéressante pour confirmer le caractère monoclonal des cellules.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)  
Décembre 1992

Promoteur : P. DEVOS

Co-promoteurs : J-P. DINANT & P. FRANCOIS

*J'adresse mes plus vifs remerciements au Révérend Père DEVOS d'avoir accepté de promouvoir ce mémoire et à monsieur DINANT de m'avoir accueillie dans son laboratoire du centre hospitalier de la Basse-Sambre (Auvelais).*

*J'exprime ma profonde gratitude à monsieur FRANCOIS pour la patience et la fermeté avec lesquelles il a su me guider dans mon travail et me faire partager ses connaissances.*

*Je remercie tout particulièrement Isabelle PIERARD pour son aide précieuse et spontanée.*

*Je tiens également à remercier les membres du laboratoire d'hématologie d'Auvelais pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité.*

*Mes remerciements vont aussi à Chantal GREGOIRE et Pascal DEBAUCHE pour la dactylographie et mise en page du mémoire.*

*C'est du fond du coeur que je remercie mes parents, mon frère Luc, Henry, Bernard pour leur présence et leur soutien.*

## Table des matières

I. Introduction	1
I.1. Physiologie de la lymphopoïèse de la lignée B.	2
I.1.1. Description générale.	2
I.1.2. Réarrangement séquentiel des gènes d'immunoglobulines	4
I.1.3. Le lymphocyte B.	6
I.1.4. Fonction des lymphocytes B	7
I.2. Phénotypage immunologique de la lignée B.	9
I.2.1. Définition des classes de différenciation (CD)	9
I.2.2. Description des principaux marqueurs B.	10
I.3. Notion de monoclonalité.	12
I.4. Syndromes lymphoprolifératifs chroniques de la lignée B.	14
I.4.1. Différenciation et maturation des cellules B au cours des syndromes lymphoprolifératifs B.	14
I.4.2. Syndromes lymphoprolifératifs B les plus fréquents.	14
I.4.2.1. La leucémie lymphoïde chronique (LLC)	14
I.4.2.2. Le myélome multiple (MM).	16
I.4.2.3. La macroglobulinémie de Waldenström.	18
I.4.2.4. Les lymphomes malins non Hodgkiniens (LMNH)	20
I.4.2.5. Intérêt de l'étude des lymphocytes dans l'étude des syndromes lymphoprolifératifs B.	22
I.5. But du travail.	24
II. Matériel et Méthodes	25
II.1. Matériel.	25
II.2. Méthodes.	28
II.2.1. La cytofluorimétrie.	28
II.2.2. Concentré de cellules mononucléées à partir d'un échantillon sanguin.	32
II.2.3. Microscopie à fluorescence.	34
II.2.4. Mise en évidence des lymphocytes B.	35
II.2.5. Méthodes de détection des immunoglobulines de surface et intracytoplasmiques.	35
II.2.5.1. Les immunoglobulines de surface.	35
II.2.5.2. Les immunoglobulines intracytoplasmiques.	38
III. Résultats	40
III.1. Application de la méthode classique de mise en évidence des lymphocytes B.	40
III.1.1. Méthode de marquage direct.	40
III.1.2. Méthode de marquage indirect.	42

III.2. Les immunoglobulines de surface.	44
III.2.1. Les immunoglobulines cytophiliques.	44
III.2.1.1. Le tampon phosphate de préincubation.	45
III.2.1.2. Influence de la préincubation à 37°C.	45
III.2.2. L'effet Capping.	47
III.2.2.1. Le choix du tampon phosphate.	47
III.2.2.2. La température.	49
III.2.3. Intérêt de travailler sur un concentré lymphocytaire.	50
III.2.4. Standardisation du nombre de cellules.	51
III.2.5. Type de marquage.	52
III.2.5.1. Le simple marquage : direct ou indirect.	52
III.2.5.2. Le double marquage.	53
III.2.5.2.1. Les individus sains.	53
III.2.5.2.2. Les individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif.	53
III.2.5.3. Précautions à prendre lors du double marquage.	54
III.2.6. Méthode personnelle utilisée dans la mise en évidence des immunoglobulines de surface (Chaîne lourde, Kappa, Lambda).	56
III.3. Les immunoglobulines intracytoplasmiques.	56
III.3.1. Essai des différentes méthodes décrites dans la littérature.	57
III.3.1.1. Méthode au KCl/Méthanol, formaldéhyde/acétone, éthanol-acide acétique/formaldéhyde/acétone.	57
III.3.1.2. Méthode à la lysolécithine.	58
III.3.1.3. Méthode à la saponine/paraformaldéhyde.	59
III.3.2. Mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques par la CFM et par la microscopie à fluorescence.	61
III.3.3. Conclusion.	61
IV. Applications et discussions.	62
V. Illustrations.	65
VI. Conclusion générale	69
VII. Bibliographie.	

# I. INTRODUCTION

Le terme "hémopathies lymphoïdes" recouvre l'ensemble des proliférations malignes (monoclonales) de l'une des composantes cellulaires du système lymphoïde.

Les hémopathies lymphoïdes B sont les plus fréquentes des hémopathies lymphoïdes chroniques dans les pays occidentaux.

La cytométrie en flux a largement contribué à affiner les moyens d'investigation des cellules du système immunitaire, notamment en ce qui concerne leur nature et leurs fonctions. Son développement est parallèle à celui des anticorps monoclonaux, utilisés à grande échelle dans l'analyse de la distribution des marqueurs cellulaires de diverses populations.

Le phénotypage lymphocytaire permet de montrer la présence d'une population lymphoïde monotypique. Dans le cas d'hémopathies lymphoïdes chroniques, le phénotypage complète utilement les données cliniques, cytologiques et histopathologiques.

Les techniques d'étude des marqueurs de surface et intracytoplasmiques des lymphocytes ont permis une approche nouvelle de l'examen cytologique dans le cadre de l'étude des maladies lymphoprolifératives.

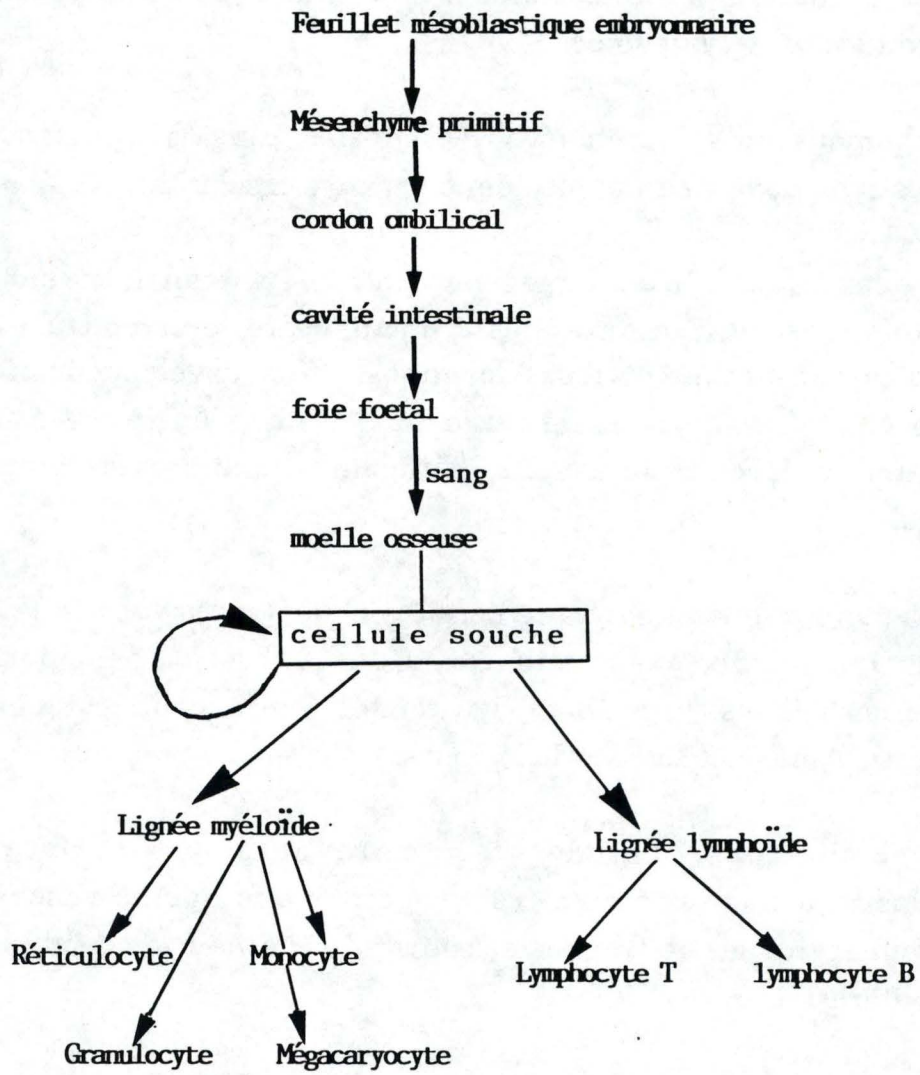


Fig.1.1. : Hématopoïèse des cellules sanguines

## **I.1. PHYSIOLOGIE DE LA LYMPHOPOÏESE DE LA LIGNEE B**

### **I.1.1. Description générale**

L'hématopoïèse débute dans le sac vitellin précoce, se poursuit au cours de l'embryogenèse dans le foie foetal et ensuite, tout au long de la vie, dans la moelle osseuse. La cellule souche hématopoïétique est pluripotente et peut coloniser d'autres organes et s'autorenouveler. Les cellules souches se différencient dans un microenvironnement cellulaire particulier où des facteurs de croissance jouent un rôle essentiel.

Les précurseurs des lymphocytes B sont localisés dans des flots de cellules hématopoïétiques du foie foetal dès la huitième, neuvième semaine de gestation chez l'homme. La production des lymphocytes B se poursuit ensuite au niveau de la moelle osseuse (Fig. 1.1.).

Les cellules souches médullaires représentent moins d'un pourmille du nombre total d'éléments. La moelle osseuse produit le microenvironnement pour la différenciation des cellules B. A partir de la cellule souche, une amplification par division cellulaire est contrôlée par les cytokines : granulocyte/macrophage colony stimulating factor (G/M CSF), l'interleukine 1 (IL1) et l'interleukine 6 (IL6) influencent probablement la survie cellulaire et la réplication en précurseur "early". L'interleukine 7 (IL7), produite par des cellules spécialisées de la moelle osseuse, est un facteur important : son action majeure est de favoriser les stades précoces de la lymphopoïèse résultant en une augmentation du nombre de lymphocytes B périphériques (qu'ils soient circulants ou localisés dans les organes lymphoïdes secondaires). Un phénomène important va intervenir dans la suite de la différenciation : le réarrangement des gènes (cfr § 1.1.2).



CELLULE SOUCHE HEMATOPOIETIQUE



CELLULE SOUCHE LYMPHOIDE



PRECURSEUR "EARLY" DE LA LIGNEE B



CELLULE PRE-PRE B (large) PRECOCE



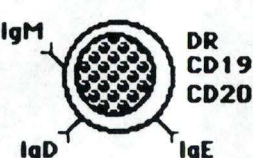
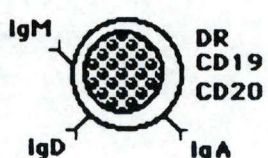
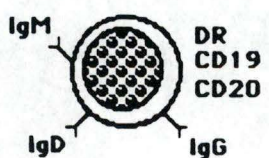
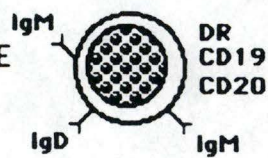
CELLULE PRE B (small)



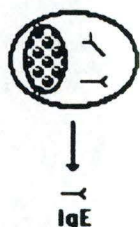
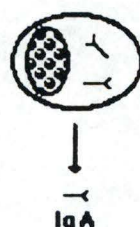
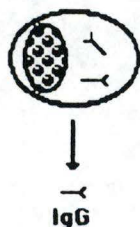
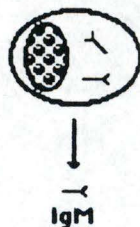
LYMPHOCYTE B IMMATURE (cellule B nouvellement formée)



LYMPHOCYTE B MATURE



PLASMOCYTE



M O D E L L E O S S E U S E

P E R I P H E R I E

**Légende:** TdT= Terminal-Déoxynucléotidyl-Transférase  
 VD-JH= réarrangement des gènes  
 mu=μ = Chaîne lourde des Ig  
 DR= antigène associé à la classe II du M.C.H.  
 CD19,CD20,CD34= clusters de différenciation-marqueurs B  
 IgM,IgG... = immunoglobulines complètes

Après réarrangement des gènes au stade "early", les lymphocytes pré-pré B et pré B précoces en division rapide contiennent des chaînes lourdes  $\mu$  mais pas encore de chaînes légères, celles-ci seront exprimées ultérieurement : les lymphocytes B immatures expriment alors le récepteur de surface spécifique, une IgM insérée dans la membrane plasmique. Au cours de l'étape suivante de la différenciation (lymphocyte B mature), la classe de l'anticorps qui sera finalement sécrétée par la cellule est définie ; la cellule présente alors à la surface soit des IgM, des IgA, des IgG, des IgE associés à des IgD de surface. Le lymphocyte B mature est fonctionnellement apte à être activé par l'antigène. Après une stimulation antigénique, les IgD disparaissent et sont dès lors absents de la surface des lymphocytes B mémoires. Lors des étapes finales de différenciation d'un plasmocyte, les immunoglobulines de surface disparaissent (seules les immunoglobulines cytoplasmiques sont présentes).

### **L1.2. Réarrangements séquentiels des gènes d'immunoglobulines**

Les gènes codants pour les chaînes lourdes et légères sont respectivement présents sur des chromosomes différents : les gènes des chaînes lourdes sur le chromosome 14, les gènes des chaînes légères Kappa sur le chromosome 2, et les gènes des chaînes légères Lambda sur le chromosome 22. Sur un même chromosome codant pour une chaîne H (lourde) ou L (légère), sont situés des centaines de segments de gènes dispersés qui peuvent présenter des millions de combinaisons différentes. Pour chaque type de chaînes lourdes ou légères, existent des gènes codants pour la partie variable, les plus nombreux, et des gènes codants pour la partie constante. Des gènes particuliers assurent la liaison entre des gènes codants pour la partie variable et ceux codants pour la partie constante, il s'agit des segments D (comme diversité) pour les chaînes lourdes, et les segments J (comme jonction) pour les chaînes lourdes et légères.

A partir de l'ADN des cellules germinales, où sur le chromosome, existent toutes les possibilités ( entre 20 et 50 gènes VL différents pour la chaîne Kappa, entre 90 et 300 gènes VL différents pour la chaîne Lambda, environ 300 gènes différents pour le gène VH), un réarrangement se

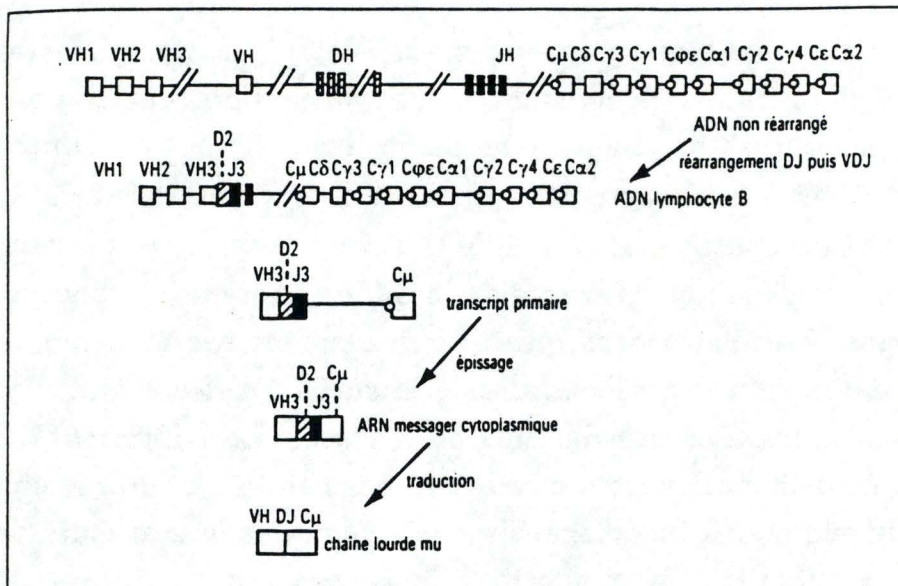


Fig. 1.2. : Organisation simplifiée des chaînes lourdes

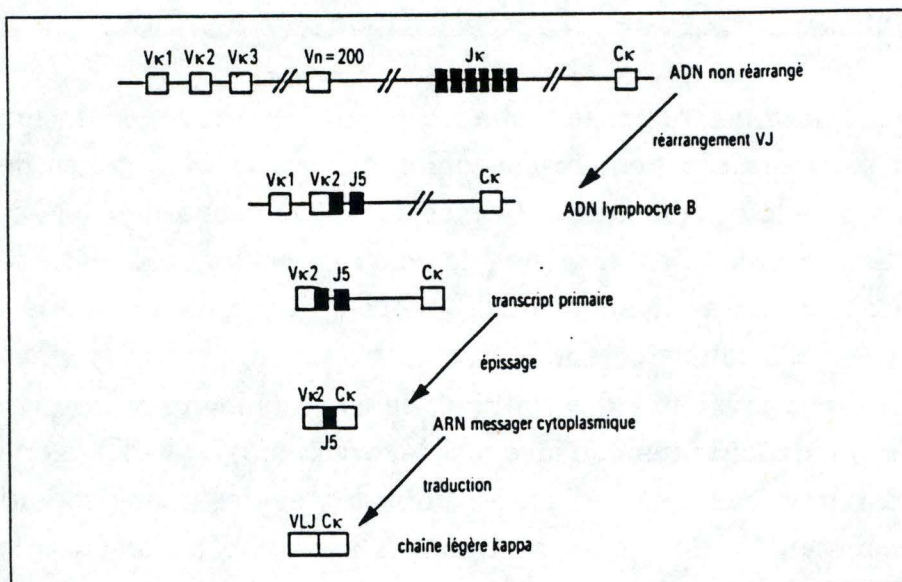


Fig.1.3. : Organisation simplifiée des chaînes légères Kappa

produit dès l'amorce de la maturation du lymphocyte B. Il permet, pour une chaîne légère, l'association d'un gène VL et d'un gène CL reliés par un gène de jonction JL et, pour une chaîne lourde, l'association d'un gène VH à un gène CH reliés par un gène J et un gène D. La diversité des anticorps dépend de la combinaison au hasard des segments géniques VDJ et de l'association des chaînes lourdes et légères ( cfr. Fig 1.2 et 1.3).

Le réarrangement VDJ se fait sur un chromosome et bloque le phénomène sur le chromosome homologue, expliquant le phénomène d'exclusion allélique, c'est-à-dire la présence d'un seul allotype sur une immunoglobuline d'un individu hétérozygote : lors de la différenciation des lymphocytes B, le réarrangement des chaînes légères commence par la région Kappa. Si le premier réarrangement du gène Kappa situé sur l'un des chromosomes aboutit à la production d'un gène non fonctionnel, la seconde copie du gène présente sur l'autre chromosome amorce son réarrangement. Si ces deux événements sont non productifs, la recombinaison commence alors au locus Lambda. Des mécanismes similaires permettent la formation d'un gène fonctionnel de chaîne lourde. Lorsque ces événements ont permis la production d'un anticorps, un mécanisme interdit toute recombinaison ultérieure. La nature du site de fixation de l'antigène est donc définitivement fixée pour la durée de vie de la cellule. L'exclusion allélique explique qu'un lymphocyte B secrète un anticorps d'une seule et même spécificité, caractérisée en outre, par un seul type de chaîne légère.

Ce phénomène de réarrangement intervient au cours de l'ontogenèse, avant le stade de cellules "pré-B". Normalement, le réarrangement se fait au hasard et l'immense variété des possibilités aboutit à la formation de nombreuses classes de lymphocytes B différents.

Une seconde série d'événements de recombinaison va intervenir : elle n'implique que la région constante des chaînes lourdes. Ces réarrangements n'affectent pas la région variable ni le site de fixation de l'antigène. Ils ne contribuent donc pas à la diversité du répertoire, mais permettent le remplacement d'une région constante de chaînes lourdes par une autre. Ce réarrangement se produit en aval de la région J. En cette région, l'ADN germinale contient tous les gènes codants pour les régions constantes des chaînes lourdes : chaînes  $\mu$  (IgM),  $\delta$  (IgD),  $\gamma_3$  (IgG<sub>3</sub>),  $\gamma_1$  (IgG<sub>1</sub>),  $\gamma_{2b}$  (IgG<sub>2b</sub>),  $\gamma_{2a}$  (IgG<sub>2a</sub>),  $\epsilon$  (IgE) et  $\alpha$  (IgA). En pratique,

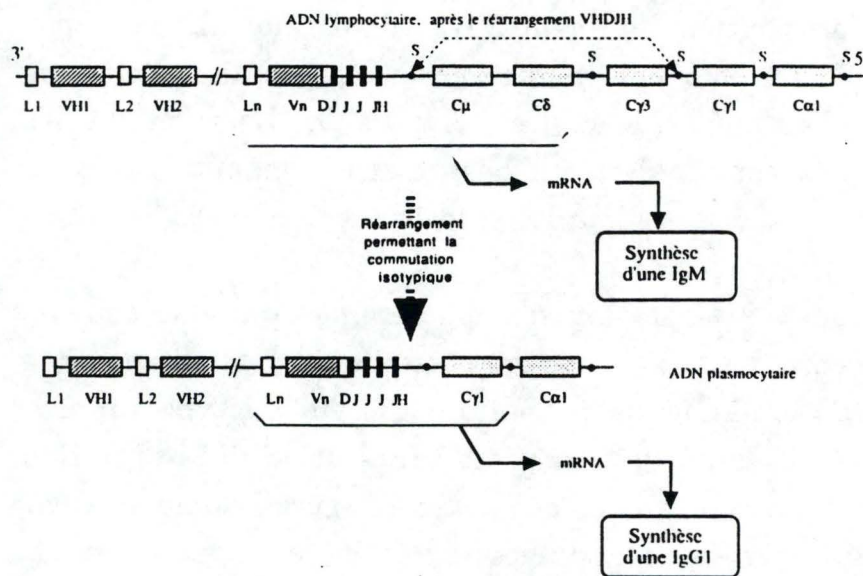


Fig.1.4. : Schéma du mécanisme permettant la commutation isotypique des chaînes lourdes des immunoglobulines.

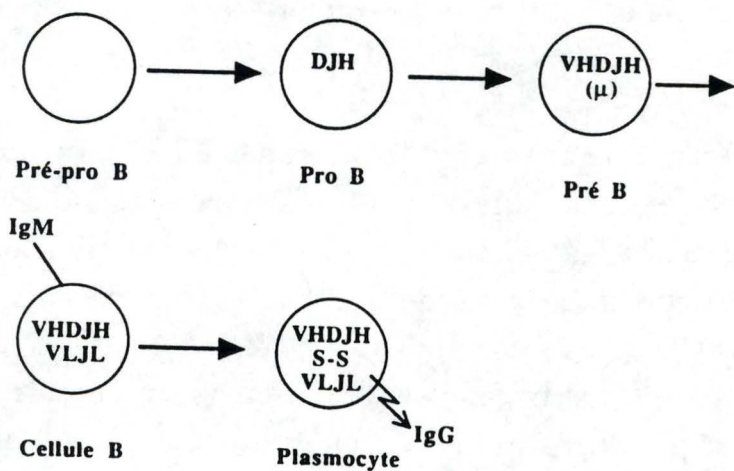


Fig.1.5. : Etapes de la maturation des cellules B.

Les lettres dans chaque cercle indiquent les différents réarrangements des gènes

S-S : commutation isotypique

ces réarrangements permettent d'avoir un même site de fixation de l'antigène sur des anticorps de classes ou sous-classes différentes. C'est la commutation de classes qui est l'un des événements caractéristiques de la maturation de la réponse anticorps (cfr. Fig. 1.4 et 1.5).

L'étude des réarrangements et l'expression des gènes d'immunoglobulines apportent la démonstration de la monoclonalité éventuelle d'une prolifération.

### **1.1.3. Le lymphocyte B**

- Les lymphocytes B ont une taille de  $8\mu$  environ (parfois jusque 10-12  $\mu$ )
- Le noyau est généralement arrondi et légèrement excentré
- La chromatine nucléaire est très condensée.
- Le rapport nucléo-cytoplasmique est élevé
- L'activation des lymphocytes B s'accompagne de modifications morphologiques importantes qui rendent compte de l'amplification et de la maturation de ces éléments : cellules blastiques caractérisées par un cytoplasme basophile et une chromatine nucléaire fine. Le stade ultime de cette activation, correspond à des plasmocytes dont le cytoplasme est hyperbasophile et dont le réticulum endoplasmique est fort développé en raison de l'activité de biosynthèse et de l'activité sécrétoire importante.
- Les cellules B présentent à leur surface des immunoglobulines ainsi que d'autres glycoprotéines. Des anticorps monoclonaux préparés chez la souris reconnaissent les protéines de surface des cellules humaines, ceux-ci peuvent être utilisés à des fins expérimentales et cliniques. Par exemple, les structures correspondant aux CD 19, CD 20, CD 21, CD 22 (classes d'anticorps déterminés) sont exprimés spécifiquement sur les lymphocytes B et peuvent être reconnus par des anticorps monoclonaux dans le cadre de l'étude de l'immunité cellulaire ou de la pathologie lymphoïde B.
- Les lymphocytes B matures quittent la moelle, via le sang, pour aller coloniser secondairement les organes lymphoïdes périphériques, les ganglions, la rate et le tissu lymphoïde annexé

aux muqueuses où ils exercent leur fonction lors de stimulation antigénique.

- Les lymphocytes B représentent en moyenne 5 à 10 % des lymphocytes circulants chez l'adulte sain et peuvent atteindre 15 % chez l'enfant en bas âge.
- En pathologie humaine, on décrit des syndromes lymphoprolifératifs caractérisés par des lymphocytes quasiment morphologiquement normaux mais où leur nombre est considérablement modifié. Une variété de néoplasmes résulte d'une croissance anormale de cellules B. Ces maladies peuvent être caractérisées par le stade de développement de la cellule transformée. Par exemple, la leucémie aiguë lymphoblastique est une maladie infantile du stade pré-B; la leucémie lymphoblastique chronique et quelques lymphomes impliquent des lymphocytes B surtout matures; dans les myélomes on retrouve des cellules plasmocytaires.

D'autre part, il existe des pathologies caractérisées par des anomalies fonctionnelles des lymphocytes B. Ces maladies peuvent être classées en deux types :

- celles où les lymphocytes B sont absents (1)
- celles où les lymphocytes B sont présents mais non fonctionnels (2).

(1) exemple : BRUTON'S syndrome : le développement du lymphocyte B est bloqué au stade pré-B. Il y a un taux normal de cellules  $\mu$  cytoplasmiques positives dans la moelle osseuse mais il y a absence de cellules B portant des  $SIg^+$ . Les malades du Bruton's syndrome atteints sont très sensibles à des affections bactériennes.

(2) exemple : WISKOTT-ALDRICH syndrome

#### **1.1.4. Fonction des lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont les agents responsables de l'immunité humorale : c'est l'un des mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire, qui aboutit à la production d'immunoglobulines, glycoprotéines douées de propriétés anticorps, c'est-à-dire capables de se lier spécifiquement à l'antigène et d'en faciliter l'élimination. Les

lymphocytes B sont les seules cellules sanguines capables de produire des anticorps et de les exprimer en surface.

Ces caractéristiques sont la résultante des phénomènes observés au cours de l'ontogenèse (processus de différenciation des lymphocytes B). A partir d'une cellule précurseur des lymphocytes B, se différencie une cellule dite "pré-B" où l'immunoglobuline intracytoplasmique peut être mise en évidence. Il s'agit d'abord de chaînes lourdes  $\mu$  puis des IgM complètes et par la suite d'IgD. La différenciation de la cellule "pré-B" aboutit au lymphocyte B porteur d'immunoglobulines de surface et, secondairement, lors d'une activation par l'antigène aux plasmocytes avec la présence d'immunoglobulines secrétées.

Les lymphocytes B ont deux fonctions principales : ces deux fonctions utilisent les immunoglobulines de surface:

- A) En présence d'un antigène thymo-indépendant, le lymphocyte B reconnaît l'antigène grâce à ses immunoglobulines de surface. Cette reconnaissance initie des processus de prolifération et de différenciation qui engagent le lymphocyte B mature dans deux directions :
- sécrétion d'anticorps par le biais de plasmocytes : forme ultime et sécrétoire de la différenciation
  - l'état de lymphocyte B mémoire

Le signal de transduction n'est pas encore tout à fait connu. Mais on sait qu'une anti-IgM initie la cascade de transitions des inositols phosphates, via la protéine G, la phosphodiesterase est activée, ce qui provoque la formation de inositol triphosphates ( $IP_3$ ) et du diacylglycérole (DAG). Ceci entraîne la mobilisation du  $Ca^{++}$  et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Le lymphocyte B entre en phase  $G_1$ .

Dans la voie de sécrétion d'anticorps, le premier stade est celui du lymphocyte B mature sécréteur d'IgM. Ce lymphocyte peut réarranger ses gènes de chaînes lourdes et devenir un lymphocyte sécréteur d'IgG, A ou E. Ces lymphocytes sécréteurs d'IgG peuvent encore se multiplier plusieurs fois. Leur stade de différenciation finale est le plasmocyte (qui ne se divise plus et qui secrète de grandes quantités d'immunoglobulines, grâce au développement de son système ribosomal et golgi). Les



lymphocytes B mémoires peuvent porter à leur surface des IgM, D, G, E et A. Contrairement aux autres stades de différenciation, les lymphocytes B mémoires sont circulants, leur durée de vie peut atteindre plusieurs années. Lors d'un contact ultérieur avec l'antigène, ces lymphocytes B mémoires pourront devenir sécréteurs d'immunoglobulines.

B) Lors de la rencontre avec un antigène thymo-dépendant, l'action auxiliaire de lymphocytes T, capables de reconnaître les déterminants antigéniques à la surface de la cellule, se manifeste par la sécrétion d'interleukines et tout particulièrement de divers facteurs susceptibles de stimuler la prolifération et la différenciation des lymphocytes B pour aboutir, comme dans le premier cas, à la sécrétion d'immunoglobulines par la plasmocyte . Lorsqu'on essaie d'identifier la présence d'immunoglobulines lors de cette transformation de lymphocytes B en plasmocytes, on constate une première étape où les immunoglobulines sont présentes dans la cellule (position intracytoplasmique), et une deuxième étape où l'immunoglobuline est sécrétée.

## **I.2. PHENOTYPAGE IMMUNOLOGIQUE DE LA LIGNEE B**

### **1.2.1. Définitions des classes de différenciation (CD)**

La définition d'une classe de différenciation (CD) se réfère aux anticorps monoclonaux : c'est un groupe d'anticorps dont la réactivité tissulaire au sein des populations leucocytaires normales et malignes ne diffère pas statistiquement. Ces anticorps reconnaissent bien la même molécule, comme des études biochimiques peuvent le prouver.

Fonder la définition des CD sur des anticorps monoclonaux repose en fait sur une démarche expérimentale concrète : nous ne percevons et ne définissons une molécule de surface qu'au travers des anticorps développés contre elle.

En pratique, ces CD sont établis officiellement au cours d'ateliers internationaux qui regroupent tous les laboratoires désireux d'y participer.

Système de nomenclature des antigènes de différenciation leucocytaires :

CD<sub>n</sub> [ cellule cible, PM] "A<sub>c</sub>M"

- CD : pour classe de différenciation
- n : numéro arbitraire identifiant le CD
- Cellule cible : cellule à laquelle on se réfère, habituellement la population leucocytaire la plus représentative du CD
- PM : poids moléculaire en Kilo Daltons de la molécule, dans sa forme correspondant à la cellule cible indiquée plus avant
- "A<sub>c</sub>M" : nom particulier de l'anticorps monoclonal qui a servi à l'étude

Oralement, la désignation se limite à  
"CD<sub>n</sub>"

### **I.2.2. Description des principaux marqueurs B**

- \* HLA-Dr : Cette structure est exprimée très précocément sur les lymphocytes B. L'HLA-Dr représente une des trois familles des antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. L'HLA-Dr n'est cependant pas spécifique des lymphocytes B puisqu'on la retrouve sur les lymphocytes T activés, sur les cellules présentatrices de l'antigène et sur les cellules souches. Son rôle est essentiel dans le phénomène de reconnaissance cellulaire réciproque entre les cellules coopérantes dans la réponse immunitaire.
- \* CD 16 ( FcR, Leu-11a,b,c) : C'est le récepteur Fc pour les immunoglobulines (marqueurs membranaires). Ce récepteur Fc se retrouve également sur les monocytes, les lymphocytes T activés et les cellules K.
- \* CD 19 (B<sub>4</sub>, anti-Leu-12) : L'antigène CD19 est habituellement le premier antigène de différenciation de cellules engagées dans la lignée B. Il apparaît sur les cellules pré-B et reste présent durant la différenciation du lymphocyte B ( jusqu'au lymphocyte B mature). Il est absent sur le plasmocyte.

- \* CD 20 (B1, Leu-16) : L'antigène CD 20 apparaît dès le stade des lymphocytes pré-B et on le retrouve jusqu'aux lymphocytes B matures. CD 19 et CD 20 sont considérés comme des marqueurs de tous les B (pan B) et sont utilisés très fréquemment dans le phénotypage des lymphocytes B.
- \* CD 21 (B2, CR2, C3 dR) : Récepteurs membranaires liant le virus EBV (Epstein Barr) et C3d (composant du complément) présent sur les cellules B.
- \* CD 23 (B6) : C'est l'antigène qui apparaît sur les lymphocytes B activés.
- \* CD 35 (CR1, C3bR) : Récepteurs membranaires spécifiques du C3b et C4b (composants du complément). Il est exprimé sur les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les polymorphonucléaires neutrophiles et les éosinophiles, et sur quelques lymphocytes T.
- \* Les immunoglobulines de surface et cytoplasmiques : Les immunoglobulines de surface (SIg) et les immunoglobulines intracytoplasmiques (CIg) constituent l'apanage des lymphocytes B. Selon la présence ou l'absence de ces molécules, les lymphocytes B peuvent être séparés en trois classes :
  - les cellules pré-B : elles expriment les chaînes  $\mu$  lourdes dans le cytoplasme mais pas au niveau de la surface (SIg<sup>-</sup>, CIg<sup>+</sup>)
  - Les lymphocytes B matures : ils expriment les immunoglobulines de surface complètes; les immunoglobulines cytoplasmiques peuvent être présentes (SIg<sup>+</sup>, CIg<sup>+</sup>)
  - Les plasmocytes sécréteurs : caractérisés essentiellement par les immunoglobulines intracytoplasmiques et par un taux faible ou nul d'immunoglobulines de surface (SIg<sup>-</sup>, CIg<sup>+</sup>).

Les études en cytométrie de flux trouvent surtout un intérêt dans la mise en évidence d'un processus monoclonal. Cette expression monoclonale peut s'étudier par différentes approches :

- a. Par la recherche d'un pic monoclonal résultant de la prolifération de plasmocytes ou lymphocytes synthétisant des immunoglobulines de mêmes chaînes lourdes et légères.
- b. Par la recherche d'un processus monoclone cellulaire se basant sur :
  - b1. : des critères enzymatiques : mise en évidence d'un seul isomère enzymatique chez une personne hétérozygote
  - b2. : des critères cytogénétiques : mise en évidence d'anomalies chromosomiques clonales
  - b3. : des critères de biologie moléculaire : mise en évidence d'un réarrangement clonal des gènes des immunoglobulines
  - b4. : des critères immunologiques : mise en évidence, pour les lymphocytes B, de la prolifération d'un clone cellulaire portant des immunoglobulines de même chaîne lourde, chaîne légère, activité anticorps et idiotype.

Seule l'idiotypie des immunoglobulines permet d'affirmer le caractère monoclonal de l'expression lymphocytaire; cependant cette étude est difficilement envisageable en routine; on préfère dès lors l'investigation des chaînes légères d'immunoglobulines qui constituent toutefois un reflet de la monoclonalité.

Un clone déterminé de lymphocytes B ne peut exprimer qu'un seul des deux isotypes Kappa (K) ou Lambda ( $\lambda$ ). Ce phénomène est appelé restriction isotypique des chaînes légères. Dans une population d'individus sains, environ deux tiers des lymphocytes B expriment la chaîne légère Kappa et un tiers des lymphocytes B la chaîne légère Lambda. Le rapport Kappa/Lambda exprimé par les immunoglobulines varie entre 0,6 et 2,8.

### **I.3. NOTION DE MONOCLONALITE**

Lors d'une réponse immunitaire humorale normale, de nombreux clones différents par l'épitope reconnu à la surface de l'antigène et/ou le degré d'affinité de l'anticorps vis-à-vis de cet épitope, ou encore par l'isotype produit, sont simultanément mis en jeu. Toute réponse physiologique est donc polyclonale. Cependant, lorsque se produit une

transformation néoplasique d'un clone, ce clone subit une expression tout à fait inhabituelle qui peut se traduire par la sécrétion d'une immunoglobuline unique en quantité excessive par rapport aux autres immunoglobulines physiologiquement produites, et qu'on appelle immunoglobuline monoclonale.

L'hypergammaglobulinémie monoclonale apparaît quand un simple clone de cellules B échappe à la régulation normale. Les immunoglobulines monoclonales qui sont issues de ce clone présentent un isotype de chaîne légère soit Kappa soit Lambda. Les hypergammaglobulinémies monoclonales sont essentiellement dues à une prolifération sous-jacente de cellules B néoplasiques médullaires ou des organes lymphoïdes. Ces cellules peuvent être bénignes ou malignes. L'activation des antigènes cellulaires et la surproduction de leur produit est une étape dans la transformation néoplasique. On remarque souvent des anomalies chromosomiques conduisant à une dérégulation transcriptionnelle des oncogènes. Par exemple, dans la leucémie lymphoïde chronique et dans quelques lymphomes B, les gènes codants pour la chaîne légère Kappa (sur le chromosome 2 à la bande p12) et pour la chaîne légère Lambda (sur le chromosome 22 à la bande q11) sont souvent à des points de cassure ; des translocations chromosomiques amènent une association des gènes codants pour une chaîne légère et des oncogènes comme le gène myc c (qui se situe sur le chromosome 8). Les immunoglobulines de surface des cellules B pathologiques expriment la chaîne légère du type de gène affecté. Cette caractéristique est mise à profit pour mettre en évidence les lymphocytes B pathologiques dans les prélèvements biologiques. Il est à remarquer que le rôle des oncogènes est encore à vérifier dans ce phénomène de leucémogénèse.

## **I.4. SYNDROMES LYMPHOPROLIFÉRATIFS CHRONIQUES DE LA LIGNÉE B**

### **I.4.1. Différenciation et maturation des cellules B au cours des syndromes lymphoprolifératifs B**

Les connaissances acquises sur la différenciation B sont utiles à la compréhension des syndromes lymphoprolifératifs : c'est l'utilisation des marqueurs cellulaires qui a servi à établir le phénotype et la monoclonalité des lymphocytes proliférants. Dans nombre de ces syndromes, les cellules observées, du moins la majorité d'entre elles, résultent de la prolifération monoclonale d'un stade bien défini de la lignée B : les cellules pré-B dans certaines leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), lymphocytes B immatures et matures dans la plupart des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC); même situation avec persistance d'un certain degré de maturation en cellules sécrétrices (lymphoplasmocytaires) dans la maladie de Waldenström; cellules plasmocytaires dans le myélome.

La LLC peut être conçue comme l'accumulation d'un clone de lymphocytes B maturant et proliférant peu ; le myélome comme le plus souvent constitué de cellules qui mûrissent plus qu'elles ne prolifèrent; à l'opposé le lymphome de Burkitt comme le résultat d'une prolifération interne et synchrone de cellules B ne mûrissant pas.

### **I.4.2. Syndrome lymphoprolifératif chronique B les plus fréquents**

#### **I.4.2.1. La leucémie lymphoïde chronique (LLC)**

La LLC constitue un exemple type de prolifération monoclonale B; en effet dans 95% des cas, il s'agit de lymphocytes B. La LLC de type T ne représente que 5% de l'ensemble des LLC.

Elle est définie par l'augmentation permanente du nombre de lymphocytes sanguins au-dessus de 4000/ $\mu$ l du fait de l'accumulation d'un

clone de lymphocytes B. La LLC B est devenue une maladie raisonnablement prévisible dans son évolution grâce au regroupement en stades des symptômes présents au moment du diagnostic.

On observe chez la LLC B un déficit immunitaire :

- déficit en lymphocytes T<sub>4</sub> (lymphocytes T helpers)
- déficit intrinsèque des lymphocytes B (lymphocytes B non fonctionnels)
- les immunoglobulines normales circulantes sont le plus souvent diminuées. On peut observer dans certains cas un pic d'Ig monoclonale produit par le clone leucémique.

75% des cas de LLC se rencontrent après 60 ans avec une légère prédominance d'apparition chez les hommes. La transformation en forme aiguë est exceptionnelle.

#### Les lymphocytes de la LLC B :

##### *- Morphologie :*

Ils ressemblent aux petits lymphocytes du sang circulant, cependant la disposition chromatinienne est particulière; on parle de lymphocytes "mottés". Le rapport nucléocytoplasmique est élevé, le noyau est arrondi, la chromatine est disposée en mottes denses, compactes et bien distinctes.

##### *- Les immunoglobulines de surface :*

Elles sont présentes sur tous les lymphocytes B du clone proliférant ; la densité de SIg par lymphocyte est toutefois sensiblement réduite ( $\pm 10$  fois) par rapport à celle d'un lymphocyte B normal.

Dans la majorité des cas, la quantité de SIg est tout à fait analogue d'un lymphocyte à l'autre chez un malade donné, avec un aspect très homogène en immunofluorescence et le plus souvent il n'y a pas d'Ig monoclonale sérique. On considère alors que les lymphocytes sont "bloqués" dans leur différenciation et incapables d'effectuer leur maturation normale vers le plasmocyte. Dans la plupart des cas, l'Ig monoclonale de surface est une IgM associée à une IgD ayant

les mêmes régions variables (phénotype de lymphocyte B mûr). Plus rarement, il s'agit d'IgM sans IgD suggérant un phénotype plus immature, ou inversement, d'IgG exceptionnellement d'IgA. Dans certains cas, on trouve dans le cytoplasme des lymphocytes, une chaîne lourde sans chaîne légère (phénotype proche de celui des cellules pré-B). Dans d'autres cas, la présence d'inclusion d'Ig correspondant probablement à des stades précoces de la production d'Ig secrétées, suggère un arrêt de maturation nettement plus tardif.

*- Les chaînes légères*

L'équilibre entre les chaînes légères Kappa et Lambda exprimées par les lymphocytes B sanguins se voit ici rompu par la prolifération marquée d'un clone de cellules B exprimant seulement l'un des deux isotypes de chaînes légères (soit Kappa, soit Lambda). Le rapport Kappa/Lambda est sensiblement augmenté si la prolifération lymphocytaire est de nature Kappa; à l'inverse, le rapport est sensiblement réduit si la prolifération clonale est de nature Lambda. Le rapport Kappa/Lambda déséquilibré confirme le caractère monoclonal de la prolifération lymphocytaire.

#### I.4.2.2. Le myélome multiple (MM)

Le myélome multiple est caractérisé par une prolifération plasmocytaire maligne atteignant principalement la moelle osseuse. En fait, il est difficile de préciser l'origine exacte de la prolifération. En effet, des études de marqueurs ont révélé l'existence de lymphocytes B et probablement aussi des cellules pré-B appartenant au même clone que les plasmocytes. Cette maladie affecte habituellement des sujets d'âge mûr.

Les plasmocytes malins secrètent :

- une immunoglobuline normale du point de vue structure mais fonctionnellement anormale
- un facteur capable d'activer les ostéoclastes; on retrouve après les lésions osseuses multiples ou des tumeurs osseuses lytiques surtout au niveau des os du crâne et du bassin.



- un excès de synthèse des chaînes légères qui peut être retrouvé au niveau urinaire sous forme de protéinurie de Bence Jones.

La morphologie et le métabolisme de ces plasmocytes sont anormaux : asynchronisme de maturation, multinucléarité, présence de nucléoles atypiques.

Variante du myélome multiple :

1- Myélome multiple à IgG : 60 à 80 % des cas

2- Myélome multiple à IgA : 10 à 25 % des cas

Ces deux types sont caractérisés par un pic monoclonal d'Ig sérique sans chaînes légères décelables. Elles traduisent une synthèse équilibrée de chaînes lourdes et légères par la prolifération plasmocytaire.

3- Myélome multiple à Bence Jones : 10 % des cas

Un tel cas témoigne d'une synthèse déséquilibrée des chaînes lourdes et légères par les plasmocytes myélomateux. Les chaînes légères synthétisées en excès sont excrétées par les plasmocytes sous forme de chaînes légères libres, décelables au niveau urinaire (protéinurie de Bence Jones)

4- Myélome multiple à IgD : rare

5- Myélome non sécrétant : rare

Il peut s'agir soit d'une véritable non-excrétion avec accumulation intracellulaire des chaînes d'Ig ou dégradation intracytoplasmique des chaînes à structure anormale, soit d'une sécrétion d'Ig anormales qui sont rapidement dégradées après leur excrétion.

#### Les immunoglobulines de surface dans le myélome multiple

Les immunoglobulines monoclonales, sécrétées par la prolifération des plasmocytes malins, sont toutes constituées du même type de chaîne légère (Kappa ou Lambda).

Le rapport Kappa/Lambda sérique est déséquilibré sous l'influence d'une prolifération maligne d'un clone cellulaire sécrétant des Ig :

- soit augmentation dans le cas d'un myélome sécrétant des chaînes légères Kappa

- soit diminution dans le cas d'un myélome sécrétant des chaînes Lambda

Les plasmocytes ne portent pas d'immunoglobuline de surface mais ils contiennent des Ig intracytoplasmiques. Par contre les lymphocytes circulants expriment des SIg portant des chaînes légères et dont le rapport Kappa/Lambda est normal (c'est-à-dire entre 0,6 et 2,8). Récemment, on a découvert que le rapport Kappa/Lambda des chaînes légères, exprimées par les SIg des lymphocytes non plasmocytaires, varie en sens inverse du rapport Kappa/Lambda sérique et ceci durant la phase plateau d'un myélome stable (ou myélome stabilisé par influence thérapeutique).

Une évolution maligne du myélome est alors caractérisé :

- 1- par une accentuation du rapport Kappa/Lambda sérique de l'immunoglobuline
- 2- par une normalisation du rapport Kappa/Lambda au niveau des immunoglobulines lymphocytaires (lymphocyte B circulant)

#### I.4.2.3. La macroglobulinémie de Waldenström

Cette maladie est caractérisée par la présence d'une immunoglobuline monoclonale de type M à un taux sérique supérieur à 5gr/L, par une prolifération et une accumulation intramédullaire d'un clone de cellules lymphoïdes polymorphes à degré de maturation variable (lymphocytes-lymphoplasmocytes-plasmocytes).

Elle représente le meilleur exemple de prolifération lymphocytaire B monoclonale sans arrêt de maturation. La macroglobulinémie de Waldenström et la LLC sont en fait très voisines et il n'existe pas de frontière entre ces deux maladies. On tend à parler de LLC quand la prolifération est lymphocytaire assez monomorphe, l'hyperlymphocytose importante et le pic d'IgM inférieur à 5gr/litre; de macroglobulinémie de Waldenström quand le taux d'IgM monoclonale est élevé et l'hyperlymphocytose modérée ou absente.

Comme la LLC, la macroglobulinémie atteint plus souvent les hommes que les femmes, entre 50 et 70 ans.

### Prolifération lymphoïde de la macroglobulinémie de Waldenström

La topographie médullaire, ganglionnaire et sphérique de la prolifération est très analogue à celle de la LLC. Il s'agit habituellement d'une prolifération de lymphocytes polymorphes, avec tous les intermédiaires entre le petit lymphocyte et le plasmocyte, et d'un pourcentage modéré de plasmocytes. Les études immunologiques ont montré que toutes ces cellules appartiennent à la lignée B et font partie du même clone, puisque toutes synthétisent une IgM monoclonale de surface ayant la même chaîne légère. La plupart de ces cellules synthétisent également une IgD de surface identique à l'IgM pour sa chaîne légère, son idiotype et son activité anticorps.

Dans le sang, l'hyperlymphocytose est inconstante et généralement modérée. Cependant, et même lorsque le nombre de lymphocytes est normal, il ressort des études des marqueurs lymphocytaires que la majorité des lymphocytes circulants appartiennent au même clone lymphocytaire B que les cellules médullaires, ce qui explique l'existence d'anomalies de la réponse aux mitogènes analogues à celles rencontrées dans la LLC.

Comme dans la LLC, la prolifération peut être l'objet d'une modification du type cellulaire avec apparition d'un sarcome. La prolifération lymphoïde entraîne un déficit immunitaire.

### La macroglobulinémie de Waldenström et les immunoglobulines de surface

Les SIg des lymphocytes B du sang circulants ne sont évocateurs de la prolifération monoclonale du Waldenström qu'aux moments évolutifs de la maladie, où grand nombre de lymphocytes circulants portent à sa surface une IgM monoclonale (de type Kappa ou Lambda). Ceci rend plus difficile la mise en évidence du caractère monoclonal de la prolifération au niveau sanguin puisque les éléments lympho-plasmocytaires sont absents dans le sang circulant pour la plupart des cas.

Par contre les organes infiltrés (moelle, ganglions) sont riches en cellules lymphoïdes présentant une IgM de surface monoclonale (de type Kappa dans 75 % des cas et de type Lambda dans 25 % des cas). La nature des chaînes légères des IgM de surface est identique à celle des IgM circulants.

#### I.4.2.4.Lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH)

Les lymphomes malins sont des tumeurs malignes développées à partir des tissus lymphoïdes. Il s'agit de tumeurs d'abord localisées en un site du système lymphoïde qui s'étendent par voie lymphatique et/ou sanguine. Lorsqu'il est disséminé, le processus tumoral peut rester plurifocal et respecter la moelle osseuse et le sang. Lorsque ces tissus sont envahis, il est difficile de faire la différence avec un processus leucémique primitif.

Les lymphomes ganglionnaires les plus fréquemment rencontrés sous nos climats sont les lymphomes nodulaires. Ils sont pratiquement toujours B, quel que soit leur type cytologique et généralement de pronostic assez favorable, bien que susceptibles de se transformer en lymphomes à grandes cellules.

La classification des LMNH "à usage clinique" distingue schématiquement trois groupes, de gravité croissante :

Fréquence (%)		Nature immunologique
	<u>1. Malignité faible</u>	
3,6	- lymphome à petits lymphocytes (type LLC ou plasmacytoïde)	B ou T
22,5	- lymphomes folliculaires avec prédominance de petites cellules clivées	B
7,5	- lymphomes folliculaires mixtes à petites cellules clivées et grandes cellules	B

	<b><u>2. Malignité intermédiaire</u></b>	
3,0	- lymphomes folliculaires à prédominance de grandes cellules	B
6,9	- lymphomes diffus à petites cellules clivées	B
6,7	- lymphomes diffus mixtes à petites et grandes cellules	B
19,7	- lymphomes diffus à grandes cellules non immunologiques	B
	<b><u>3. Haute malignité</u></b>	
4,2	- lymphome lymphoblastique	B
7,9	- lymphome à grandes cellules immunoblastiques	B ou T
5	- lymphome diffus de type Burkitt	B

### Le LHNH et les immunoglobulines de surface

- d'un point de vue immunologique, on peut dire que la majorité (75 %) des LHNH est constituée de cellules B présentant des SIg.
- La mesure du rapport Kappa/Lambda des SIg sur les cellules B malignes peut être utile au niveau des lymphomes B afin de déterminer leur caractère monoclonal.

Les lymphomes malins sont considérés comme provenant d'une expansion maligne de cellules lymphoïdes d'un même clone.

Remarque : Certains lymphomes présentent deux populations lymphocytaires morphologiquement différentes. L'analyse des chaînes légères a montré une anomalie pour les deux types de cellules. Ceci peut s'expliquer en considérant l'hétérogénéité morphologique comme dû à des étapes différentes de maturation des cellules malignes (= différenciation intratumorale).

#### 1.4.2.5. Intérêt de l'étude des lymphocytes dans les syndromes lymphoprolifératifs

La stadification des cellules B, normales ou leucémiques, est basée notamment sur la distribution et la densité d'expression des structures de surface (y compris les SIg) et intracytoplasmiques (CIg).

Le phénotype immunologique des éléments de la lignée B permet dès lors d'individualiser des stades de maturation différents auxquels peuvent appartenir les cellules normales mais aussi les cellules leucémiques : depuis les cellules pré-B immatures ne présentant (en dehors des antigènes de surface) que la chaîne lourde  $\mu$  intracytoplasmique ( $C\mu$ ) jusqu'aux plasmocytes, cellules les plus matures caractérisées par des immunoglobulines intracytoplasmiques complètes (et de nature variée) et par l'absence (la perte) des antigènes de surface normalement présents sur les autres cellules de la lignée (CD20-CD19-SIg,...).

#### Intérêt de la mise en évidence des immunoglobulines

- Les SIg constituent le récepteur antigénique spécifique du lymphocyte B (on ne les retrouve sur aucun autre leucocyte). Ils permettent d'identifier et de quantifier immunologiquement les lymphocytes B parmi les autres lymphocytes morphologiquement identiques.
- La mise en évidence des SIg au niveau des lymphocytes B nous permet de situer leur stade de maturation puisqu'on ne retrouve que des SIg sur les lymphocytes B aux stades :
  - lymphocyte B immature (médullaire)
  - lymphocyte B mature (périphérique)
  - lymphoplasmocyte.

Les cellules pré-B et les plasmocytes ne portent pas d'Ig à leur surface mais bien dans leur cytoplasme.

- L'étude des chaînes légères (Kappa et Lambda) au niveau des SIg et CIg distingue, parmi les lymphocytes B, deux populations cellulaires. Le rapport quantitatif de ces deux populations est stable chez l'individu normal et se situe dans des proportions bien définies

(Kappa/Lambda = 0,6-2,8). Nous pouvons dès lors identifier et hautement suspecter une prolifération monoclonale B grâce aux variations de proportions entre les chaînes Kappa et Lambda exprimées à la surface et dans le cytoplasme des lymphocytes B (ceci s'applique aux maladies lymphoprolifératives).

## 1.5. BUT DU TRAVAIL

Dans le cadre des syndromes lymphoprolifératifs chroniques, l'analyse immunophénotypique des lymphocytes par cytométrie de flux est particulièrement intéressante : d'une part, elle complète utilement les données cliniques, cytologiques et histopathologiques de ces différents syndromes en précisant la nature B ou T des lymphocytes ainsi que le caractère monoclonal de la prolifération ; d'autre part, cette analyse présente un intérêt évident dans la mise en évidence d'un stade précoce de la maladie.

Cependant, le phénotypage lymphocytaire de certains syndromes lymphoprolifératifs B est confronté à un problème : les cellules pathologiques n'expriment qu'en faible quantité certains antigènes de surface caractéristiques des lymphocytes B (tels CD<sub>20</sub>, CD<sub>19</sub>, SIg); c'est le cas notamment pour la leucémie lymphoïde chronique (LLC), pathologie lymphoïde chronique de loin la plus fréquente.

La finalité de ce mémoire consiste à mettre au point une méthode de détection plus sensible de ces antigènes par cytométrie en flux

- mise en évidence des lymphocytes B dans différents syndromes lymphoprolifératifs (essentiellement la LLC)
- détection des SIg, en particulier les chaînes légères Kappa et Lambda
- détection des CIg

Sur base de différentes méthodes décrites dans la littérature, nous essayerons de mettre au point une méthode pouvant être utilisée aisément dans la détection de la LLC et des autres syndromes lymphoprolifératifs.



## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. MATERIEL

#### \* Echantillons (prélèvements biologiques)

- sang récolté sur EDTA ou héparinate de Li (majorité des cas)
- moelle osseuse, récoltés sur EDTA ou héparinate de Li
- suspension cellulaire réalisée à partir d'un prélèvement ganglionnaire

Les échantillons sont traités dans un délai ne dépassant pas 24 heures.

#### \* Réactifs

- solution de "lyse" : solution hypotonique d'érythrolyse dont la composition est la suivante :
  - 1gr de  $\text{KHCO}_3$
  - 8,26 gr de  $\text{NH}_4\text{Cl}$
  - 0,037 gr de EDTA
  - 500 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée
- solution de tampon phosphate :
  - PBSA : solution prête à l'emploi :
    - chlorure de sodium à 137 mmole
    - chlorure de potassium à 2,7 mmole
    - tampon phosphate à 10mmole
    - 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$  distillée
    - pH = 7.4
  - PBSII : PBSA
    - + 0,2 gr de BSA (sérum albumine bovine)
    - 20 mgr de  $\text{NaN}_3$  (azide de sodium)
  - PBSI : 0,1 gr de KCl

0,1 gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0,72 gr de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
4 gr de NaCl  
1 gr de BSA  
500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  distillée  
ajuster le pH à 7,3

**\* Les anticorps monoclonaux conjugués :**

Fragments  $\text{F}(\text{ab}')_2$  à une dilution de 10 $\mu\text{l}$  pour 200  $\mu\text{l}$  de PBS. Nous utilisons les fragments  $\text{f}(\text{ab}')_2$  pour éviter toute fixation non spécifique.

- CD20 (OK B20) : anticorps monoclonal de souris pan B anti-humain CD20 conjugué au FITC (Ortho)
- CD19 (Leu-12) : anticorps monoclonal de souris pan B anti-humain CD19 conjugué au FITC (Becton Dickinson)
- CD2 (OKT<sub>11</sub>) : anticorps monoclonal de souris pan T anti humain conjugué au FITC (Ortho)
- CD8 (OKT<sub>8</sub>) : anticorps monoclonal de souris pan T cytotoxique anti humain conjugué au FITC (Ortho)
- CD4 (OKT<sub>4</sub>) : anticorps monoclonal de souris pan T helper anti humain conjugué au FITC (Ortho)
- CD5 (OKT<sub>1</sub>) : anticorps monoclonal de souris pan T anti humain conjugué a PE (Ortho)
- Ortho B cell marker : anticorps anti-chaînes lourdes : immunoglobuline de chèvre anti-humain conjugué au FITC (Ortho). Ce réactif réagit avec les immunoglobulines de la classe IgG-IgM-IgA
- Ortho B cell Lambda marker : anticorps anti-chaînes légères Lambda : chaîne légère Lambda de chèvre anti-humain conjugué au FITC (Ortho)
- Ortho B cell Kappa marker : anticorps anti-chaînes légères Kappa : chaîne légère de chèvre anti-humain conjugué au FITC (Ortho)
- Ortho FITC conjugué : servira de témoin négatif

### **\*Les anticorps monoclonaux non conjugués :**

Fragments F(ab')<sub>2</sub> à une dilution de 10 µl pour 200 µl de PBS

- CD20 (B<sub>1</sub>NC) : anticorps monoclonal de souris pan B anti-humain CD20 non conjugué (Coulter immunology)
- CD19 (B<sub>4</sub>NC) : anticorps monoclonal de souris pan B anti-humain CD19 non conjugué (Coulter immunology)
- Kappa light chain : anticorps anti-chaîne légère Kappa : chaîne légère Kappa de souris anti humain non conjugué (Dako)
- Lambda light chain : anticorps anti-chaîne légère Lambda : chaîne légère Lambda de souris anti humain non conjugué (Dako)

### **\*Les fluorochromes**

- Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) conjugué au fragment F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline anti-souris de lapin (Dako) (fluorescence verte)
- R-phycoérythrine (PE) conjugué au fragment F(ab')<sub>2</sub> d'immunoglobuline anti-souris de lapin (Dako) (fluorescence rouge)

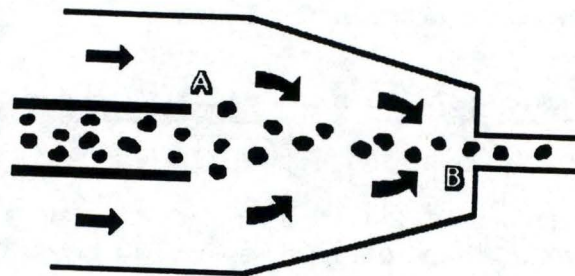
Ces deux fluorochromes sont excitables à 488nm

### **\* Réactifs utilisés principalement dans la mise en évidence des C1g (perméabilisation)**

- lysolécithine : lysophosphatidyl choline de cerveau bovin (sigma)
- saponine
- autres : éthanol, paraformaldéhyde, acide acétique,...

### **\*Appareillage**

- COULTER "STKS" : le principe coulter permet de mesurer et de compter les leucocytes, les érythrocytes et les plaquettes. Ce système permet la numération complète, ainsi que la formule leucocytaire
  - EPICS "C" : cytofluorimètre avec un laser argon 5 Watts
- La longueur d'onde utilisée pour l'analyse des phénotypes est de 488 nm.



**Fig. 2.1. : Représentation schématique de la focalisation hydrodynamique**  
Le flux de liquide accélère les cellules à la sortie de "A" et les oblige à passer par l'orifice "B".

## **II.2. METHODES**

### **II.2.1. La cytofluorimétrie**

La cytofluorimétrie (CFM) est une technique de séparation et d'analyse des cellules. Au sein d'une population cellulaire hétérogène, chaque élément est analysé isolément (analyse multiparamétrique) et séparé selon ses caractéristiques propres; des sous-populations cellulaires homogènes peuvent être de la sorte individualisées et analysées.

Le principe de fonctionnement du CFM est basé sur une focalisation hydrodynamique d'une suspension de cellules dans un faisceau lumineux excitateur, un système d'acquisition des signaux lumineux engendrés et un système de traitement des données qui rend les résultats interprétables.

#### **1. Le système**

##### *1.1. La focalisation hydrodynamique*

C'est par le système physique que l'appareil peut séparer les unes des autres les cellules en suspension, dans un flux continu de liquide isotonique.

La suspension cellulaire est injectée dans un veine de liquide à forte section qui ne peut s'écouler que par un cylindre de faible diamètre. Comme le diamètre du dispositif diminue mais que le flux reste constant, la vitesse du liquide augmente et permet la séparation des cellules (cfr Fig.2.1.).

##### *1.2. Acquisition des données*

###### **1.2.1. Faisceau excitateur**

L'excitation lumineuse des cellules doit se faire par un faisceau fortement focalisable, de grande stabilité et de grande luminosité. Le faisceau laser présente, en plus de ces propriétés qui conditionnent la précision et la sensibilité des résultats, un monochromatisme qui facilite

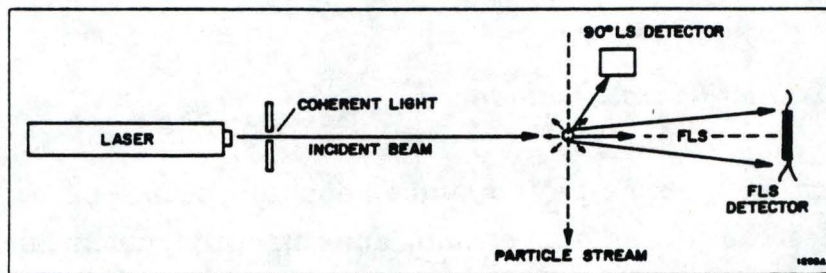


Fig.2.2. : Dispersion de la lumière

et simplifie le filtrage. C'est pourquoi, les lasers sont généralement adoptés comme source lumineuse sur les cytofluorimètres.

La répartition de la lumière dans le faisceau laser est gaussienne et nécessite dès lors un excellent centrage de l'échantillon dans le faisceau.

### 1.1.2. Collecte des signaux

Lorsqu'une cellule, entraînée par le flux liquide traverse le faisceau laser, elle émet un certain nombre de signaux lumineux qui seront utilisés comme source de données par l'appareil. Les signaux sont représentatifs des propriétés physiques (c'est le cas pour les diffusions) ou biologiques (c'est le cas pour la fluorescence). Tous ces signaux sont recueillis par une optique collectrice, séparés en fonction de leur longueur d'onde par un système de filtres optiques et parviennent à différents capteurs lumineux (ou photomultiplicateurs).

#### a) La diffusion dans l'axe : FLS

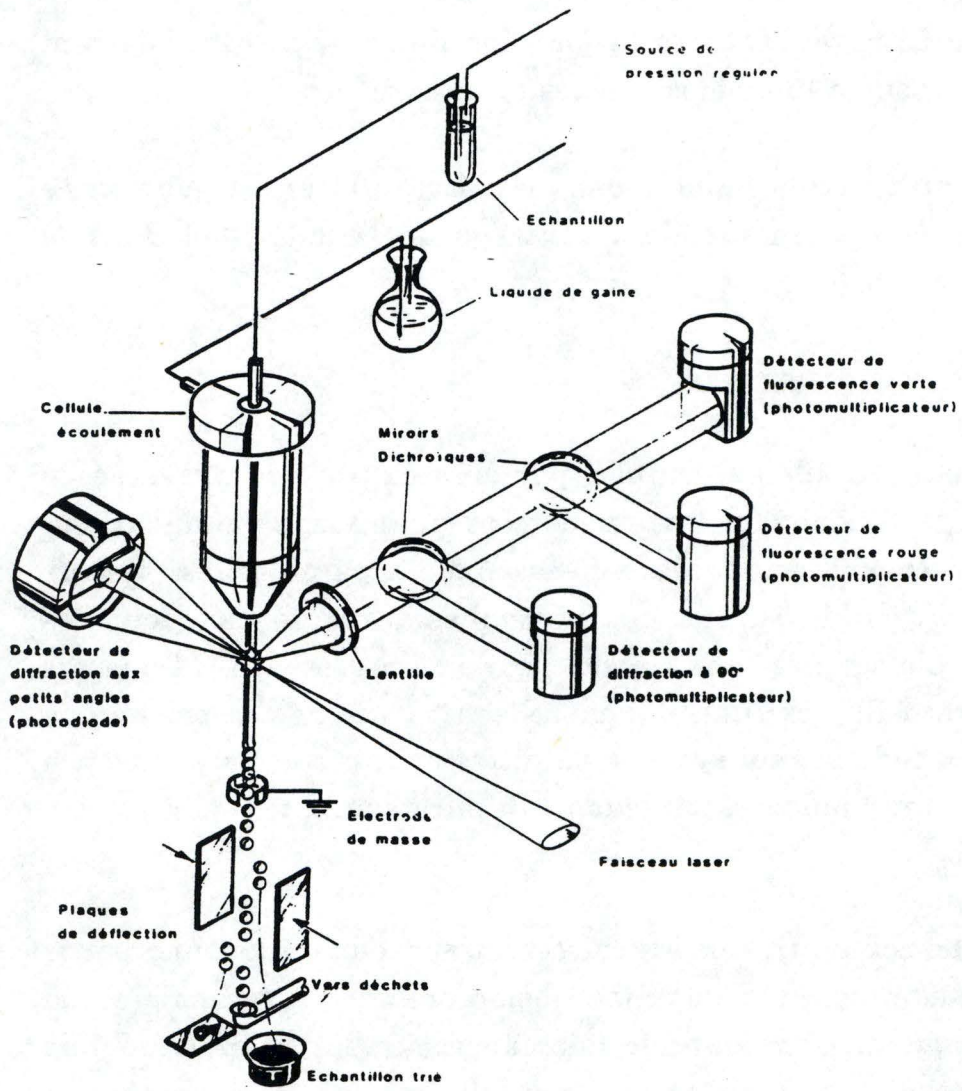
Quand une cellule traverse le faisceau laser, elle diffuse une partie de la lumière reçue par la surface membranaire. Cette lumière a la même longueur d'onde que le faisceau excitateur et est recueillie dans l'axe du laser sur un photomultiplicateur. Cette diffusion dans l'axe est essentiellement due à la diffraction de la lumière et est surtout liée à la taille (cfr Fig. 2.2.).

#### b) La diffusion aux grands angles (RLS ou 90° LS)

Une partie de la lumière du faisceau excitateur, traversant la paroi cellulaire est à son tour diffusée par les organites intracellulaires dans toutes les directions de l'espace; c'est cette lumière qui est recueillie sur un photomultiplicateur : c'est la diffusion aux grands angles. Elle fait appel aux propriétés de réfraction et de réflexion et est liée à l'hétérogénéité du contenu cellulaire (cfr Fig. 2.2.).

#### c) La fluorescence

Les cellules qui ont été marquées par un fluorochrome vont émettre dans toutes les directions de l'espace une fluorescence de longueur d'onde supérieure à celle du faisceau excitateur. Cette fluorescence est envoyée sur des photomultiplicateurs. L'intensité de la



Principe de fonctionnement du cytomètre de flux



fluorescence émise sera fonction du nombre de molécules du fluorochrome fixées sur la cellule. En cas d'usage de plusieurs fluorochromes, les fluorescences respectives seront séparées par des filtres interférentiels avant d'être envoyées sur des photomultiplicateurs.

Globalement, les signaux lumineux émis sont séparés en fonction de leur direction (diffusion dans l'axe et diffusion aux grands angles) et de leur longueur d'onde (fluorescence).

### *1.3. Le traitement des données*

#### 1.3.1. Conversion des signaux

Les signaux lumineux qui viennent frapper un photomultiplicateur provoquent de la part de ce dernier la production d'un courant dont la tension dépend de la quantité des photons reçus. Ainsi, la diffusion ou la fluorescence d'une cellule sera transformée en un signal électrique dont la valeur est comprise entre 0 et 8 V. Ces signaux électriques vont être pris en charge par un convertisseur analogique digital qui va quantifier l'amplitude de chaque signal (continu entre 0 et 8V) en un numéro de canal : de 1 à 256 (ou 1024) canaux selon l'amplification choisie. La valeur d'un canal peut être codée en bits qui seront utilisables par l'unité informatique.

#### 1.3.2. Représentation des résultats

Les données reçues par l'unité informatique sont représentées sous forme d'histogrammes de distribution des fréquences dont l'abscisse (étalonnées de 0 à 256 ou 1024) représente l'amplitude du paramètre étudié (en canaux) et dont l'ordonnée représente le nombre d'éléments. Comme chaque cellule peut émettre plusieurs signaux différents en fonction de leur direction ou de leur longueur d'onde, il est possible de combiner sur une même représentation deux paramètres indépendants : nous sommes en présence d'un histogramme biparamétrique ou "cytogramme".

## 2. Les fluorochromes utilisés en cytofluorométrie

### *2.1. Généralités*

Les fluorochromes sont des groupements chimiques qui réémettent une partie de la lumière absorbée lors de leur excitation par une source lumineuse dont la longueur d'onde entre dans leur spectre d'absorption. La lumière émise a une énergie plus faible que la lumière absorbée et donc une longueur d'onde supérieure. Les fluorochromes utilisés en CFM doivent être capables d'absorber la lumière dans des longueurs d'onde correspondant à celles des sources lumineuses utilisées par ces appareils.

### *2.2. Les principaux fluorochromes utilisés en CFM*

Deux types de fluorochromes sont utilisés en cytofluorométrie

a) Les fluorochromes présentant une affinité propre pour un constituant cellulaire (ADN, ARN).

- iodure de propidium
- le bromure d'éthidium
- l'auramine
- la thioflavine
- l'acridine orange

b) Les fluorochromes couplés d'un ligand lui conférant sa spécificité. Le ligand est en général (mais pas toujours) un anticorps qui ira se fixer sur l'antigène qui lui correspond et rendra fluorescentes les cellules exprimant cet antigène.

- L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)
- La phycoérythrine (PE)
- la rhodamine
- Le rouge texan

## 3. Méthodes de marquage

A : Différentes techniques de marquage sont utilisées en CFM :

- 1 : Le simple marquage met en évidence un antigène ou une structure cellulaire

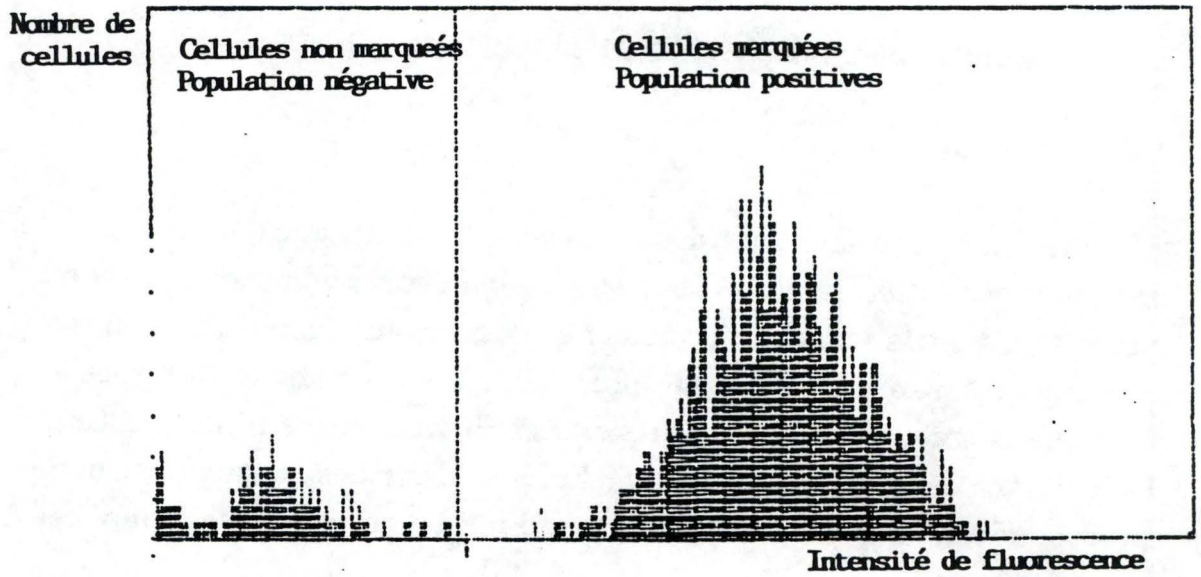
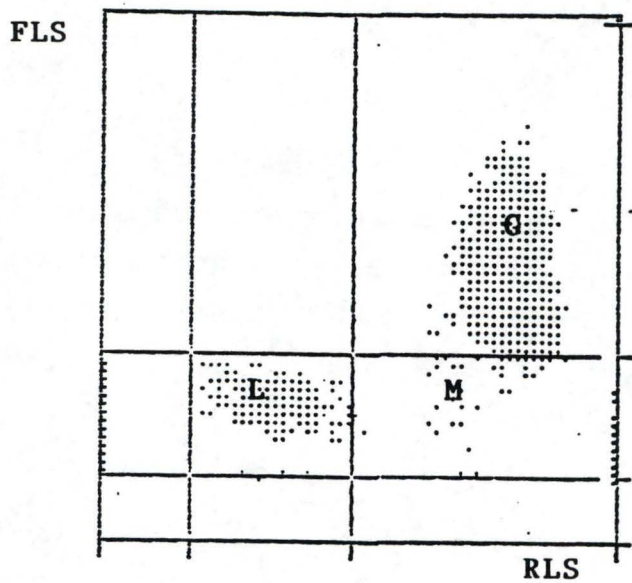


Fig.2.3. : Histogramme biparamétrique FLS en fonction du RLS



- L : lymphocytes
- M : monocytes
- G : granulocytes

Fig.2.4. : Séparation des cellules marquées et non marquées par l'anticorps monoclonal

- 2 : Un double marquage met en évidence deux antigènes ou structures situés sur une même cellule.
- 3 : Un marquage direct utilise un anticorps directement couplé à un fluorochrome pour la reconnaissance d'un antigène ou d'une structure cellulaire.
- 4 : Un marquage indirect utilise un premier anticorps pour la reconnaissance de l'antigène ou la structure cellulaire, cette liaison sera ensuite révélée par l'addition d'une antiglobuline marquée par un fluorochrome.

B : L'évaluation du pourcentage de cellules positives pour un antigène considéré requiert différentes étapes :

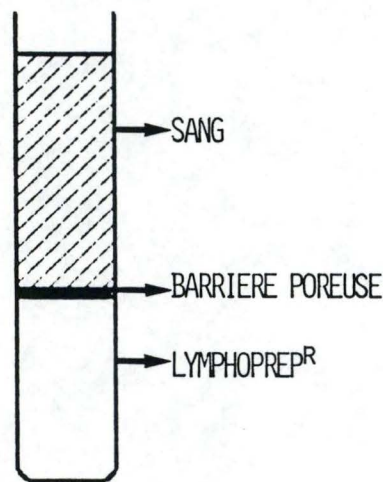
- 1 : Sur le cytogramme biparamétrique exprimant la diffusion aux petits angles (FLS) en fonction de la diffusion aux grands angles (RLS) où sont représentées les différentes populations cellulaires, l'opérateur sélectionne la population cellulaire à analyser à l'aide d'une fenêtre mobile (cfr Fig. 2.3).
- 2 : L'appareil va fournir ensuite pour cette population cellulaire, une distribution de l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cellules. Ainsi, l'opérateur pourra lui-même, sur base de l'intensité de la fluorescence, fixer le seuil séparant les cellules négatives des cellules positives et de là, déterminer le pourcentage de cellules présentant l'antigène sur l'ensemble des cellules contenues dans la fenêtre d'intérêt (Fig. 2.4).
- 3 : Il est indispensable de ne pas oublier de réaliser un témoin négatif pour dépister une fixation non spécifique sur d'éventuels récepteurs Fc. Le contrôle comporte des cellules incubées avec un anticorps monoclonal ou un mélange d'anticorps monoclonaux de même isotope que les anticorps testés mais ne possédant aucune spécificité pour les cellules humaines.

### **II.2.2. Concentré de cellules mononucléées à partir d'un échantillon sanguin**

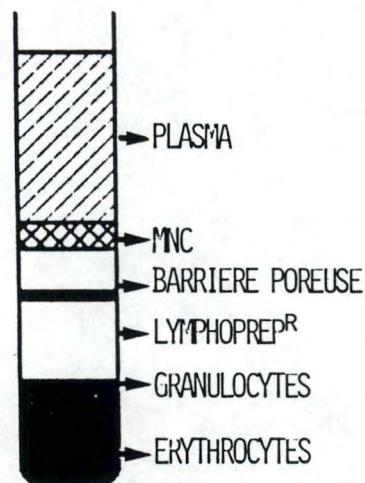
La préparation d'un concentré lymphocytaire s'est révélée intéressante dans le cadre de ce travail (cfr partie résultats)

## Séparation sur Lymphoprep<sup>R</sup> (Nycomed)

- 1) Le lymphoprep<sup>R</sup> est une solution stérile, présentant une densité de  $1,0077 \pm 0,0001$  g/ml. Cette solution sert à séparer les cellules mononucléées à partir du sang périphérique, par centrifugation.
- 2) Le tube leucosep<sup>TM</sup> est un dispositif comprenant deux compartiments séparés par une barrière poreuse spéciale. Le compartiment inférieur sera rempli de lymphoprep<sup>R</sup>.
- 3) Méthode :
  - placer dans un tube Leucosep<sup>TM</sup> de 15 ml, 3 ml de Ficoll isopaque : le lymphoprep<sup>R</sup> (de Nycomed)
  - Ajouter au minimum 3 ml de sang hépariné (ou sur EDTA)



- centrifuger durant 10 minutes à 800 x g
- Récupérer avec précaution l'anneau de cellules mononucléées (MNC) à l'aide d'une pipette Pasteur
- Transférer les MNC dans un tube de 5 ml



- Lavage des cellules :

- \* ajouter aux MNC 2 ml de tampon (PBSA) à température ambiante (pour éviter un agrégat de plaquettes)
- \* centrifuger 10 minutes à 1100 x g
- \* éliminer le surnageant
- \* répéter l'opération
- \* resuspendre les cellules dans du PBSA

### Corrolaire

La préparation d'un concentré de cellules mononucléées à partir d'un échantillon de moelle osseuse est basée sur le même principe. Une mise en suspension préalable des éléments est réalisée par des passages successifs de l'échantillon au travers d'aiguilles de diamètre de plus en plus réduit.

### II.2.3. Microscopie à fluorescence

Dans le cadre de la mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques, certaines mesures ont été réalisées par la microscopie à fluorescence en vue de confirmer les résultats obtenus en cytofluorimétrie.

La méthode utilisée est la suivante :

- Réaliser un frottis sanguin sur une lame porte objet
- Fixer les cellules durant 25 minutes avec du méthanol
- réhydrater 5 minutes dans du PBSA
- Sécher la lame
- Ajouter 20 µl d'anticorps monoclonal conjugué au FITC
- Incuber durant 30 minutes dans une chambre humide à l'obscurité
- Laver trois fois avec du PBSII
- Sécher la lame

## **II.2.4. Mise en évidence des lymphocytes B**

Méthode pour réactifs conjugués :

- Prendre 100 µl de sang
- Ajouter l'anticorps monoclonal : CD19 ou CD20, anticorps monoclonal pan B conjugué au FITC
- Laisser incuber pendant 30 minutes à 4°C
- Laver les cellules avec du PBSA : c'est-à-dire ajouter 3ml de PBSA et centrifuger durant 3 minutes à 1100 x g
- Lyser les cellules durant 15 minutes (grâce à la solution "Lyse")
- Laver trois fois les cellules avec du PBSA
- Resuspendre les cellules dans 1 ml de PBSA

Le principe est le même pour un réactif non conjugué, si ce n'est qu'il y a une étape intermédiaire : c'est-à-dire l'addition du fluorochrome qui révélera la liaison du marqueur CD20 ou CD19 non conjugués.

## **II.2.5. Méthodes de détection des immunoglobulines de surface et intracytoplasmiques**

La littérature propose différentes méthodes de mise en évidence des immunoglobulines de surface et intracytoplasmiques. Ces méthodes ont été testées dans le cadre du travail mais n'ont pas donné satisfaction. Une variante de ces méthodes sera dès lors mise au point.

### **2.2.5.1. Les immunoglobulines de surface**

**Méthode 1** : Selon la firme Tago

1. Prendre 100 µl de sang hépariné
2. Ajouter 2,3 ml de PBS contenant de l'azide de sodium (0,1%) et mélanger vigoureusement
3. Centrifuger 5 minutes à 300 x g
4. Aspirer le surnageant
5. Répéter l'opération 2, 3, 4 deux fois (c'est-à-dire trois lavages successifs)
6. Resuspendre le culot dans du PBS contenant de l'azide de sodium

7. Ajouter l'anticorps monoclonal :
  - SIg : anticorps anti-chaîne lourde
  - K : anticorps anti-chaîne légère Kappa
  - $\lambda$  : anticorps anti-chaîne légère Lambda
8. Incuber les cellules une heure à 4°C
9. Laver avec du PBS comprenant de l'azide de sodium
10. Laver les cellules deux fois avec du PBS comprenant de l'azide de sodium
11. Resuspendre les cellules dans du PBSA.

Méthode 2 : selon F.S. Ligler et al

1. Réaliser un concentré de cellules mononucléées
2. Incuber à 37°C durant 16-20 heures
3. Prendre 200  $\mu$ l de concentré par typage lymphocytaire
4. Laver les cellules avec du PBS comprenant de l'azide de sodium à 4°C
5. Ajouter les anticorps monoclonaux :
  - anticorps anti-chaîne lourde
  - anticorps anti-chaîne légère Kappa
  - anticorps anti-chaîne légère Lambda
6. Incuber 20 minutes à 4°C
7. Laver les cellules avec PBSA
8. Lyser les cellules
9. Laver avec du PBSA
10. Resuspendre le culot dans du PBSA

Méthode 3 : selon Kruth et al

1. Réaliser un concentré de cellules mononucléées
2. Pour chaque typage lymphocytaire, prendre 10<sup>6</sup> cellules/ml
3. Ajouter l'anticorps monoclonal CD20, CD19; anticorps monoclonaux pan B conjugués au FITC
4. Incuber 30 minutes à 4°C
5. Laver une fois avec du PBSA
6. Ajouter les anticorps monoclonaux
  - anti-chaîne lourde
  - anti-chaîne légère Kappa
  - anti-chaîne légère Lambda
7. Laisser incuber dans la glace durant 30 minutes
8. Lyser les cellules à froid



9. Laver deux fois avec du PBS
10. Resuspendre les cellules dans du PBS ( $\pm 1$  ml)

Méthode 4 : selon Kenneth, Ault

1. Réaliser un concentré lymphocytaire
2. Pour un typage lymphocytaire, prendre  $10^6$  cellules/ml
3. Ajouter l'anticorps monoclonal
  - anti-chaîne lourde
  - anti-chaîne légère Kappa
  - anti-chaîne légère Lambda
4. Incuber 30 minutes à  $0^{\circ}\text{C}$
5. Laver deux fois les cellules avec du PBS comprenant de l'azide de sodium
6. Lyser les cellules
7. Laver trois fois les cellules avec du PBSA
8. Resuspendre le culot dans du PBS

Méthode 5 : selon Koziner et al

1. Prendre 200  $\mu\text{l}$  de sang hépariné pour chaque typage lymphocytaire
2. Laver les cellules avec du PBS ne comprenant pas d'azide de sodium
3. Resuspendre le culot avec 5 ml de PBS ne comprenant pas d'azide de sodium
4. Laisser incuber à  $37^{\circ}\text{C}$ , selon les méthodes, il y a différents temps d'incubation (1, 2 ou 24h)
5. Centrifuger les tubes durant 3 minutes à 1100 g
6. Laver les cellules avec du PBS comprenant l'azide de sodium
7. Ajouter les anticorps monoclonaux : CD19-CD20, anticorps monoclonaux pan B conjugués au FITC
8. Incuber 20 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$
9. Laver avec du PBS comprenant l'azide de sodium
10. Ajouter l'anticorps monoclonal
  - anti-chaîne lourde
  - anti-chaîne légère Kappa
  - anti-chaîne légère Lambda
11. Incuber 30 minutes dans la glace
12. Laver avec du PBS comprenant de l'azide de sodium
13. Lyser les cellules à froid

14. Laver deux fois les cellules avec du PBSA
15. Resuspendre le culot dans 1 ml de PBSA

#### 2.2.5.2. Les immunoglobulines intracytoplasmiques

La détermination des immunoglobulines intracytoplasmiques implique obligatoirement la perméabilisation préalable des cellules. Le reste de la procédure est identique à celle utilisée dans la mise en évidence des immunoglobulines de surface. Dès lors, seules seront décrites ci-dessous, les différentes méthodes de perméabilisation citées dans la littérature.

Pour toutes les méthodes décrites, un concentré de cellules mononucléées est utile.

##### Méthode 1 : selon R.W. Schroft et al (méthode à la lysolécithine)

- Ajouter la lysolécithine à du PBS (pH = 7,2) sans  $\text{Ca}^{++}$  et sans  $\text{Mg}^{++}$  à une concentration de 5 ou 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Prendre cette solution (1 ml) et y ajouter  $10^6$  cellules/ml
- Incuber 5 minutes à  $4^\circ\text{C}$
- Laver deux fois avec du PBS comprenant de l'azide de sodium et du BSA

##### Méthode 2 : selon Kunget et al (méthode à l'éthanol/acide acétique/formaldéhyde)

- Incuber les cellules (200 ml) durant 15 minutes à  $-20^\circ\text{C}$  dans de l'éthanol comprenant 5% d'acide acétique
- laver une fois avec du PBS ne comprenant pas d'azide de sodium
- Incuber les cellules durant 10 minutes à température ambiante avec une solution comprenant 3,7 % de formaldéhyde
- Laver une fois avec du PBS sans azide de sodium
- Ajouter de l'acétone et laisser incuber durant 4 minutes à  $4^\circ\text{C}$
- Laver deux fois avec du PBS sans azide de sodium

##### Méthode 3 : selon Lafting et al (méthode au KCl/méthanol)

- Prendre du KCl à 0,1 mol % ( 4,46 gr/1 litre d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée)
- Incuber, dans cette solution, les cellules durant 5 minutes
- Ajouter 0,5 ml de méthanol

- Incuber 30 minutes dans la glace
- Centrifuger 3 minutes à 1100 x g
- Laver une fois avec du PBSA

**Méthode 4 : selon Garner et al. (méthode à la saponine/paraformaldéhyde)**

- Prendre  $10^6$  cellules/ml
- Incuber les cellules durant 5 minutes à 4°C dans 1 ml de PBS froid (pH = 7,4) comprenant 2 % de paraformaldéhyde et 0,25 % de saponine
- Laver avec du PBS ne comprenant pas d'azide de sodium

**Méthode 5 : selon Chused et al. (méthode à la formaldéhyde/acétone)**

- Prendre  $10^6$  cellules/ml
- Incuber les cellules durant 10 minutes à température ambiante dans 1 ml de formaldéhyde à 3,7 %
- Laver une fois avec du PBS
- Ajouter 1 ml d'acétone et incuber 5 minutes à 4°C
- Laver une fois avec du PBS

Pat.	CD20 conjugué (%)	CD20 non conjugué (%)	Pat.	CD20 conjugué (%)	CD20 non conjugué (%)
1	4	6	16	8	7
2	4	4	17	5	4
3	14	11	18	5	4
4	4	4	19	5	6
5	6	6	20	4	4
6	7	7	21	8	8
7	6	6	22	9	6
8	2	3	23	4	6
9	5	3	24	14	13
10	2	2	25	4	4
11	6	5	26	6	6
12	2	2	27	7	7
13	8	6	28	6	6
14	9	7	29	3	2
15	2	3	30	5	3

Pat. = Patient

**Tableau 1** : Lymphocytes B d'individus sains révélés avec un réactif CD20 conjugué (FITC) : marquage direct ; comparaison avec un réactif CD20 non conjugué : marquage indirect.

# III. RESULTATS.

## III.1. APPLICATION DE LA METHODE CLASSIQUE DE MISE EN EVIDENCE DES LYMPHOCYTES B.

Pour les hémopathies lymphoïdes chroniques, un phénotypage immunologique est un élément du diagnostic et de classification.

### III.1.1. Méthode de marquage direct.

cfr méthode décrite au paragraphe II.2.5.1.

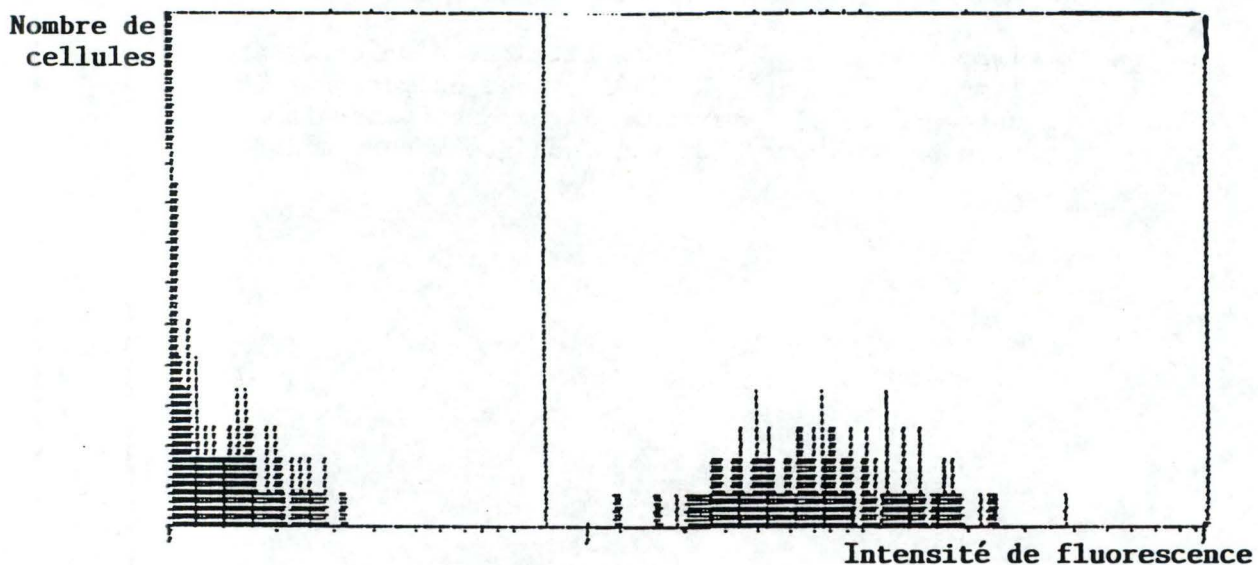
L'immunofluorescence directe est une technique en un seul temps : elle utilise des anticorps monoclonaux directement conjugués au fluorochrome.

- *Application de cette méthode chez les individus sains.*

Dans 30 cas analysés, nous observons une bonne mise en évidence des lymphocytes B; ceci grâce aux anticorps CD20 (anti-B1) et CD19 (anti-B4) directement conjugués au FITC (cfr résultats tableau 1).

Aspect du cytogramme :

Individus sains      CD 20 CONJUGUE



Cellules CD 20 positives : 11 %

Canal modal : 636

Path.	CD20 conjugué (%)	CD20 non conjugué (%)	Path.	CD20 conjugué (%)	CD20 non conjugué (%)
LLC1	*	74	LLC22	*	90
LLC2	*	74	LLC23	*(25)	51
LLC3	*(35)	48	LLC24	*	59
LLC4	*	46	LLC25	*	62
LLC5	*	86	LLC26	74	81
LLC6	*	68	LLC27	*	83
LLC7	*	51	LLC28	*	73
LLC8	*	66	LLC29	*	86
LLC9	*	87	LLC30	*	83
LLC10	*	48	LLC31	83	82
LLC11	*	84	LLC32	*	85
LLC12	*	88	LLC33	*	32
LLC13	*	84	LLC34	*	73
LLC14	*	76	LLC35	*(10)	77
LLC15	*	83	Lph 1	22	18
LLC16	*	80	Lph 2	*	36
LLC17	*	74	Lph 3	39	44
LLC18	*	80	WLD1	*	11
LLC19	*	92	WLD2	*	23
LLC20	*(38)	64	WLD3	*	19
LLC21	*(24)	95	WLD4	*	18

\* = populations négative et positive mal séparées (absence de discrimination)

LLC : leucémie lymphoïde chronique

Lph : lymphome

WLD : maladie de Waldenström

**Tableau 2 : Lymphocytes B d'individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif B révélés avec un marqueur CD20 conjugué(FITC) : marquage direct;et comparaison avec un marqueur CD20 non conjugué:marquage indirect**

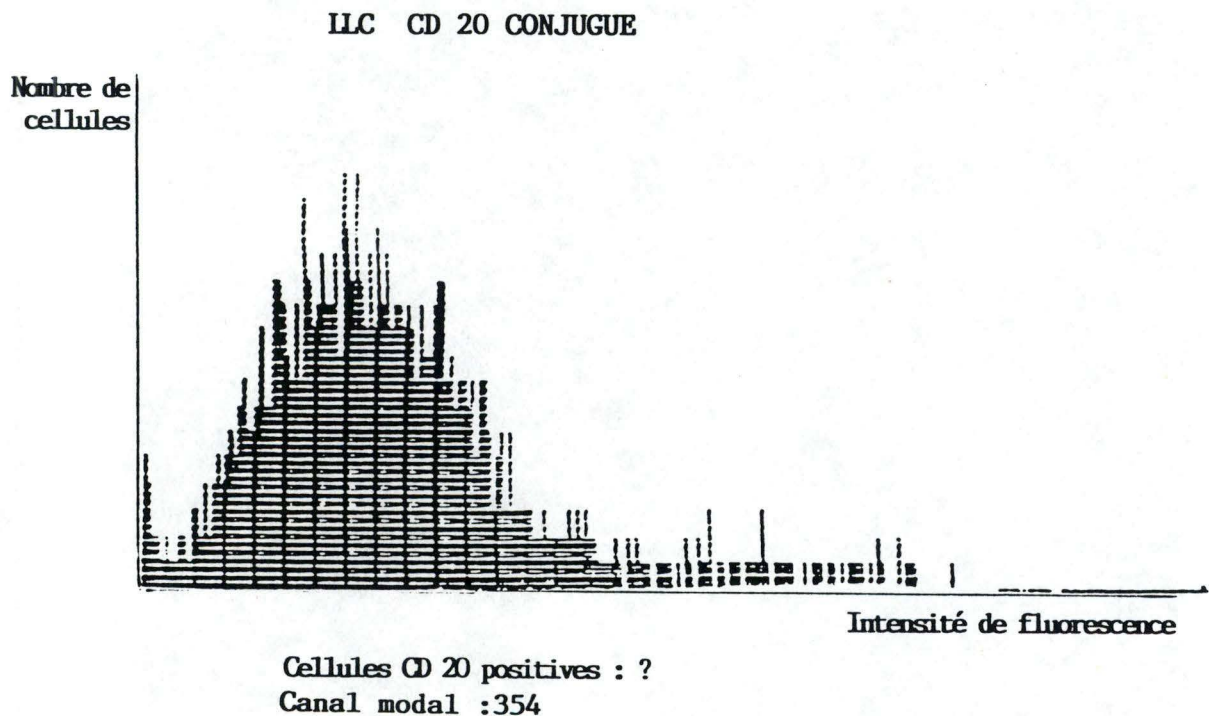
- Application de cette méthode aux cas pathologiques (surtout les LLC).

La cytofluorimétrie est souvent utilisée avec les anticorps monoclonaux pour comparer la densité antigénique de diverses populations cellulaires.

La méthode d'immunofluorescence directe a été appliquée aux lymphocytes B pathologiques. Les résultats obtenus avec les mêmes anticorps CD19 et CD20 conjugués au FITC, montrent que les lymphocytes B des syndromes lymphoprolifératifs (LLC) n'ont pu être individualisés (cfr tableau 2).

Dans 37 cas sur 42 cas de syndromes lymphoprolifératifs (88%), les profils de fluorescence ne montrent pas de pic bien défini.

Aspect du cytogramme :



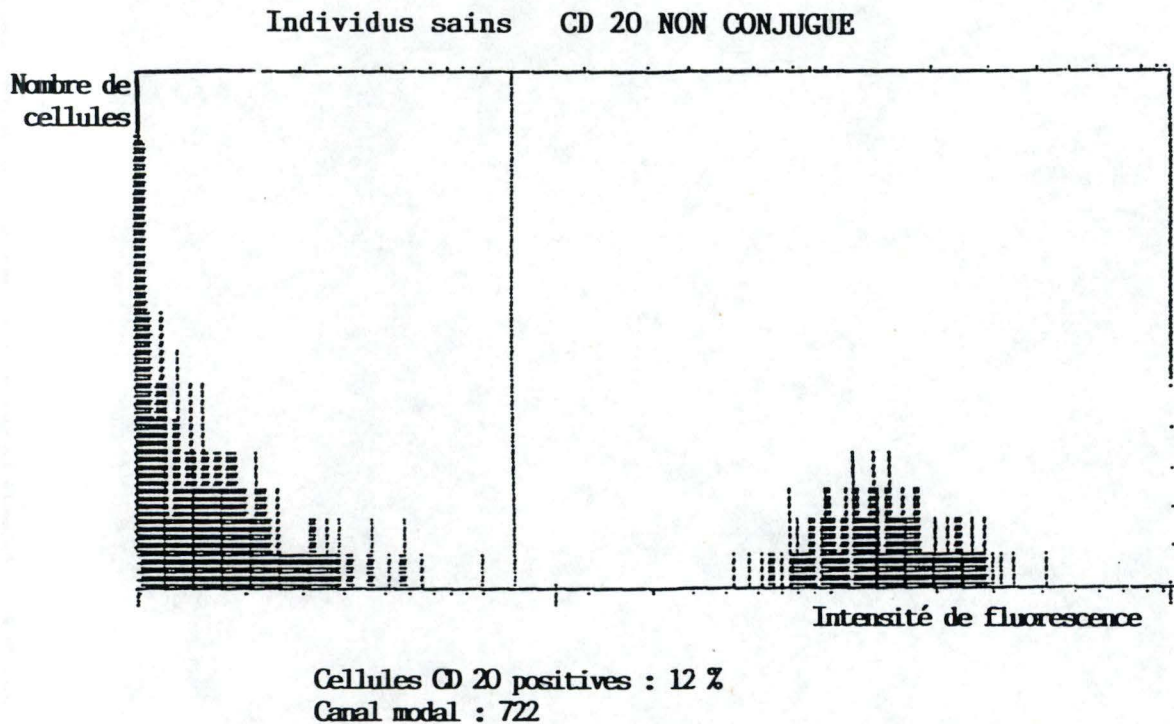
### III.1.2. Méthode de marquage indirect.

Pour rappel, on incube dans un premier temps, les cellules avec l'anticorps monoclonal non conjugué; dans un second temps avec des anticorps immunoglobulines de souris marqués par l'isocyanate de fluorescéine (FITC).

- *Application de cette méthode aux individus sains.*

Pour les 30 cas analysés, nous avons déjà une bonne séparation; la méthode de marquage indirect n'apporte aucune différence significative dans le pourcentage de lymphocytes B. Nous constatons uniquement une légère augmentation dans l'intensité de la fluorescence (cfr. tableau 1).

Aspect du cytogramme :



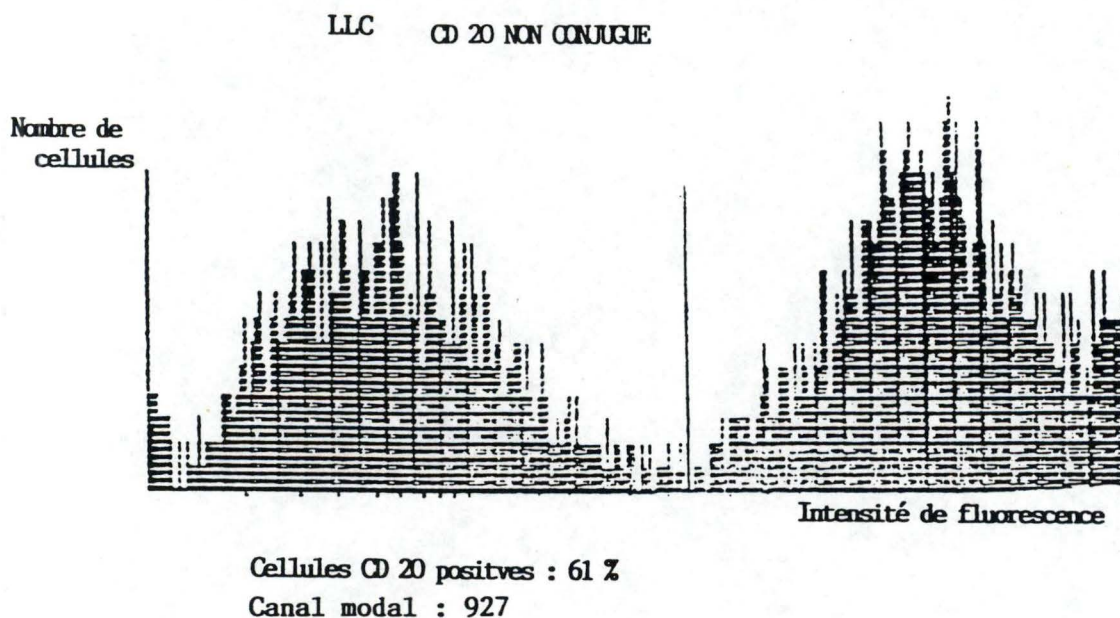
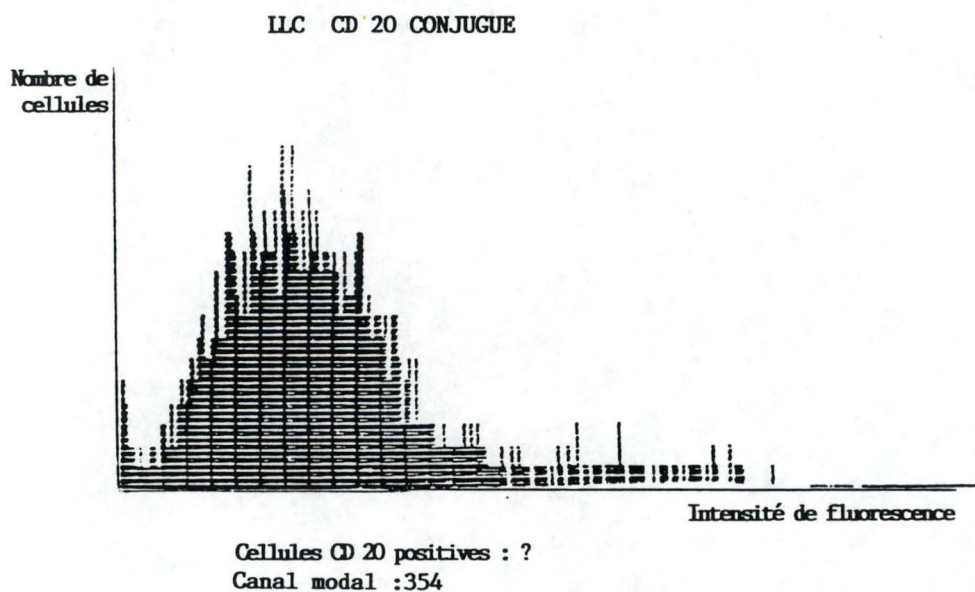
En comparant avec le cytogramme du paragraphe III.1.1., nous ne remarquons aucune modification ou amélioration du profil de fluorescence.



- Application de cette méthode aux cas pathologiques.

Un marquage direct ne permettait pas de mettre en évidence les lymphocytes B. Une amélioration sensible de la détection des antigènes (principalement CD19 et CD20) peut cependant être obtenue par amplification du signal de fluorescence grâce à la technique de marquage indirect : en effet, sur les cellules B pathologiques, certains antigènes peuvent être exprimés en quantité beaucoup plus faible que sur les cellules normales correspondantes ; ces antigènes, ne pourront être révélés que par cette méthode indirecte.

Comparaison : CD20 conjugué / CD20 non conjugué de lymphocytes B pathologiques.



Nous constatons que le marquage indirect des lymphocytes B pathologiques, permet une amplification significative du signal émis par les antigènes.

Nous observons une différence hautement significative dans le pourcentage des cellules positives ; cette différence est associée à une augmentation de l'intensité de fluorescence (augmentation du canal modal).

**Conclusion** : Toute investigation des lymphocytes B des individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif se fera par un marquage indirect à l'aide de réactifs non conjugués (CD20 non conjugué ou CD19 non conjugué).

## **III.2. LES IMMUNOGLOBULINES DE SURFACE.**

### **III.2.1. Les immunoglobulines cytophiliques.**

Les lymphocytes B, les cellules NK (natural killer), les lymphocytes T activés ainsi que toutes les cellules phagocytaires possèdent des récepteurs Fc qui lient, à des degrés d'avidité variables, des immunoglobulines circulantes. Ces immunoglobulines cytophiliques ne sont nullement spécifiques des lymphocytes B et constituent la source la plus importante de faux positifs. Il s'agit généralement d'IgG mais on rencontre également des IgM cytophiliques.

Dans certains cas, l'intériorisation de toutes les immunoglobulines de surface (IgS+ cytophiliques) nécessitent des enzymes protéolytiques (ex: pronase) et la réexpression des immunoglobulines de surface à la surface des lymphocytes B après une incubation de 12 heures. Toutefois, dans la plupart des cas, une incubation des cellules à 37°C suffit à l'intériorisation des récepteurs Fc ayant lié des immunoglobulines sériques. C'est pourquoi, certaines méthodes du point II.6.1. mentionnent une préincubation à 37°C.

Nous testerons essentiellement l'influence de la préincubation à 37°C et la nature du tampon de préincubation.

### III.2.1.1. Le tampon phosphate de préincubation.

L'intériorisation des récepteurs Fc nécessite un mouvement du cytosquelette qui requiert de l'énergie. Dès lors, ce tampon de préincubation, est composé d'une solution phosphate sans inhibiteurs métaboliques (azide de sodium). Nous utiliserons le PBS I (cfr matériel II.1.).

### III.2.1.2. Influence de la préincubation à 37°C.

Nous avons testé l'influence de la température sur 20 échantillons :

- pas de passage à 37°C
- passage d'une heure à 37°C
- de deux heures à 37°C
- de 24 heures à 37°C

Pour ce faire, nous avons travaillé en double marquage :

- CD20 non conjugué + anti-immunoglobulines de surface (CD20nc-IgS)
- CD20 non conjugué + anti-chaîne légère Kappa (CD20nc-K)
- CD20 non conjugué + anti-chaîne légère Lambda (CD20nc-L)
- CD19 non conjugué + anti-immunoglobulines de surface (CD19nc-IgS)
- CD19 non conjugué + anti-chaîne légère Kappa (CD19nc-K)
- CD19 non conjugué + anti-chaîne légère Lambda (CD19nc-L)

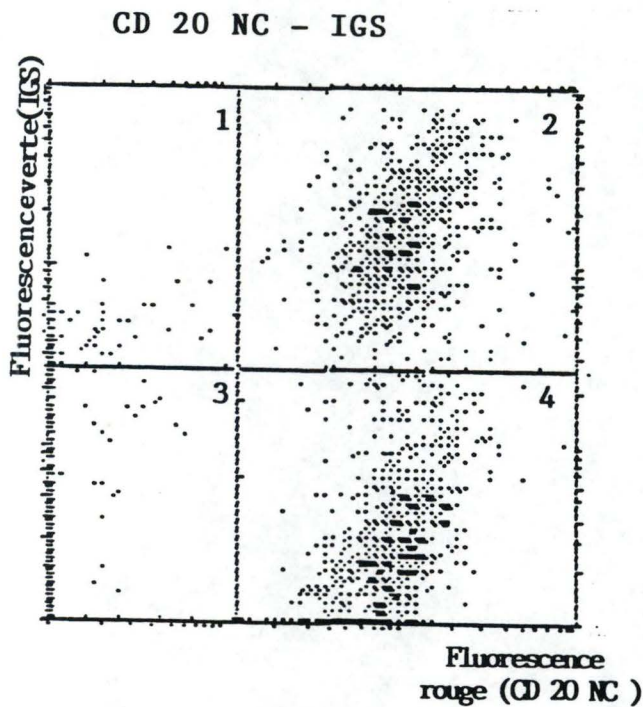
Nous avons évalué la fixation non spécifique des immunoglobulines sur les cellules non B (le taux des cytophiliques) : moyenne sur 20 échantillons :

	Pas de passage à 37°C (%)	1 heure à 37°C (%)	2 heures à 37°C (%)	24 heures à 37°C (%)
CD20 NC-IgS	10	1	2	1
CD20 NC-K	8	2	1	1
CD20 NC-L	10	0	1	0
CD19 NC-IgS	11	2	1	1
CD19 NC-K	10	3	2	0
CD19 NC-L	10	2	0	0

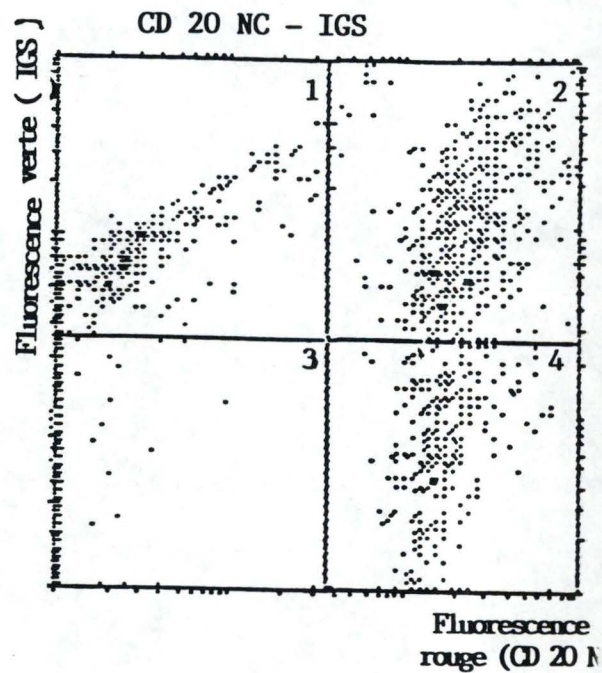
Ces résultats suggèrent qu'il y a en moyenne 10% de cytophiliques.

Illustration de la comparaison entre un passage à 37°C et pas de passage à 37°C.

CELLULES PRE-INCUBEES A 37 °C :



CELLULES NON PRE-INCUBEES A 37 °C :



Rem:

La case 1 indique la fluorescence verte

La case 2 indique la fluorescence verte et rouge

La case 3 indique la fluorescence ni vert ni rouge

La case 4 indique la fluorescence rouge.

Dans ce cas : la case 1 indique les cellules non B présentant les immunoglobulines cytophiliques (IgS-)

La case 2 indique les cellules B présentant des immunoglobulines cytophiliques (IgS+).

Pour les cellules non préincubées à 37°C, la case 1 vaut 10% et la case 2 vaut 15%, pour les cellules pré-incubées à 37°C, la case 1 vaut 1% et la case 2 vaut 8%.

La préincubation à 37°C est absolument nécessaire, non seulement parce que les cytophiliques sont présents sur les cellules non B mais aussi sur les cellules B; ce qui risque de surévaluer le pourcentage de la population positive.

En ce qui concerne le temps de préincubation, nous observons qu'avec un délai de 24 heures, la fixation non spécifique est quasiment nulle; mais ce délai prolongé réduit sensiblement la viabilité cellulaire. Nous n'avons pas observé de différence significative entre la préincubation d'une heure et celle de deux heures. Par conséquent, nous avons choisi un temps de préincubation d'une heure.

**Conclusion** : pour la mise en évidence des immunoglobulines de surface, une préincubation dans du PBS I durant une heure s'avère très nécessaire.

### **III.2.2. L'effet Capping.**

Le capping est un processus de redistribution des déterminants membranaires sur une partie de la surface cellulaire sous l'influence des antigènes ou anticorps. C'est la migration des SIg, après un contact avec l'antigène ou l'anticorps anti-SIg, et le rassemblement en un pôle cellulaire (Cap) suivi d'une pinocytose et dès lors de la disparition de molécules marquées à l'intérieur de la cellule. Le phénomène capping exerce ses effets endéans un temps très court quelle que soit la température.

Le capping requiert de l'énergie qui fait intervenir l'action des microtubules; le capping peut par conséquent être inhibé

- grâce à l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques tels l'azide de sodium
- par une manipulation de cellules à 4°C afin de ralentir l'activité cellulaire.

#### **III.2.2.1. Choix du tampon phosphate.**

Le PBS utilisé contient un inhibiteur métabolique : l'azide de sodium = PBS II (cfr matériel II.1.).

Patient N°	Manipulations avec PBS I	Manipulations avec PBS II
	IgS (%)	IgS (%)
1	6	12
2	3	8
3	3	6
4	5	10
5	2	5
	K (%)	K (%)
1	2	6
2	2	5
3	2	4
4	3	6
5	1	2
	L (%)	L (%)
1	3	7
2	2	4
3	1	2
4	2	5
5	2	2

**Tableau 3** : Comparaison entre une manipulation avec du PBS comprenant de l'azide de sodium (PBS II) et une manipulation avec du PBS ne comprenant pas d'azide de sodium (PBS I) pour un simple marquage d'immunoglobulines de surface (IgS), chaîne légère kappa (K), chaîne légère lambda (L).

*Influence de l'azide de sodium :*

Nous avons testé 5 individus sains :

- lavage et incubation avec du PBS I (sans azide de sodium)
- lavage et incubation avec du PBS II (avec azide de sodium)

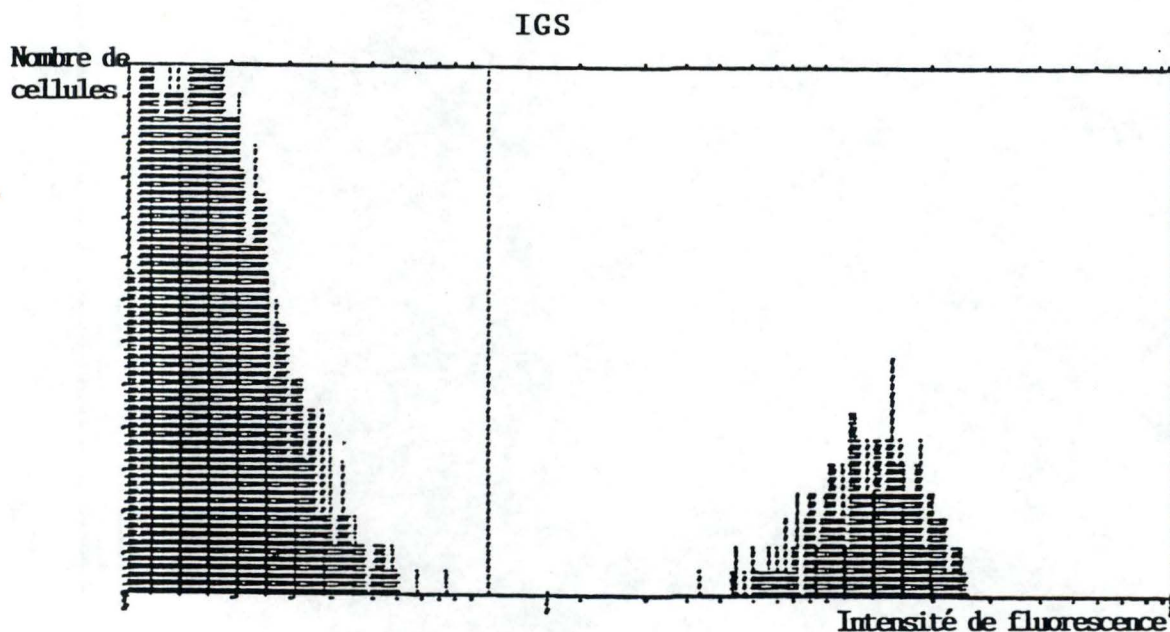
Pour ce faire, nous allons travailler en simple marquage (cfr résultats du tableau 3).

Un pourcentage de pertes des molécules marquées est estimé, entre une manipulation au PBS I et au PBS II

	Pourcentage de perte estimé
IgS	entre 50% et 60%
K	entre 50% et 60%
L	entre 50% et 60%

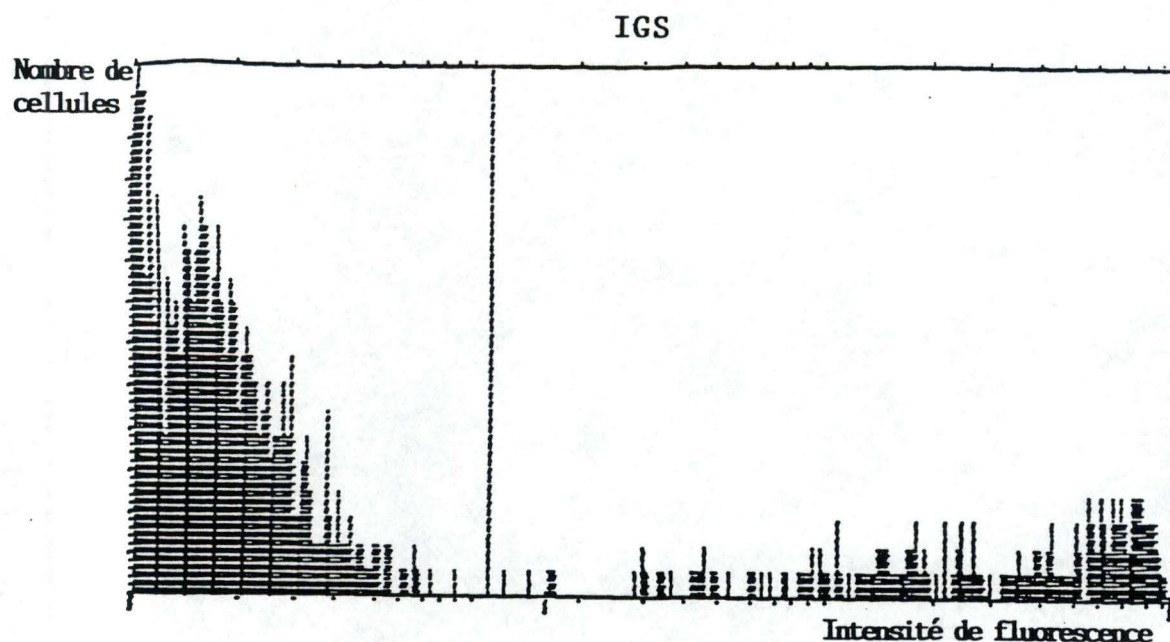
Illustration : comparaison entre une manipulation au PBS I et au PBS II chez un individu sain ayant 13% de lymphocytes B circulants.

MANIPULATION AU PBS I :



Cellules IGS positives : 6 %

## MANIPULATION AU PBS II :



Nous observons que l'utilisation du PBS I, ne contenant pas d'azide de sodium, entraîne la disparition des molécules marquées à l'intérieur de la cellule.

Dès lors, après une préincubation PBS I (cfr la cytophilie), la suite de la méthodologie (dès l'ajout de l'anticorps) recommande l'utilisation du PBS II (capping).

### III.2.2.2. La température

Nous avons observé que les manipulations à température ambiante entraînaient des résultats erronés.

Dès lors, toute manipulation se réalisera automatiquement à 4°C ou dans la glace : ceci limite davantage les phénomènes de capping, d'endocytose et l'adhérence des cellules aux parois du tube.

### **Conclusion :**

Pour l'investigation des SIg, un travail à 4°C avec du PBS II s'avèrera très utile.



### **Conclusion relative à la détermination des SIg :**

Les options choisies sont les suivantes :

- 1) Pour réduire sensiblement le nombre d'Ig cytophiliques, une préincubation à 37°C durant une heure utilisant du PBS sans azide sera la première étape.
- 2) L'incubation doit être suivie d'un lavage avec du PBS II (comprenant l'azide de sodium) préalablement chauffé à 37°C.
- 3) Pour éviter le phénomène de capping, les manipulations seront réalisées par la suite à 4°C en utilisant du PBS II.

### **III.2.3. Intérêt de travailler sur un concentré lymphocytaire.**

Une comparaison a été réalisée entre un phénotypage sur sang total et sur un concentré lymphocytaire.

Il en ressort sur les 20 échantillons que nous avons choisi d'utiliser pour le typage des lymphocytes pathologiques des cellules isolées sur un gradient de densité pour les raisons suivantes :

- Certains antigènes présentent une distribution large qui gêne l'analyse sur sang total.
- L'analyse sur sang total permet difficilement de sélectionner les cellules morphologiquement anormales lorsque leur pourcentage est faible.
- Il est illusoire d'éliminer toutes les hématies grâce à la solution "lyse" utilisée pour le sang total. Dès lors une contamination des lymphocytes par les hématies peut perturber les résultats.
- La lyse entraîne une altération des cellules à analyser.
- Au paragraphe 3.2.2., nous avons conclu que toutes les opérations de marquage devaient se dérouler à 4°C. Hémolyser à 4°C est quasiment impossible; à moins de laisser la solution "lyse" en présence du sang durant un temps relativement long mais ceci entraîne également une mort cellulaire plus importante.

La technique de marquage sur sang total permet la réalisation d'un typage lymphocytaire rapide et fiable, si on respecte les limites. Elle apporte un gain de temps. Elle doit être réservée à des cas simples, pour lesquels il est maintenant bien démontré que la méthode donne de bons résultats : pour un simple phénotypage des sous-populations

Patient N°		CD2(%)	CD8(%)	CD4(%)	CD20c(%)	
1	sang total	84	30	51	7	
	CMN	82	31	45	5	
2	sang total	77	21	46	9	
	CMN	79	28	44	9	
3	sang total	87	19	63	7	
	CMN	90	16	70	6	
4	sang total	88	17	53	3	
	CMN	88	17	54	3	
5	sang total	81	10	62	6	
	CMN	81	11	64	5	
6	sang total	80	26	51	5	
	CMN	79	22	50	10	
7	sang total	78	19	53	7	
	CMN	80	18	54	8	
8	sang total	87	15	63	5	
	CMN	90	13	67	4	
9	sang total	90	36	44	4	
	CMN	88	37	43	6	
10	sang total	73	32	30	9	
	CMN	75	0	33	10	
11	sang total	75	58	12	11	
	CMN	76	60	12	12	
12	sang total	67	35	32	9	
	CMN	78	36	34	13	
13	sang total	69	48	8	19	
	CMN	63	45	7	22	
14	sang total	83	33	30	2	
	CMN	81	34	30	3	
15	sang total	87	45	30	3	
	CMN	85	45	31	4	
		CD2(%)	CD20C(%)	CD20NC (%)	CD20NC -K (%)	CD20NC -L (%)
LLC	sang total	14	*	85	1	78
	CMN	13	*	82	1	79

CMN : cellules mononucléées ; CD2 : marqueur pan lymphocytes T ; CD8 : marqueurs lymphocytes T supresseurscytotoxiques ; CD4 : marqueurs lymphocytes T helpers ; CD20 : marqueurs pan lymphocytes B. \* : absence de discrimination entre populations négative et positive.

**Tableau 4 : comparaison du marquage direct sur sang total et sur un concentré lymphocytaire**

lymphocytaires, nous n'observons aucune différence dans le pourcentage (cfr tableau 4).

Pour les raisons évoquées plus haut, la détection des immunoglobulines de surface requiert un concentré lymphocytaire ; malgré qu'aucune différence significative n'ait été observée dans le pourcentage de population lymphocytaire.

### III.2.4. Standardisation du nombre de cellules.

Certains auteurs conseillent de fixer le nombre de cellules pour réaliser un typage (entre  $10^5$  et  $10^6$  cellules par ml).

Nous avons testé un cas de LLC : pour ce faire nous avons réalisé un marquage

- CD19 non conjugué (CD19nc)
- CD20 non conjugué (CD20nc)
- CD20 non conjugué-Kappa (CD20nc-K)
- CD20 non conjugué-Lambda (CD20nc-L)

Les concentrés lymphocytaires sont de

- $58 \cdot 10^9$  cellules/litre
- $33 \cdot 10^9$  cellules/litre
- $18 \cdot 10^9$  cellules/litre
- $13 \cdot 10^9$  cellules/litre
- $5 \cdot 10^9$  cellules/litre

	58. 10e9 cellules par litre (%)	33. 10e9 cellules par litre (%)	18. 10e9 cellules par litre (%)	13. 10e9 cellules par litre (%)	5. 10e9 cellules par litre (%)
CD19 NC	85	85	86	86	85
CD20 NC	89	82	88	89	90
CD20 NC - K	0	1	1	1	2
CD20 NC - L	82	80	81	82	82

Il ressort de cette analyse que la dilution du concentré lymphocytaire n'influence pas les résultats.

Remarquons d'autre part que la titration des anticorps monoclonaux utilisés a été préalablement définie au laboratoire.

Patient N°	IgS c (direct) (%)	IgS nc (indirect) (%)	K c (direct) (%)	K nc (indirect) (%)	L c (direct) (%)	L nc (indirect) (%)
1	18	14	9	7	8	6
2	*	18	11	18	*	18
3	15	11	9	7	5	3
4	13	12	8	6	8	6
5	7	6	4	3	3	3
6	7	6	3	3	4	4
7	10	11	6	7	5	5
8	13	10	6	6	7	5
9	*	10	*	*	*	*
10	8	8	4	4	3	2
11	7	6	5	3	2	2

\* : populations négative et positive mal séparées  
c : conjugué ; nc : non conjugué

Tableau 5 : Comparaison d'un marquage direct et indirect chez des individus sains.

Patient N°	IgS c (direct) (%)	IgS nc (indirect) (%)	K c (direct) (%)	K nc (indirect) (%)	L c (direct) (%)	L nc (indirect) (%)
1	70	/	50	15	12	10
2	85	/	1	0	85	85
3	78	/	*	*	*	*
4	*	/	*	1	*	*
5	91	/	93	90	1	0
6	74	/	*	*	*	*
7	73	72	72	72	1	0
8	*	/	*	*	*	*
9	80	81	78	79	1	0
10	85	85	83	83	2	1
11	76	75	4	2	77	75
12	*	/	*	*	*	*
13	90	/	83	83	1	1
14	*	/	*	1	*	75
15	*	*	*	*	*	*
16	*	*	*	*	*	*

\* : absence de discrimination entre populations positive et négative  
/ : expérience non réalisée  
nc : non conjugué ; c : conjugué

Tableau 6 : Comparaison d'un marquage direct et indirect chez des individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif B (LLC)

### **III.2.5. Type de marquage.**

#### **III.2.5.1. Simple marquage : direct ou indirect.**

Beaucoup d'auteurs utilisent pour l'analyse des immunoglobulines de surface, le simple marquage

- anti-chaîne lourde (IgS)
- anti-chaîne légère Kappa (K)
- anti-chaîne légère Lambda (L)

Nous avons comparé

- le simple marquage direct c'est à dire un marquage avec des anticorps directement conjugué au FITC.
- le simple marquage indirect c'est à dire un marquage avec des anticorps non conjugués au FITC (marquage en deux étapes).

11 échantillons d'individus sains et 16 d'individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif ont été analysés.

Il ressort de cette analyse que le marquage indirect n'apporte aucune amélioration sensible.

- chez les individus sains : 11 cas analysés (cfr tableau 5)

Dans 82% des cas, nous pouvons préciser la nature des immunoglobulines de surface. Un marquage indirect n'apporte aucune amélioration.

- Chez les individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif (surtout LLC) : 16 cas analysés (cfr tableau 6)

Dans 56% des cas, il n'est pas possible de préciser la nature des immunoglobulines par un marquage direct. La méthode indirecte n'apporte qu'une légère amélioration.

#### **Conclusion :**

Le simple marquage aussi bien par méthode directe que par méthode indirecte ne convient pas pour préciser la nature Kappa ou Lambda des chaînes légères chez les individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif.

Patient N°	S.M. IgS c (%)	Double marquage		S.M. Kc (%)	Double marquage		S.M. Lc (%)	Double marquage	
		CD20c-IgS (%)	CD20nc-IgS (%)		CD20c-K (%)	CD20nc-K (%)		CD20c-L (%)	CD20nc-L (%)
1	18	/	10	9	/	6	8	/	5
2	*	/	15	11	/	11	*	/	8
3	7	/	6	4	/	3	3	/	3
4	13	/	10	8	/	6	8	/	5
5	15	/	11	9	/	8	5	/	5
6	7	6	6	3	2	3	3	3	2
7	10	8	9	6	5	5	5	4	5
8	*	4	5	*	3	3	*	2	3
9	8	6	6	4	3	3	3	2	2
10	7	6	5	5	4	4	2	2	3
11	19	13	15	15	8	9	16	7	8
12	10	8	8	6	6	6	3	2	3
13	8	5	5	2	2	2	2	2	1
14	*	6	6	*	3	3	*	2	2
15	6	5	5	5	3	4	2	3	2
16	4	4	4	1	1	2	2	2	2
17	8	6	7	5	3	3	4	3	3
18	10	7	8	6	5	5	5	3	2
19	6	6	6	3	3	3	2	2	1
20	6	6	7	3	2	2	4	4	4

\* : absence de discrimination entre populations positive et négative

/ : expérience non réalisée

c : conjugué ; nc : non conjugué

Tableau 7 : Comparaison entre le simple marquage (SM) et le double marquage chez les individus sains.

Pat. N°	S.M. IgSc (%)	D.M. CD20nc-IgSc (%)	D.M. CD19nc-IgSc (%)	S.M. Kc (%)	D.M. CD20nc-Kc (%)	D.M. CD19nc-Kc (%)	S.M. Lc (%)	D.M. CD20nc-Lc (%)	D.M. CD19nc-Lc (%)
2	76	80	/	4	3	5	77	79	75
3	*	15	/	*	11	15	*	1	1
4	90	71	/	83	70	74	1	2	1
5	85	82	/	1	1	1	83	82	80
6	/	20	/	22	20	23	2	3	3
7	*	73	72	*	67	68	*	1	2
8	*	87	/	*	87	91	*	1	1
9	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10	*	76	/	*	66	/	*	5	/
11	*	72	85	*	68	79	*	6	5
12	73	75	68	72	65	66	1	16	4
13	85	76	73	1	1	1	85	7	71
14	*	67	/	*	0	0	*	65	66
15	91	73	/	93	73	70	1	1	1
16	56	55	54	*	4	4	*(7)	53	50
17	/	41	/	*	42	41	*	3	1
18	*	*(63)	/	*	*(63)	1	*	*(58)	*(47)
19	*(11)	*	*(2)	*(9)	*(2)	*(1)	*	*(2)	*(2)
20	*	*	*	*	*	*	*	*	*
21	27	17	19	9	8	9	16	16	17
22	*(70)	*(75)	/	*(50)	*(65)	/	*(62)	*(20)	/

\* : absence de discrimination entre populations négative et positive

/ : expérience non réalisée

c : conjugué ; nc : non conjugué

Tableau 8 : Comparaison entre le simple marquage (S.M.) et le double marquage (D.M.) chez les sujets atteints d'un syndrome lymphoprolifératif (LLC)

### III.2.5.2. Le double marquage

#### III.2.5.2.1. Les individus sains.

21 cas ont été analysés : nous avons comparé les résultats du simple marquage et du double marquage :

- IgS / CD20 non conjugué-IgS / CD20 conjugué-IgS
- Kappa (K) / CD20 non conjugué-K / CD20 conjugué-K
- Lambda (L) / CD20 non conjugué-L / CD20 conjugué-L

(cfr tableau 7)

Dans 81% des cas, le simple marquage donne une bonne résolution pour la mise en évidence des immunoglobulines de surface (ce qui rejoint le paragraphe 3.2.5.1.). Le double marquage apporte une résolution de 100%. Nous n'observons aucune différence significative dans les résultats (au niveau des pourcentages) obtenus avec le double marquage CD20 conjugué-IgS, Kappa, Lambda et le CD20 non conjugué-IgS, Kappa, Lambda.

#### III.2.5.2.2. Les individus atteints d'un syndrome lymphoprolifératif.

22 cas ont été analysés.

La comparaison s'est effectuée entre le simple marquage et le double marquage :

- IgS / CD20 non conjugué-IgS / CD19 non conjugué-IgS
- Kappa (K) / CD20 non conjugué-K / CD19 non conjugué-K
- Lambda (L) / CD20 non conjugué-L / CD19 non conjugué-L

(cfr tableau 8).

Il en ressort que le double marquage permet de préciser la nature des chaînes légères K et L dans 77% des cas ; alors que le simple marquage donne au maximum 40% de résolution. Le double marquage utilisant un réactif CD20 conjugué n'est pas intéressant lorsque le CD20 conjugué ne permet pas de séparer les lymphocytes B ; c'est à dire dans 88% des cas (utilisé en simple marquage).

#### **Conclusion :**

La méthode indirecte des lymphocytes B pathologiques améliore sensiblement la mise en évidence de la population B. Cette amélioration

est mise à profit pour réaliser le double marquage, permettant de préciser la nature K ou L des chaînes légères de surface.

### III.2.5.3. Précautions à prendre lors du double marquage.

Une des principales difficultés du double marquage est liée à l'usage de réactifs non conjugués.

Ceci s'est révélé lors de doubles marquages tels CD20 non conjugué-CD5 conjugué (CD5 étant marqueur panT) chez les individus sains.

#### 1) *Expérience 1.*

Double marquage CD20 non conjugué-CD5 conjugué où dans un premier temps nous avons ajouté au sang simultanément le CD20 non conjugué et le CD5 conjugué à la phycoérythrine (PE); après une incubation de 20 minutes et un lavage, nous avons dans un second temps ajouté le FITC.

Résultats :

Patient N°	CD20 nc (témoin)(%) 1	CD20 nc (FITC)- CD5 c (PE) (%) → 2	CD20 nc (FITC) passage en fluorescence verte (%) 3
1	5	49	48
2	2	64	63
3	6	80	81
4	7	66	65
5	3	46	41
6	7	85	85
7	4	83	82
8	4	82	82
9	6	62	60
10	4	40	*
11	8	57	56

\* : absence de discrimination entre populations négative et positive

Le double marquage CD20 non conjugué-CD5 conjugué se révèle positif. Or il est insensé de retrouver chez les individus sains des cellules à la fois B et T (colonne 2). Nous observons que le FITC est venu se fixer sur le CD20 non conjugué mais aussi sur le CD5 conjugué (PE)(colonne 3).



### **Conclusion :**

Nous ne pouvons pas ajouter simultanément un réactif conjugué et non conjugué.

### **2) Expérience 2.**

Comparaison d'un double marquage CD20 non conjugué (FITC)-CD5 conjugué (PE)

- où le non conjugué a été réalisé dans un premier temps
- où le conjugué a été réalisé dans un premier temps.

Résultats :

Patient N°	CD20 nc (témoin)(%)	CD20nc-CD5c (%)	CD5c-CD20nc (%)
	1	2 (1)*	3 (2)*
1	6	7	73
2	7	9	71
3	3	4	60
4	5	7	78
5	6	6	79
6	6	8	79
7	6	6	73
8	7	8	40
9	6	5	61
10	5	7	58

(1)\* : le non conjugué est réalisé dans un premier temps

(2)\* : le conjugué est réalisé dans un premier temps

Lorsque le non conjugué est réalisé en second lieu, nous observons une fixation aspécifique du FITC sur le CD5 conjugué (colonne 3).

### **Conclusion :**

Il est absolument nécessaire d'effectuer en premier lieu le marquage avec le réactif non conjugué.

### **3) Vigilance dans le travail :**

Il faut laver au minimum deux fois après l'addition du fluorochrome (qui révèle la liaison du réactif non conjugué à l'antigène), afin d'éviter une fixation non spécifique de celui-ci sur le réactif conjugué que nous ajoutons par après.

### **Conclusion générale :**

Tout double marquage doit se réaliser en effectuant dans un premier temps le non conjugué. Ce double marquage réalisé, deux lavages s'avèrent nécessaires.

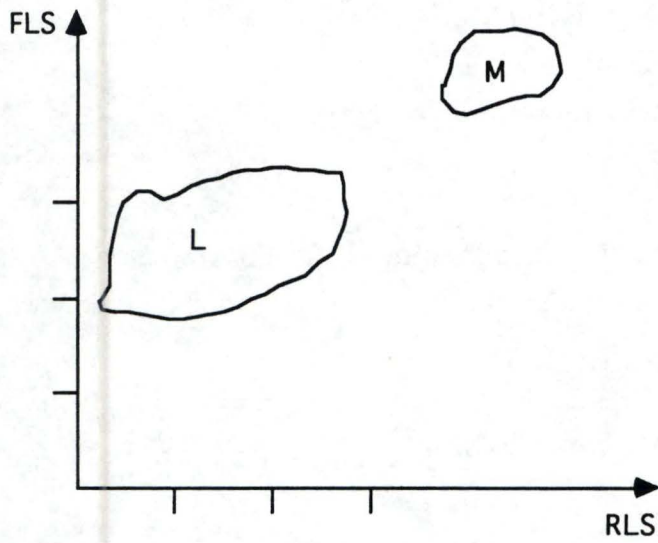
### **III.2.6. Méthode personnelle utilisée dans la mise en évidence des immunoglobulines de surface (chaîne lourde, Kappa, Lambda).**

- Prendre un échantillon sanguin.
- Réaliser un concentré lymphocytaire.
- Prendre 200 µl pour chaque typage.
- Laver avec du PBS I (centrifuger 3 minutes à 1.100 x g).
- Enlever le surnageant et ajouter au culot 3 ml de PBS I.
- Laisser incuber une heure à 37°C (mélanger de temps en temps).
- Centrifuger 3 minutes à 1.100 x g.
- Laver avec du PBS II préchauffé à 37°C.
- Enlever le surnageant et ajouter l'anticorps monoclonal CD20 non conjugué.
- Incuber 20 minutes à 4°C.
- Laver avec du PBS II à 4°C.
- Enlever le surnageant et ajouter le fluorochrome (PE).
- Incuber 20 minutes à 4°C.
- Laver 2 fois avec du PBS II à 4°C.
- Ajouter les anticorps monoclonaux anti-IgS, anti-Kappa, anti-Lambda directement conjugués au FITC.
- Laisser incuber 30 minutes dans la glace.
- Laver deux fois avec PBS II.
- Resuspendre le culot dans 1 ml de PBS II.

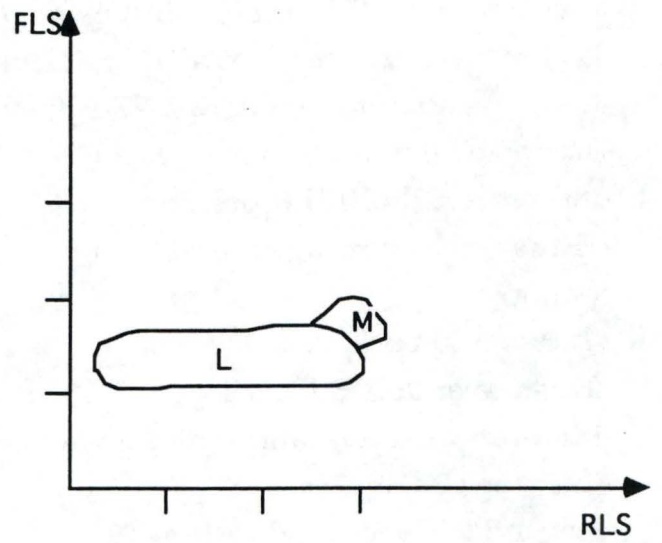
### **III.3. LES IMMUNOGLOBULINES INTRACYTOPLASMIQUES.**

La perméabilisation membranaire est nécessaire pour la mise en évidence des antigènes intracytoplasmiques. L'agent perméabilisant doit maintenir suffisamment l'intégrité cellulaire pour être utilisable en CFM. L'intégrité de la membrane cellulaire doit être rompue sans provoquer toutefois une désintégration totale de celle-ci et dès lors une lyse.

Cellules non traitées

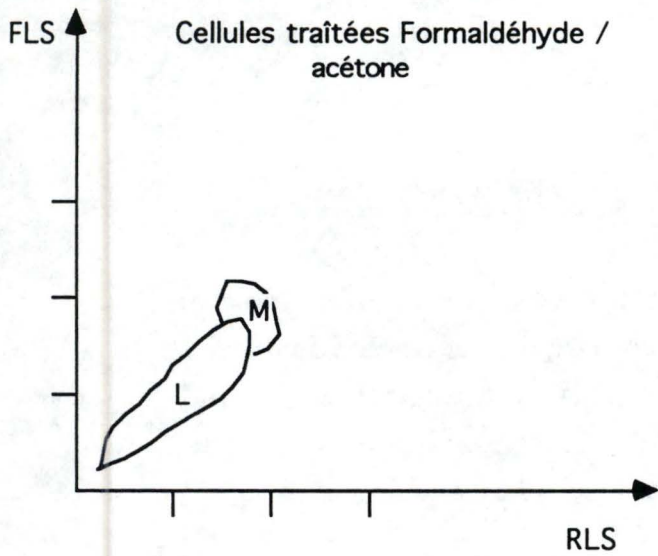


Cellules traitées Ethanol/Acide acétique



L = lymphocytes  
M = monocytes

Cellules traitées Formaldéhyde /  
acétone



La perméabilisation des cellules est objectivée sur le cytogramme par un abaissement du spot des lymphocytes. Ceci correspond à une diminution de la densité du FLS sans modification du RLS.

Un premier marquage est effectué sur des cellules non traitées par un agent perméabilisant : nous obtenons ainsi le pourcentage de lymphocytes immunoglobulines de surface (IgS+). Un deuxième marquage est effectué sur des cellules perméabilisées. L'agent perméabilisant ne devant pas altérer les antigènes de surface, la fluorescence observée après traitement, correspond aux immunoglobulines de surface et aux éventuelles immunoglobulines intracytoplasmiques.

### **III.3.1. Essais des différentes méthodes décrites dans la littérature (cfr paragraphe II.2.5.2.).**

#### **III.3.1.1. : Méthodes au KCl/Méthanol, formaldéhyde/acétone, éthanol-acide acétique/formaldéhyde/acétone.**

Ces méthodes ont été testées à plusieurs reprises et à différentes concentrations.

Il ressort des essais réalisés :

- La perméabilisation des cellules mononucléées engendre une superposition des propriétés de diffusion de la lumière ( FLS et RLS) et par là une incapacité de séparer suffisamment les lymphocytes des monocytes (voir illustrations ci-contre ).

- Ces méthodes entraînent en outre une perte de 85% des cellules. Nous avons testé ces méthodes sur des sujets sains, pour lesquels une perméabilisation ne doit pas entraîner une augmentation du pourcentage des lymphocytes après le marquage ( le % des SIg = le % des CIg). Ces témoins présentaient une positivité de 8 % avant la perméabilisation et de 90 à 95% après la perméabilisation. La fluorescence observée est dès lors non spécifique.

Pour ces deux raisons, nous avons écartés ces 3 méthodes.

Il est à remarquer que quand l'antigène est situé à l'intérieur de la cellule, les cellules sont préalablement fixées. L'étape de fixation précède le marquage car les marqueurs fluorescents ne pénètrent pas généralement dans les cellules vivantes. La fixation à l'éthanol, au méthanol, ou au formaldéhyde dissout les lipides de la membrane cytoplasmique et la perméabilise. Cette fixation a comme facteur limitant la diffusion et l'accessibilité à l'antigène.

Le traitement par des agents perméabilisants améliore la perméabilisation mais peut détruire certaines protéines membranaires.

### III.3.1.2. La méthode à la lysolécithine.

Cette méthode a dans un premier temps été testée sur des sujets sains. Pour ce faire nous avons pris une concentration en lysolécithine de 2,5 µg par ml de PBS I tel que décrit dans la littérature. Nos méthodes ont été testées en simple marquage avec un réactif non conjugué.

Les résultats ne nous montrent pas de différence significative entre le pourcentage observé avant et après le traitement de perméabilisation. De plus, sur le cytogramme exprimant le FLS en fonction du RLS, nous observons que le traitement à la lysolécithine entraîne une légère diminution du FLS des lymphocytes et maintient les différences dans les propriétés du RLS des différentes populations (lymphocytes et monocytes). La lysolécithine ne semble pas altérer les antigènes membranaires.

Dans un second temps, nous avons testé cette méthode sur des lymphocytes B de LLC. Pour ce faire, nous avons pris des concentrations de lysolécithine croissantes :

- 1,5 µg/ml de PBS I
- 2,5 µg/ml de PBS I
- 5 µg/ml de PBS I
- 8 µg/ml de PBS I

Pat. N°	CD20 nc(%)	% avant traitement		% après traitement							
		K	L	1,5 µg/ml		2,5 µg/ml		5 µg/ml		8 µg/ml	
				K	L	K	L	K	L	K	L
1	84	82	1	90	92	96	92	97	98	91	96
2	76	67	2	96	93	88	90	99	98	99	96
3	67	60	4	89	91	90	91	99	98	100	98

Nous observons une fluorescence non spécifique qui est probablement due d'une part à la présence de débris cellulaires (témoins de la lyse) et d'autre part en raison d'une fluorescence membranaire peu élevée qui constitue un facteur limitant pour la méthode à la lysolécithine.

Ceci limite automatiquement l'application de cette méthode à la lysolécithine dans l'étude des syndromes lymphoprolifératifs de type B.

### III.3.1.3. La méthode à la saponine / paraformaldéhyde.

Cette méthode a dans un premier temps été testée sur des sujets sains. Les concentrations en saponine sont croissantes :

- 15 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde
- 20 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde
- 25 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde
- 30 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde

Pat. N°	% avant traitement		% après traitement							
	K	L	15 mg/10 ml		20 mg/10 ml		25 mg/10 ml		30 mg/10 ml	
			K	L	K	L	K	L	K	L
1	3	4	3	3	3	8	56	69	92	96
2	1	3	3	3	7	10	66	71	96	90
3	4	4	4	6	5	9	15	18	88	90
4	4	2	5	3	10	5	48	47	58	62
5	5	3	6	3	8	5	17	58	72	86
6	4	3	6	3	11	6	51	60	94	92
7	3	3	3	4	12	13	62	59	85	91
8	2	3	2	3	6	8	19	28	66	78
9	3	*	3	2	9	44	40	59	98	99
10	3	4	3	5	13	7	28	62	58	96

\* : Absence de discrimination entre populations négative et positive

Nous remarquons qu'une fluorescence non spécifique apparaît quand la concentration en saponine est plus grande que 20 mg / 10 ml de PBS I.

Quand nous utilisons une concentration de 15 mg / 10 ml de PBS I nous n'observons pas de différence dans l'intensité de la fluorescence : le traitement à la saponine / paraformaldéhyde permet dès lors une stabilité des immunoglobulines de surface.

La concentration en saponine sélectionnée pour la perméabilisation des lymphocytes de sujets sains est de 15 mg / 10 ml de PBS I. Mais il est important que le nombre de cellules mononucléées ne dépasse pas les  $30 \cdot 10^9$  cellules/litre.

Dans un second temps cette méthode a été testée sur des LLC. Les concentrations en saponine sont croissantes :

- 15 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde
- 20 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde
- 25 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde
- 30 mg / 10 ml de PBS I + 250 µl de paraformaldéhyde

Pat. N°	CD 20 nc (%)	% avant traitement		% après traitement							
		K	L	15 mg/10 ml		20 mg/10 ml		25 mg/10 ml		30mg/10ml	
				K	L	K	L	K	L	K	L
1	74	72	4	71	4	71	4	80	5	93	96
2	70	64	1	65	0	65	1	72	2	95	89
3	86	2	78	2	78	2	79	3	87	86	91
4	81	70	2	69	2	70	2	82	3	92	97
5	62	52	1	53	2	53	2	59	2	89	92
6	78	66	4	79	88	70	76	78	79	80	99
7	84	3	79	70	97	96	98	98	100	98	99

Il apparaît que la saponine donne de meilleurs résultats que la lysolécithine. Dans 2 cas sur 7 cas analysés de LLC, nous observons toutefois une fluorescence non spécifique quelle que soit la concentration en saponine utilisée.

Il semblerait que pour la LLC, la concentration en saponine de 15 mg / 10 ml de PBS I n'est pas suffisante pour perméabiliser la membrane cellulaire. La concentration de 30 mg / 10 ml de PBS I semblerait trop élevée. La concentration idéale que nous avons adoptée est comprise entre 20 et 25 mg / 10 ml de PBS I. Cependant il faut être prudent dans cette

affirmation car la standardisation du nombre de cellules n'a pas été évaluée.

### **III.3.2. Mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques par la CFM et par la microscopie à fluorescence.**

L'appréciation de la fluorescence en microscopie à fluorescence dans le cas de ces syndromes lymphoïdes prolifératifs n'est pas très évidente. Une comparaison objective n'a pu être réalisée dans de bonnes conditions.

C'est pourquoi il est important d'essayer la méthode de mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques par CFM.

### **III.3.3. Conclusion**

La méthode à la saponine semble intéressante pour autant qu'on utilise des concentrations bien déterminées en fonction du type de patient. En outre une standardisation du nombre de cellules semble nécessaire pour éviter une fluorescence non spécifique.

#### **Méthode personnelle utilisée pour la mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques de lymphocytes pathologiques :**

- Préparer une solution contenant 25 mg de saponine, 10 ml de PBS I et 250 µl de paraformaldéhyde (solution à stocker à 4°C)
- Réaliser un concentré lymphocytaire sur un échantillon sanguin.
- Prendre 200 µl de cellules mononucléées et y ajouter 1 ml de la solution à la saponine.
- Mélanger fortement.
- Incuber 5 minutes à 4°C
- Laver avec du PBS I.
- Continuer le marquage comme pour les SIg.



## IV. APPLICATIONS ET DISCUSSIONS.

### 1° LLC et autres syndromes lymphoprolifératifs B pour lesquels le caractère monoclonal est démontré par les SIg ( et les CIg).

#### 1° LLC et autres syndromes lymphoprolifératifs B pour lesquels le caractère monoclonal est démontré par les SIg ( et les CIg).

PATHOLOGIE LYMPHOÏDE B	CD20c S.M. (%)	CD20nc S.M. (%)	IgS S.M. (%)	K S.M. (%)	L S.M. (%)	CD20nc-IgS D.M. (%)	CD20nc-K D.M. (%)	CD20nc-L D.M. (%)	K surf+ intracyt (%)	L surf+ intracyt (%)
LLC1	*	74	*	*	*	75	72	4	80	5
LLC2	*	76	79	5	79	78	4	77	/	/
LLC3	*	62	*	*	*	65	62	0	/	/
LLC4	*	84	76	70	7	72	68	6	78	7
LLC5	*	88	/	*	*	87	87	1	94	94
LLC6	*	80	*	*	*	73	70	2	79	2
LLC7	*	92	84	2	78	76	1	72	3	87
LLC8	*(38)	64	62	59	1	63	57	1	64	4
LLC9	*	95	/	*	*	76	66	5	/	/
LLC10	*	59	55	2	52	55	4	53	/	/
LLC11	*	70	63	63	1	60	64	1	72	2
LLC12	*	86	*	*	*	78	2	78	3	87
LLC13	*	84	/	*	*	80	3	79	98	100
LLC14	*	81	*	*	*	78	70	2	82	3
LLC15	*	78	/	65	5	69	66	4	78	79
LLC16	*	66	*	*	*	62	56	2	65	3
LLC17	*	62	*	*	*	59	52	1	59	2
LLC18	*	62	/	*	*	55	1	52	3	60
LLC19	74	81	/	*	*	71	70	1	82	5
LLC20	*	83	70	1	66	67	0	65	3	86
LLC21	83	82	*	*	*	82	1	82	/	/
LLC22	*	85	*	*	*	73	73	1	/	/
LLC23	*	52	43	40	2	41	42	3	50	6
LLC24	*	77	/	*	*	/	69	12	88	97
Lph 1	*	36	30	27	6	26	26	7	/	/
Lph 2	12	13	*	*	*	14	14	2	/	/
WLD1	*	23	19	19	2	20	20	3	26	4
WLD2	*	11	*	*	*	15	11	1	19	2
WLD3	*	29	*	*	*	17	14	3	17	3

S.M. : simple marquage ; D.M. : double marquage ; c : conjugué ; nc : non conjugué

\* : absence de discrimination entre populations positive et négative

/ : expérience non réalisée

LLC : leucémie lymphoïde chronique

Lph : lymphome

WLD : maladie de Waldenström

Nous observons que :

- 1) Dans 26 cas sur 29 cas de pathologie lymphoïde B, l'utilisation d'un réactif non conjugué (CD20 non conjugué) a permis l'individualisation de la population B pathologique.
- 2) Dans 11 cas sur 29 cas de pathologie lymphoïde B, la monoclonalité a pu être déterminée par un simple marquage : Dans les 18 cas restant, un recours au double marquage a été nécessaire pour objectiver la monoclonalité.

**2° LLC et autres syndromes lymphoprolifératifs B pour lesquels le caractère monoclonal n'est pas affirmé par les SIg mais affirmé par les CIg.**

PATHOLOGIE LYMPHOÏDE B	CD20c S.M. (%)	CD20nc S.M. (%)	IgS S.M. (%)	K S.M. (%)	L S.M. (%)	CD20nc-IgS D.M. (%)	CD20nc-K D.M. (%)	CD20nc-L D.M. (%)	K surf+ intracyt (%)	L surf+ intracyt (%)
LLC1	*	71	*	*	*	54	54	64	69	5
LLC2	*	56	*	*	*	18	17	15	39	4
WLD1	*(3)	33	5	6	5	3	2	2	3	29
Lph 1	25	26	*	*	*	7	7	6	4	20

S.M. : simple marquage ; D.M. : double marquage

c : conjugué ; nc : non conjugué

\* : absence de discrimination entre populations positive et négative

WLD = maladie de Waldenström

LCC = leucémie lymphoïde chronique

Lph = lymphome

Nous observons que :

- 1) Dans 3 cas sur 4 cas de pathologie lymphoïde B, la population B pathologique est révélée uniquement par un réactif CD20 non conjugué.
- 2) Dans ces quatre cas, la mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques permet de déterminer la nature de la monoclonalité.

**3° LLC et autres syndromes lymphoprolifératifs B où la monoclonalité n'a pu être affirmée ni par le biais des SIg ni par le biais des CIg.**

PATHOLOGIE LYMPHOÏDE B	CD20c S.M. (%)	CD20 nc S.M. (%)	IgS S.M. (%)	K S.M. (%)	L S.M. (%)	CD20nc-IgS D.M. (%)	CD20nc-K D.M. (%)	CD20nc-L D.M. (%)	K surf+ intracyt (%)	L surf+ intracyt (%)
LLC1	*(26)	84	/	*	*	10	10	8	74	84
LLC2	*(8)	75	8	26	19	18	12	13	99	98
LLC3	*	73	1	*	*	*	*	*	*	*
LLC4	*	73	/	*	*	63	63	58	*	*
Lph1	*	36	*	*	*	18	16	12	58	68
Lph2	39	44	18	20	21	17	8	16	36	29
Lph3	22	18	*	*	*	19	23	19	20	22

S.M. : simple marquage ; D.M. : double marquage ; \* : absence de discrimination entre populations positive et négative ; / : expérience non réalisée ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; Lph : lymphome.

Nous observons que :

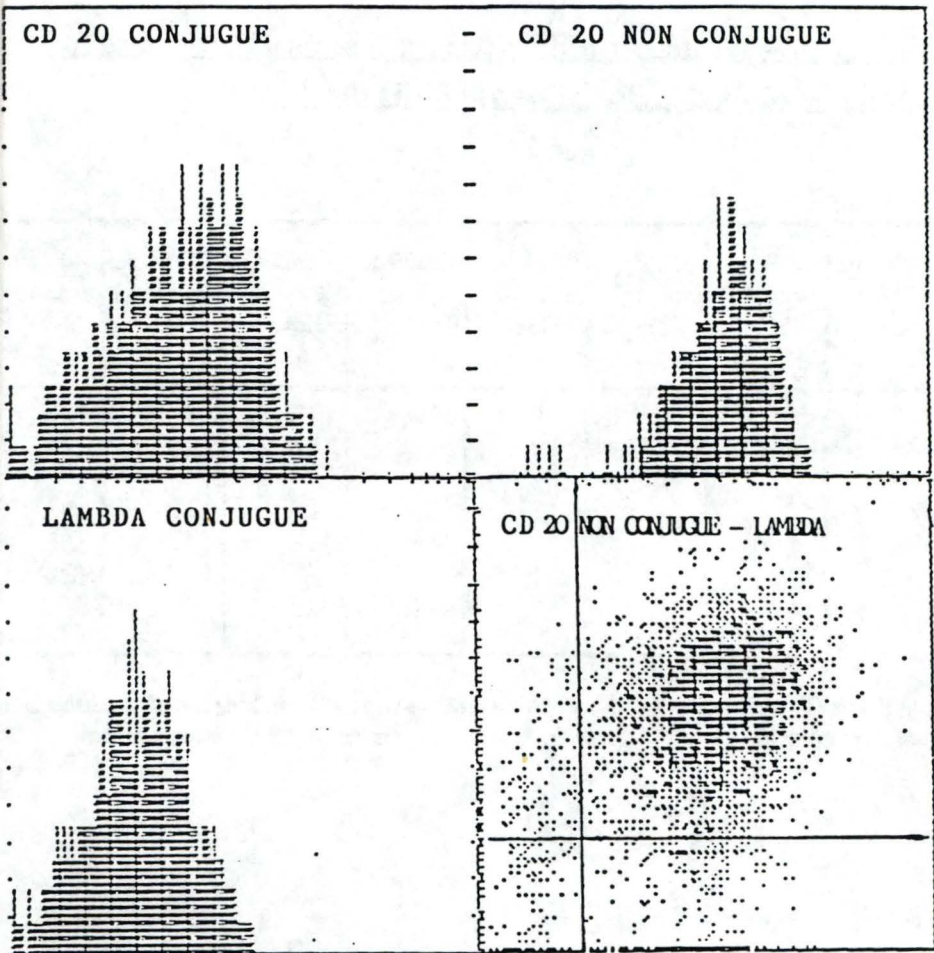
- 1) Dans 5 cas sur 7 cas de pathologie lymphoïde B, la population B pathologique est révélée uniquement par un réactif CD20 non conjugué.
- 2) La monoclonalité de ces 7 cas ne peut être affirmée. Ceci est probablement lié à l'hétérogénéité des cellules au sein d'une même pathologie (populations hétérogènes dans la LLC).

**Conclusion :**

Sur les 40 cas de pathologie lymphoïde B (LLC essentiellement) :

- Dans 40 cas la population lymphoïde B pathologique a pu être mise en évidence grâce à un réactif non conjugué.
- Dans 29 cas, nous avons pu mettre en évidence le caractère monoclonal par les seuls SIg utilisés en double marquage.
- Dans 4 cas, le caractère monoclonal n'a pu être affirmé que par le biais des CIg.

Ceci signifie que dans 33 cas sur 40 la nature B et le caractère monoclonal ont pu être conjointement objectivés.



## V. ILLUSTRATIONS

### **1er cas, Alexis** (70 ans) : LLC-B

-Leucocytes :  $38 \cdot 10^9$  / litre (Réf. : 4,2 - 9,0)

Lymphocytes : 86% (Réf. : 20 - 40)

Ces lymphocytes sont des petits lymphocytes mottés ( aspect caractéristique de la LLC)

#### - Résultat du phénotypage :

\* CD2 (panT) : 12% (Réf. : 70 - 90)

\* CD20c : \* (Réf. : < 15)

\* CD20nc : 92%

\* CD19c : \*

\* CD19nc : 90%

\* IgS (simple marquage) : \*

\* K (simple marquage) : \*

\* L (simple marquage) : \*

\* CD20nc-IgS : 76%

\* CD20nc-K : 1%

\* CD20nc-L : 72% Rapport K/L : 0,014

\* CD19nc-IgS : 75%

\* CD19nc-K : 1%

\* CD19nc-L : 71%

\* Kappa surface et intracytoplasmique : 3%

\* Lambda surface et intracytoplasmique : 87%

(\* = mauvaise discrimination entre populations négative et positive).

cfr illustrations ci-contre )

### **- Conclusions**

\* Le réactif non conjugué CD20 permet la séparation de la population lymphoïde B pathologique.

\* La méthode de mise en évidence des immunoglobulines de surface par les doubles marquages CD20nc-IgS, K, L et CD19nc-IgS, K, L permettent de mettre en évidence le caractère monoclonal de la maladie, ce qui affirme le diagnostic cytologique et histopathologique de l'hémopathie.

Les immunoglobulines intracytoplasmiques confirment cette monoclonalité.

### **2ème cas. Luisa (3 ans)**

- Leucocytes :  $22,0 \cdot 10^9$  / litre

Lymphocytes : 59%

- Résultats du phénotypage :

\* CD2 : 35%

\* CD20c : 56%

\* CD20nc : 54%

\* CD19c : 56%

\* CD19nc : 55%

\* K (simple marquage) : \*

\* L (simple marquage) : \*

\* CD20nc-K : 33%

\* CD20nc-L : 13%

\* CD19nc-K : 32%

Rapport K/L : 2,2

\* CD19nc-L : 15%

\* K de surface et intracytoplasmique : 34%

\* L de surface et intracytoplasmique : 16%

(\* = mauvaise discrimination entre populations négative et positive).

### **- Conclusions :**

L'hyperlymphocytose B est mise en évidence par une méthode utilisant un réactif conjugué, ce qui tend à croire que les antigènes membranaires sont exprimés en quantité normale.

Les doubles marquages CD20nc- K, L et CD19nc- K, L ne montrent pas de déséquilibre entre les chaînes légères Kappa et Lambda, ce qui

permet de suggérer la nature polyclonale des lymphocytes B en excès. Un excès de lymphocytes B ne correspond pas automatiquement à un clone. Cet enfant présente des infections à répétition.

**3ème cas. Corine** (22 ans) : suspicion de lymphome à petites cellules clivées.

- Leucocytes :  $10,3 \cdot 10^9$  / litre

Lymphocytes : 20%

Nous observons quelques éléments lymphoïdes à noyau encoché et à chromatine irrégulière.

- Résultats du phénotypage :

\* CD2 : 70%

\* CD20c : 12%

\* CD20nc : 13%

\* CD19c : 13%

\* CD19nc : 13%

\* K (simple marquage) : \*

\* L (simple marquage) : \*

\* CD20nc-K : 14%

\* CD20nc-L : 2%

\* CD19nc-K : 13%                      Rapport K/L : 7

\* CD19nc-L : 2%

(\* = mauvaise discrimination des populations négative et positive).

**- Conclusions :**

Il n'y a pas d'intérêt à utiliser un réactif non conjugué car nous sommes en présence d'un lymphome B où la densité de sites membranaires correspond généralement à la normale.

Les doubles marquages CD20nc-K, L et CD19nc-K, L démontrent le caractère monoclonal de la maladie malgré la faible hyperlymphocytose B.

**4ème cas. Julienne** ( 56 ans ) : LLC à stade latent.

-Leucocytes :  $9,6 \cdot 10^9$  / litre      (normale : 4,2 - 9,0)

Lymphocytes : 50% (normale : 20 - 40)

Nous rencontrons des éléments lymphoïdes à noyau motté.

L'hyperlymphocytose est relativement modérée ( ceci pourrait être compatible avec une maladie bénigne).

- Résultat du phénotypage :

\* CD2 (panT) : 24% (normale : 70 - 90)

\* CD20c : \*

\* CD20nc : 71%

\* CD19c : \*

\* CD19nc : 70%

\* IgS (simple marquage) : \*

\* K (simple marquage) : \*

\* L (simple marquage) : \*

\* CD20nc-IgS : 54%

\* CD20nc-K : 54%

\* CD20nc-L : 64%

\* CD19nc-IgS : 56%

\* CD19nc-K : 52%

\* CD19nc-L : 59%

\* Kappa surface et intracytoplasmique : 69%

\* Lambda surface et intracytoplasmique : 5%

Rapport K/L : 13,8

(\* = mauvaise discrimination entre populations négative et positive).

**- Conclusion :**

La monoclonalité de la LLC ne peut être mise en évidence que par les immunoglobulines intracytoplasmiques seules.



## VI. CONCLUSION GENERALE.

La mise en évidence d'une pathologie lymphoïde chronique B, même latente, est importante en pathologie humaine.

Grâce aux moyens d'investigation disponibles actuellement, il est possible de préciser la nature B des lymphocytes pathologiques et en outre de suspecter hautement le caractère monoclonal de ces cellules.

A cette fin, l'apport de la cytofluorimétrie n'est pas négligeable.

Ce mémoire a permis de montrer que des conditions particulières étaient requises dans la détection de la nature B et du caractère monoclonal des lymphocytes B pathologiques.

Parmi ces conditions, l'utilisation d'un réactif non conjugué reconnaissant les structures B est recommandée. D'autre part, la mise en évidence de la monoclonalité nécessite l'utilisation d'un double marquage associant ce même réactif non conjugué à l'une des chaînes légères Kappa ou Lambda.

La détection des immunoglobulines intracytoplasmiques semble dans quelques cas intéressante.

Parmi les perspectives, il semble opportun de préciser davantage l'intérêt de l'utilisation d'un réactif non conjugué par l'étude chiffrée du canal modal ; d'affiner la mise en évidence des immunoglobulines de surface en testant d'autres marqueurs B ; et de préciser davantage les conditions de mise en évidence des immunoglobulines intracytoplasmiques.

## VII. BIBLIOGRAPHIE

Farcet, J.P. & Reyes, F. (1984)

Les lymphocytes.

Bernard Dreyfus - Hématologie, chap. 12, 95-113.

Degos, L (1984)

Physiologie du tissu lymphoïde.

Encycl. Méd. Chir. Sang, 11, 1-15.

Sigaux, F. (1987)

Caractérisation immunologique des lymphocytes et organisation du tissu lymphoïde.

Revue française des laboratoires, 163, 9-15.

Le Noan-Merdrignal, G. & Martini, E. (1982)

Marquage sur des cellules mononucléées isolées.

La cytométrie en flux (Medsis / McGraw - Hill), chap. 7, 29-33.

Belloc, F. (1991)

Les principes de la cytométrie en flux.

Revue française des laboratoires, 218, 21-27.

Lamy, B., Herve, P., Peters, A. (1988)

Les applications de la cytométrie de flux en hématologie.

Revue française de transfusion et immuno-hématologie, 31(4), 641-660.

Bernard, A. & Boumsel, L. (1982)

International definition of leucocyte differentiation antigens : human leukocytes differentiation clusters.

Flow cytometry and monoclonal antibody for therapy monitoring (Sanofi - Medsi - Gower), 89-97.

Imbert, M. (1991)

Marqueurs cellulaires des lignées lymphoïdes et myéloïde normale.

Revue française des laboratoires, 218, 37-43.

Mellsted, H., Holm, G. & Björkholm, M. (1984)

Multiple myeloma, Waldenström macroglobulinemia, and Benign monoclonal gammopathy : characteristics of the B cell clone, immunoregulatory cell population and clinical implications.

Advances in cancer Research, 41, 257-289.

Grupp, P.R. (1989)

Hypergammaglobulinemia.

Immunology Encyclopedia, 713-717.

Bain, B.J. (1989)

Leukemia diagnosis.

Gower medical publishing, chap. 4, 89-105.

Cossman, J., Neckers, L., Su-Hing Hsu, Longo, D. & Jaffe, S. (1983)

Expression of developmentally regulated B-cell antigens

American Journal of Pathology, 115(1), 117-124.

Warzynski, M., Podgurski, E., Boldt, M. & Hetzel, P.C. (1988)

False negative results resulting from antigen excess by immunophenotyping a leukemia patient with a whole blood method.

Am. J. Clin. Path., 91(2), 227-231.

Calligaris-Cappio & Janossy, G. (1985)

Surface markers in chronic lymphoid leukemia of B-cell type.

Seminars in hematology, 22(1), 1-12.

Koziner, B., Kempin, S., Passe, S., Gee, T., Good, R.A. & Clarkson, B.D. (1980)

Characterization of B-cell leukemias : A tentative immunomorphological scheme.

Blood, 56(5), 815-823.

Jackson, N., Ling, N.R., Ball, J. Bromidge, E. & Nathan, P.D. (1988°)

An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the IIIrd international workshop on human leucocyte differentiation antigens.

Clin. Exp. Immunol., 72, 351-356.

Arnold, S., Freedman, Daley, J & Rosen, K. (1987)

Normal cellular counterparts of B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Blood, 70(2), 418-427.

Anderson, C., Bates, M.P., Slaughenhaupt, B. & Schlossman, F. (1984)

A monoclonal antibody with reactivity restricted to normal and neoplastic plasma cells.

The Journal of Immunology, 132(6), 3172-3178.

Baldini, L., Mozzana, R., Cortelezzi, A., Neri, A. & Radaelli, F. (1989)

Pronostic significance of immunoglobulin phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Blood, 65(2), 340-344.

Debre, P., Binet, J-L., Chastang, C. & Merle-Beral, H. (1982)

La leucémie lymphoïde chronique.

La cytométrie en flux (Medsi / McGraw-Hill), chap. 30, 315-319.

Sultan, C. & Imbert, M. (1987)

Hématopathies lymphoïdes.

Revue française des laboratoires, 163, 23-31.

Rudders, A.R., de Dellis, R.A., Ahl, E., Bernstein, S & Begg, B. (1983)

Adult non-Hodgkin's lymphoma.

Cancer, 52, 2289-2299.

Bataille, R., Klein, B. & Rossi, J.F. (1987)

Immunologie du myelome.

Nouv. Rev. Hematol., 29, 255-264.

Ruiz-Arguelles, Katzmann, J.A., Greipp, P.R. & Gonchoroff, N.J. (1984)

Multiple myeloma : circulating lymphocyte that express plasma cell antigens.

Blood, 64(2), 352-356.

Uckun, F.M. & Ledbetter, J.A. (1988)

Immunobiologic differences between normal and leukemic human B-cell precursors.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8603-8607.

Young, I.T. (1977)

Proof without prejudice : use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 25(7), 935-941.

Smith, S.K., Brown, V.A., Dewa, A.E., Stockdill, G. & Cohens, B. (1985)

Abnormalities in the expression of the leucocyte-common antigen in chronic lymphocytic leukemia.

Clin. Exp. Immunol., 59, 55-63.

Shah, V.O., Civin, C.I. & Loke, M.R. (1988)

Flow cytometric analysis of human bone marrow.

The Journal of immunology, 14, 1861-1867.

Andre, C. (1991)

Cytométrie en flux : application au phénotypages lymphocytaires dans la pathologie associée au VIH et dans les hémopathies lymphoïdes chroniques.

Revue française des laboratoires, 218, 59-68.

Bernard, A. & Pomier, G. (1991)

Application à l'hématologie des techniques d'immunocytologie.

Encycl. Méd. Chir., Hématologie, 20, 1-4.

Felman, P., Gentilhomme, O., Berger, F. & Bryon, P.A. (1987)  
Critères cytologiques de classement des lymphomes malins non Hodgkiniens.  
Revue française des laboratoires, 164, 17-31.

Solal-Celigny, P. (1991)  
Lymphomes non Hodgkiniens.  
Encycl. Méd. Chir., 10, 1-11.

Binet, J.L. & Viala, J.J. (1991)  
Myeloma and lymphoproliferative syndromes.  
Nouvelle revue française d'hématologie, 4, 177-179.

Brouet, J.C. & Femand, J.P. (1985)  
Etude clinique et immunologique de l'association leucémie lymphoïde  
chronique et myélome multiple.  
Actualités hématologiques, 19, 137-141.

Jill Welch Barker (1989)  
An innovation lymphocyte preparation system for flow cytometry.  
European clinical laboratory, 30, 26-33.

Chapple, M.R., Johnson, G.D. & Davidson, R.S. (1988)  
Fluorescence quenching of fluorescein by R. Phycoerythrin.  
Journal of Immunological Methods, 111, 209-217.

Cohen, H.J. (1975)  
Human lymphocyte surface immunoglobulin capping.  
The Journal of Clinical Investigation, 55, 84-93.

Macey, M.G., Hyam, C.J. & Newland, A.C. (1985)  
Enumeration of lymphocyte sub-populations : a comparative study of whole  
blood and gradient centrifugation methods.  
Medical Laboratory Sciences, 45, 187-191.

Jackson, A.L. & Warner, N.L. (1986)  
Preparation, staining and analysis by flow cytometry of peripheral blood  
leukocytes.  
Manual of clinical laboratory immunology, chap. 32, 226-235.

Lukes, R.J., Taylor, C.R., Chir, b, & Parker, J.W. (1978)  
A morphologic and immunologic surface marker study of 229 cases of non-  
Hodgkin lymphomas and related leukemia.  
American Journal of Pathology, 90, 461-486.

Berliner, N, Ault, A., Martin, P. & Weinberg, D.S. (1986)  
Detection of clonal excess in lymphoproliferative disease by K/L analysis :  
correlation with immunoglobulin gene DNA rearrangement.  
Blood, 67(1), 80-85.

Gordon, J., Mellstedt, H., Aman, P., Biberfeld, P. & Klein, G. (1983)  
Phenotypes in chronic B-lymphocytic leukemia probed by monoclonal  
antibodies and immunoglobulin secretion studies : Identification of stages of  
maturation arrest and the relation to clinical finding.  
Blood, 62(4), 910-917.

Ternynck, T., Dighiero, G., Follezou, J. & Binet, J.L. (1974)  
Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using  
peroxidase-labelled antibodies. Detection and quantitation of light chain  
determinants.  
Blood, 43(3), 789-795.

Sleese, R.B., Wistar, R. & Scher, I (1979)  
Surface immunoglobulin density on human peripheral blood mononuclear  
cells.  
Blood, 54(1), 72-87.

Winchester, R.J., Hoffman, T. & Kunkel, H.G. (1975)  
IgG on lymphocytes surfaces ; technical problems and significance of a third  
cell population.  
The Journal of immunology, 114(4), 1210-1212.

Kvaloy, S., Langholm, R., Kaalhus, O., Marton, F. & Host, H. (1985)  
Immunologic subsets in B-cell lymphomas defined by surface  
immunoglobulin isotype and complement receptor - Their relationship to  
survival.  
Scand. J. Haematol., 35, 137-144.

Smith, B.R., Robert, N.J. & Ault (1983)  
In Waldenström macroglobulinemia the quantity of detectable circulating  
monoclonal B lymphocytes correlates with clinical course.  
Blood, 61(5), 911-914.

Anderson, K.C., Bates, M.P., Slaughenhaupt, B. & Pinkus, G. (1984)  
Expression of human B-cell associated antigens on leukemias and  
lymphomas : A model of human B-cell differentiation.  
Blood, 63(6), 1424-1433.

- Ligler, F., Kettman, R., Smith, G., & Frenkel, P. (1983)  
Immunoglobulin phenotype on B-cells correlates with clinical stage of chronic lymphocytic leukemia.  
*Blood*, 62(2), 256-263.
- Hamblin, T.J., Oscier, G., Stevens, J.R. & Smith, J.L. (1987)  
Long survival in B-CLL correlates with surface IgM<sub>κ</sub> phenotype.  
*British Journal of Haematology*, 66, 21-26.
- Wearne, A., Joshua, D.E. & Kronenberg, H. (1984)  
Light chain isotype associated suppression of surface immunoglobulin expression on peripheral blood lymphocytes in myeloma during plateau phase.  
*British Journal of Haematology*, 58, 483-489.
- Sobol, R., Dillman, R.O., Collins, H., Griffiths, J.C. & Green, M.R. (1985)  
Applications and limitations of peripheral blood lymphocyte immunoglobulin light chain analysis in the evaluation of non-Hodgkin's lymphoma.  
*Cancer*, 56, 2005-2010.
- Kruth, H.S., Braylan, R.C., Benson, N.A. & Nourse, V.A. (1981)  
Simultaneous analysis of DNA and cell surface immunoglobulin in human B-cell lymphomas by flow cytometry.  
*Cancer Research*, 41, 4895-4899.
- Liendo, C., Danieau, L., Al-Katib, A. & Koziner, B. (1985)  
Phenotypic analysis by flow cytometry of surface immunoglobulin light chain and B and T cell antigens in lymph nodes involved with non-Hodgkin's lymphomas.  
*The American Journal of Medicine*, 79, 445-454.
- Ibrahim, R.E., Teich, D., Smith, B.R., Antin, J., Olivier, A.P. & Weinberg, D.S. (1989)  
Flow cytometric surface light chain analysis of lymphocyte-rich effusions.  
*Cancer*, 63, 2024-2029.
- Ault, K.A. (1979)  
Detection of small numbers of monoclonal B lymphocytes in the blood of patients with lymphoma.  
*The New England Journal of Medicine*, 300(25), 1401-1405.
- Wong, G.Y., Gebhard, D., Mittleman, A., Hanlu, M. & Koziner, B. (1985)  
Analysis of cell surface light chain immunoglobulin expression by flow cytometry in normal controls.  
*The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(2), 119-126.

Weinberg, D.S., Pinkus, G.S., Ault, K.A. (1984)

Cytofluorometric detection of B-cell clonal excess : a new approach to the diagnostic of B-cell lymphoma.

Blood, 63(5), 1080-1087.

Gebhard, D.F., Mittleman, A., Cirrincione, C., Thaler, H.T. & Koziner, B. (1986)

Comparative analysis of surface membrane immunoglobulin determination by flow cytometry and fluorescence microscopy.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 34(4), 475-481.

Johnson, A., Cavallin-Stahl, E. & Akerman, M. (1989)

Flow cytometric light chain analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with non-Hodgkin's lymphoma.

Br. J. Cancer, 52, 159-165.

Brown, V.A., Smith, S.K., Dewar, A.E., Stockdill, G. & Maddy, A.H. (1985)

Surface glycoproteins as markers of the cellular status of B chronic lymphocytic leukemia lymphocytes.

Clin. Exp. Immunol., 62, 95-103.

Gentilhomme, O., Berger, F. & Magaud, J.P. (1987)

Analyse immunologique des lymphomes malins.

Revue française des laboratoires, 164, 33-38.

Ault, K. (1986)

Flow cytometric evaluation of normal and neoplastic B-cells.

Manual of clinical laboratory immunology, chap. 34, 247-253.

Koziner, B., Stavenzer, J., Al-Katib, A., Gebhard, D. & Clarkson, B.D. (1989)

Surface immunoglobulin light chain expression in pre-B-cell leukemia.

Annals of New-York academy of Sciences, 22, 211-224.

Deegam, M.J. (1989)

Membrane antigen analysis in the diagnosis of lymphoid leukemias and lymphomas.

Arch. Pathol. Lab. Med., 113, 606-618.

Levy, N., Nelson, J., Meyer, P., Lukes, R. & Parker, J.W. (1989)

Reactive lymphoid hyperplasia with single class (monoclonal) surface immunoglobulin.

Am. J. Clin. Pathol., 80, 300-308.

Garner, Bardales, R.H., Al-Katib, A., Carrato, Koziner, B. (1989)

Detection of intracytoplasmic immunoglobulins by flow cytometry in B-cell malignancies.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 37, 83-89.



Aisenberg, A.C., Wilkes, B.M. & Harris, N.L. (1983)  
Monoclonal antibodies studies in non-Hodgkin's lymphoma.  
*Blood*, 61(3), 469-475.

Pearl, G (1983)  
Pre-B-cells in normal human bone marrow and in bone marrow from  
patients with leukemia in remission : persistent quantitative differences and  
possible expression of cell surface IgM in vitro.  
*Blood*, 61(3), 464-468.

Bartologie, B., Alexanian, R., Pershouse, M., Smallwood, L. & Smith, L. (1985)  
Cytoplasmic immunoglobulin content in multiple myeloma.  
*J. Clin. Invest.*, 76, 765-769.

Tin Han, Ozer, H., Bloom, M., Sagawa, K. & Minowada, J. (1982)  
The presence of monoclonal cytoplasmic immunoglobulins in leukemic B-  
cells from patients with chronic lymphocytic leukemia.  
*Blood*, 59(2), 435-438.

Zipf, T.F., Bryant, L.D., Koskovich, G.N., McGregor, S.E., Chin, L. & Johnson, H.  
(1984)  
Enumeration of cytoplasmic  $\mu$  immunoglobulin positive acute lymphoblastic  
leukemia cells by flow cytometry : comparison with fluorescence microscopy.  
*Cytometry*, 5, 610-613.

Loftin, K.C., Reuben, J.M., Hersh, E.M. & Sujansky, D. (1985)  
Cytoplasmic IgM B-cells by flow cytometry.  
*Leuk. Res.*, 9, 1379-1384.

Filippi, J.F., Tubiana, N., Caer, F., Sampol, J. & Carcassonne, Y. (1986)  
Détection d'immunoglobulines intracytoplasmiques sur cytofluorographe.  
*Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 28, 297-302.

Schroff, R.W., Bucana, C.D., Klein, R.A., Farrell, M.M. & Morgan, A.C. (1984)  
Detection of intracytoplasmic antigens by flow cytometry.  
*Journal of Immunological Methods*, 70, 167-177.