

MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu publiquement le 20 octobre 2017

Par M^{lle} MAGIEROWICZ Marion

Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Titre

Application de la cytométrie en flux multiparamétrique au diagnostic des
localisations cérébrales primitives ou secondaires des néoplasies lymphoïdes
B matures à partir des profils cellulaire et cytokinique
du liquide céphalo-rachidien.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur **Annabelle Dupont**

Assesseurs : Monsieur le Professeur **Claude Preudhomme**
Monsieur le Docteur **Charles Herbaux**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur **Christophe Roumier**



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Vice-présidents :
Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Eric BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Murielle GARCIN
Professeur Annabelle DERAM
Professeur Muriel UBEDA SAILLARD
Monsieur Ghislain CORNILLON
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Madame Nathalie ETHUIN
Madame Ilona LEMAITRE

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie : Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche : Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité : Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales : Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante : M. Thomas MORGENROTH
Chef des services administratifs : Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
Mme	RENNEVILLE	Aline	Hématologie
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M	TARTAR	André	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WILLAND	Nicolas	Laboratoire de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	ChérifaMounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie (80%)
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

***Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions
émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

Remerciements

A la Présidente de mon jury de thèse,

Madame le Professeur Annabelle Dupont,

*Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie - Hémostase
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Vous avez accepté volontiers la présidence de mon jury de thèse et je vous en remercie. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance et mon profond respect.

A mes assesseurs,

Monsieur le Professeur Claude Preudhomme,

*Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Chef de service du laboratoire d'Hématologie - Hémostase
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Je vous prie d'accepter mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Charles Herbaux,

*Maître de Conférences des Universités
Praticien Hospitalier dans le service des Maladies du Sang
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et de l'intérêt porté à ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Christophe Roumier,

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie - Hémostase

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je tiens à vous remercier de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de l'avoir encadré. Vos conseils et votre pédagogie m'ont apporté beaucoup de motivation au cours de ce travail. Vous avez, par votre expertise en cytométrie en flux, contribué à la réalisation de ce projet. Je vous exprime toute ma reconnaissance et soyez assuré de mon profond respect.

Je tiens également à remercier

Madame le **Docteur Stéphanie Poulain** pour votre disponibilité, vos conseils et votre expertise dans l'exploration biologique des lymphomes. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail et de votre aide apportée dans l'interprétation des données relatives à la maladie de Waldenström.

Messieurs les **Docteurs Florent Dumezy et Thomas Boyer** pour votre disponibilité et votre apprentissage en cytométrie en flux.

Monsieur le **Docteur Richard Lemal**, Praticien Hospitalier du service d'Hématologie clinique du CHU de Clermont-Ferrand, pour m'avoir communiqué les informations cliniques de deux patients du groupe des syndromes de Bing Neel.

L'équipe des **techniciens de cytométrie en flux et de culture cellulaire**, en particulier Corinne, Elisabeth, Jérôme, Marie-Pascale, Vanessa et Vicky pour votre sympathie et votre bonne humeur.

Monsieur le **Docteur Jean-François Claisse**, vous nous avez enseigné l'Hématologie à la faculté de Pharmacie d'Amiens avec beaucoup d'enthousiasme. C'est avec plaisir que j'ai travaillé avec vous et l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'Hématologie du CHU d'Amiens.

A ma famille et à mes amis

A mes parents, Claudine et Alain, vous avez été d'un grand soutien pendant toutes ces années. Vous m'avez permis de réaliser ces études en étant toujours présents comme je le serai toujours pour vous.

A mes sœurs, Sophie et Lucile, vous avez occupé une place très importante pendant toutes mes études. Les promenades du week-end et notre complicité m'ont permis d'avancer.

A mes grands-parents maternels, Paulette et Pierre, j'apprécie le temps passé avec vous et votre gentillesse.

A Clément, je te remercie pour ton aide et ta patience tout au long de cette année.

A mes amis, Alice, Aline, Audrey, Chloé, Claire B., Claire L., Fabien, Marie, Marine, Mathilde, Marie-Jo, Pénélope, les moments de la vie étudiante passés à vos côtés resteront inoubliables.

A mes amies, Agathe, Caroline, Line, Zoé, nous avons partagé de bons moments à l'internat de Valenciennes qui se poursuivent sur Lille.

A mes amies Catarina, Elodie, Joséphine, Justine, la première année d'internat à Amiens a été remplie de très bons moments grâce à vous.

Sommaire

ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION	3
I GENERALITES.....	5
1 LES LYMPHOMES MALINS NON HODGKINIENS.....	5
1.1 Définition	5
1.2 Classification OMS 2016.....	5
1.3 Physiopathologie des lymphomes B.....	7
1.4 Evolution clonale des lymphomes.....	16
2 LES LYMPHOMES CEREBRAUX OU NEUROLYMPHOMES.....	17
2.1 Anatomie et organisation structurelle du système nerveux (SN).....	17
2.2 Tropisme neuro-méningé selon le type de LNH.....	20
2.3 Localisations cérébrales secondaires à des lymphomes non hodgkiniens.....	21
2.4 Le lymphome primitif du système nerveux central (LPSNC).....	24
2.5 Le lymphome intra-oculaire primitif (LIOP).....	26
2.6 Atteintes méningées métastatiques.....	27
3 OUTILS DIAGNOSTIQUES DISPONIBLES AU LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE POUR CARACTERISER UNE INFILTRATION LYMPHOÏDE MALIGNE DU SNC	28
3.1 Etude cytomorphologique du LCR.....	28
3.2 Immunophénotypage cellulaire du LCR.....	29
3.3 Etude de la clonalité des lymphocytes par PCR.....	29
4 DIAGNOSTICS DIFFERENTIELS D'UNE INFILTRATION LYMPHOÏDE MALIGNE DU SNC	29
5 REPONSE IMMUNITAIRE ET SOURCES CELLULAIRES DE LA SECRETION CYTOKINIQUE.....	30
6 LES CYTOKINES.....	30
6.1 L'interleukine-1bêta (IL-1 β).....	30
6.2 Le Tumor necrosis factor (TNF).....	31
6.3 L'interleukine-12p70 (IL-12p70).....	31
6.4 L'interleukine-8 (IL-8).....	31
6.5 L'interleukine-6 (IL-6).....	32
6.6 L'interleukine-10 (IL-10).....	32
7 LA CYTOMETRIE EN FLUX APPLIQUEE AU DOSAGE D'ANALYTES SOLUBLES.....	32
7.1 Principes de fonctionnement du cytomètre Navios TM (Beckman Coulter).....	32
7.2 Principe de la méthode Cytometric Bead Array.....	34
II METHODOLOGIE : PATIENTS, MATERIEL ET METHODES.....	37
1 PATIENTS	37
2 MATERIEL.....	40
3 METHODES.....	41
3.1 Mode opératoire de l'immunophénotypage des lymphocytes dans le LCR	41

3.2	<i>Mode opératoire du dosage des cytokines selon les préconisations du fournisseur du kit</i>	45
3.3	<i>Adaptation du mode opératoire au LCR</i>	47
3.4	<i>Adaptation de la méthode de dosage au cytomètre Navios™</i>	48
III	RESULTATS	49
1	ADAPTATION DU KIT CYTOKINES INFLAMMATOIRES HUMAINE (BD®) AU CYTOMETRE NAVIOS™ ET REGLAGES DE LA SENSIBILITE DU CYTOMETRE	49
1.1	<i>Mode opératoire pour la modification des gains et des volts (V)</i>	49
1.2	<i>Impact de l'adaptation des voltages sur la capacité du cytomètre à résoudre les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage</i>	53
2	OPTIMISATION DES CONDITIONS OPERATOIRES POUR LA FORMATION DES COMPLEXES BILLES DE CAPTURE-CYTOKINE RECONNUS PAR L'ANTICORPS DE DETECTION MARQUE A LA PHYCOERYTHRINE (PE) : ETUDE DE L'INFLUENCE DU MODE D'INCUBATION ET DE L'AGITATION	56
3	ETUDE DE REPRODUCTIBILITE ET DE LA REPETABILITE	59
3.1	<i>Reproductibilité inter-kit de la gamme d'étalonnage</i>	59
3.2	<i>Répétabilité et reproductibilité des moyennes de l'intensité de fluorescence mesurées dans les échantillons patients</i>	59
3.3	<i>Vérification de la capacité de détection en cytokine à l'aide d'un standard externe</i>	61
4	RESULTATS DES PROFILS CELLULAIRE ET CYTOKINIQUE DES LCR DES PATIENTS ETUDIES	63
4.1	<i>Résultats de la recherche de cellules lymphomateuses ou blastiques par immunophénotypages cellulaires réalisés en cytométrie en flux sur le LCR</i>	63
4.2	<i>Résultats du profil cytokinique pour chacun des prélèvements</i>	72
4.3	<i>Résultats de la mesure de l'IL-10 et de l'IL-6 selon les groupes pathologiques</i>	76
4.4	<i>Résultats pour le groupe de patients atteints de la maladie de Waldenström</i>	80
IV	DISCUSSION	84
V	CONCLUSION	96
VI	BIBLIOGRAPHIE	98
VII	TABLE DES ILLUSTRATIONS	108
VIII	ANNEXES	112
1	ANNEXE I : VALEURS DES MFI DE CHAQUE POINT DE LA GAMME D'ETALONNAGE OBTENUES POUR CHACUN DES KITS	112
2	ANNEXE II : REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE DES MOYENNES DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE (MFI) MESUREES DANS LES ECHANTILLONS PATIENTS	112
2.1	<i>Répétabilité des MFI mesurées pour les six cytokines dans les trois échantillons de patients testés en double, à partir du logiciel FCAP Array™</i>	112
2.2	<i>Reproductibilité des MFI mesurées pour les six cytokines dans le LCR P70 dans deux expériences différentes, à partir du logiciel FCAP Array™</i>	113
3	ANNEXE III : RECONSTITUTION IL-6 (20µG)	113

4	ANNEXE IV : DONNEES CLINICO-BIOLOGIQUES RELATIVES AUX PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE DE WALDENSTRÖM.....	115
5	ANNEXE V : EXAMENS COMPLEMENTAIRES REALISES SUR LE LCR DES PATIENTS ATTEINTS DE LA MALADIE DE WALDENSTRÖM	116
6	ANNEXE VI : DONNEES CLINIQUES ET RESULTATS BIOLOGIQUES DE L'ENSEMBLE DES PATIENTS DE L'ETUDE	117

Abréviations

A

AA : Acides aminés

ABC : *Activated B-Cell*

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

Ag : Antigène

APC : Allophycocyanine

B

BCL : *B-cell lymphoma*

BCR : *B Cell Receptor* ou récepteur du lymphocyte B

BHE : Barrière hémato-encéphalique

BOM : Biopsie ostéo-médullaire

BTK : *Bruton tyrosine kinase*

β2m : bêta-2-microglobuline

C

CBA : *Cytometric Bead Array*

CDF : Cellule dendritique folliculaire

CG : Centre germinatif

CH : Centre Hospitalier

CHRU : Centre Hospitalier Régional et Universitaire

CMF : Cytométrie en flux

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

Cellules NK : Cellules *Natural Killer*

CV : Coefficient de variation

D

DLBCL : *Diffuse Large B Cell Lymphoma* ou

Lymphome diffus à grandes cellules B

E

ECLIA : *Electrochemiluminescence immunoassay*

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EPS : Electrophorèse des protéines sériques

F

FS : *Forward Scatter* / Taille

G

GC : *Germinal Center* ou centre germinatif

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

I

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IPI : Index Pronostique International

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

K

kDa : kilodaltons

L

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LDH : Lactate deshydrogénase

LF : Lymphome folliculaire

LIOP : Lymphome intra-oculaire primitif

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LLP : Lymphomes lymphoplasmocytaires

LNH : Lymphome non Hodgkinien

LOC : Lymphomes oculo-cérébraux

LPSNC : Lymphome Primitif du Système

Nerveux Central

LT : Lymphocyte T

LTCD4+ : Lymphocyte T CD4+

LZM : Lymphome Zone Marginale

M

MALT : *Mucous Associated Lymphoid Tissue* ou tissu lymphoïde associé aux muqueuses

MFI : *Mean Fluorescence Intensity* ou intensité moyenne de fluorescence

MGG : May-Grünwald Giemsa

MGUS : *Monoclonal Gammopathy Unknown Signification* ou gammapathie monoclonale de signification indéterminée

MO : Moelle osseuse

MUM-1/IRF4 : *Multiple myeloma oncogene-1/ Interferon regulatory factor-4*

MTX : Méthotrexate

MW : Maladie de Waldenström

N

NFκB : *Nuclear Factor kappa B* ou facteur nucléaire kappa B

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PBS : *Phosphate-buffered saline solution*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PE : Phycoérythrine

PL : Ponction lombaire

PNN : Polynucléaire neutrophile

PMT : Photomultiplicateurs

R

RAG : *Recombination-Activating Protein*

RPMI : Milieu de culture *Roswell Park Memorial Institute*

S

SAB : Sérum albumine bovine

SBN : Syndrome de Bing Neel

SEP : Sclérose en plaques

SN : Système nerveux

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SS : *Side Scatter* / Structure

Std : Standard

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TCA : Taux de céphaline activé

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TIR : *Toll / Interleukine-1 receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor* ou facteur de nécrose tumorale

TP : Taux de prothrombine

TS : *Top standard* ou solution standard la plus concentrée

V

V : Volts

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VDJ : Variabilité, Diversité, Jonction

Introduction

Les symptômes neurologiques (céphalées, vertiges, déficit moteur, hypoesthésie, confusion...) sont variés et non spécifiques. Ils représentent un motif fréquent de consultation, l'enjeu est d'en déterminer l'étiologie. Lorsque ces symptômes surviennent dans un contexte de pathologie hématologique maligne sous-jacente, ils font suspecter une évolution ou une rechute de la maladie au niveau méningé. Ceci s'observe par exemple pour les lymphomes malins non hodgkiniens. Dans cette indication, le diagnostic différentiel entre une atteinte maligne et une autre étiologie : inflammatoire ou infectieuse, par exemple, doit être établi.

L'imagerie cérébrale par résonance magnétique est l'examen de référence pour explorer le système nerveux central (SNC) et est réalisée en première intention. Cet examen doit être complété par une ponction lombaire afin de rechercher une infiltration du système nerveux central par des cellules lymphomateuses.

En effet, le diagnostic de méningite lymphomateuse repose sur la mise en évidence lors de l'examen cytologique de cellules lymphomateuses dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). La méthodologie habituelle est la réalisation d'une leucoconcentration par une cytocentrifugation du LCR préalable à une coloration au May-Grünwald Giemsa. Plus récemment, le développement de la cytométrie en flux (CMF) a considérablement amélioré la sensibilité de détection de populations cellulaires lymphomateuses et présentes en faible quantité au sein de liquides biologiques variés : sang, moelle osseuse, LCR, humeur vitrée. Le caractère clonal des cellules B peut également être révélé par biologie moléculaire en étudiant le réarrangement du gène *IgH* codant la chaîne lourde des immunoglobulines (Ig) ou celui des gènes codant les chaînes légères des Ig par *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

La difficulté à établir le diagnostic a encouragé le développement de méthodes alternatives qui ne sont plus axées sur la détection de cellules mais sur le dosage de biomarqueurs présents dans le LCR. Citons comme exemples de biomarqueurs : les cytokines solubles et les ADN tumoraux extracellulaires libres.

Les cytokines peuvent être dosées en ELISA ou par la technique *Cytometric Bead Array* (CBA) en CMF. La technique CBA permet de doser simultanément plusieurs cytokines à partir d'un faible volume de prélèvement de LCR.

L'objectif de ce travail est d'analyser l'apport de l'immunophénotypage cellulaire et du dosage des cytokines en cytométrie en flux dans les cas de suspicion d'atteinte lymphomateuse du SNC.

1 Les lymphomes malins non hodgkiniens

1.1 Définition

Les lymphomes résultent de la prolifération clonale de cellules lymphoïdes B, T ou NK issues du tissu lymphoïde primaire ou secondaire. Ce sont des maladies à point de départ ganglionnaire ou extra-ganglionnaire (rate, amygdales, tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT, système lymphoïde cutané). Secondairement, des cellules tumorales peuvent apparaître dans le sang. Il s'agit de la phase leucémique du lymphome.

Les lymphomes constituent un groupe hétérogène de pathologies dont la classification est faite par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

1.2 Classification OMS 2016

La classification OMS a pour but d'identifier les différentes pathologies hématologiques. Cette classification référence les critères morphologiques, immunologiques, cytogénétiques et moléculaires qui permettent de poser le diagnostic. Ces critères sont régulièrement mis à jour (1).

Les tumeurs du tissu lymphoïde se distinguent en 5 grandes entités :

- Les néoplasies lymphoïdes B matures ;
- Les néoplasies lymphoïdes T et NK matures ;
- Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation ;
- Les lymphomes de Hodgkin ;
- Les tumeurs à cellules histiocytaires et dendritiques.

L'appellation « néoplasies lymphoïdes » englobent les lymphomes non hodgkiniens (LNH).

Nous nous intéresserons essentiellement aux néoplasies lymphoïdes B matures dont la sous-classification est présentée ci-dessous (Tableau 1). Les néoplasies de type B sont les plus fréquentes (85%) et celles le plus souvent retrouvées dans les localisations cérébrales primitives et secondaires (2).

Néoplasies lymphoïdes B matures
Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
Lymphocytose B monoclonale *
Leucémie prolymphocytaire B
Lymphome de la zone marginale splénique
Leucémie à tricholeucocytes
<i>Lymphome / Leucémie B splénique, non classable</i>
<i>Lymphome B diffus à petites cellules de la pulpe rouge splénique</i>
<i>Leucémie à tricholeucocytes - variant</i>
Lymphome lymphoplasmocytaire
Macroglobulinémie de Waldenström
Gammopathie Monoclonale de signification indéterminée (MGUS: Monoclonal Gammopathy Unknown Signification) à IgM *
Maladie des chaînes lourdes mu
Maladie des chaînes lourdes gamma
Maladie des chaînes lourdes alpha
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgG/IgA *
Myélome multiple
Plasmocytome solitaire osseux
Plasmocytome extra-osseux
Maladies des dépôts d'immunoglobulines monoclonales *
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire
<i>Lymphome de la zone marginale ganglionnaire de type pédiatrique</i>
Lymphome folliculaire
Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> *
Lymphome folliculaire type duodénal *
Lymphome folliculaire de type pédiatrique
<i>Lymphome à grandes cellules B avec réarrangement de IRF4 *</i>
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif
Lymphome à cellules du manteau
Néoplasie à cellules du manteau <i>in situ</i> *
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), sans autre spécificité (NOS)
de type B du Centre Germinatif *
de type Activé B *
Lymphome à grandes cellules B, riche en lymphocytes T/histiocytes
DLBCL primitif du système nerveux central
DLBCL primitif cutané, de type jambe
DLBCL EBV+, NOS *
<i>Ulcère cutané-muqueux EBV+ *</i>
DLBCL associé à une inflammation chronique
Granulomatose lymphomatoïde
Lymphome médiastinal (thymique) primitif à grandes cellules B
Lymphome à grandes cellules B intravasculaire
Lymphome à grandes cellules B, ALK *
Lymphome plasmablastique
Lymphome des séreuses
<i>DLBCL HHV8 *, sans autre spécificité *</i>
Lymphome de Burkitt
<i>Lymphome Burkitt-like avec aberration 11q *</i>
Lymphome B de haut grade, avec réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6 *
Lymphome B de haut grade, NOS *
Lymphome B inclassable, avec des critères intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Hodgkin classique

Tableau 1 : Classification des tumeurs du tissu lymphoïde B selon l'OMS 2016 (1).

Les entités provisoires figurent en italique et les modifications par rapport à l'édition 2008 sont indiquées par un astérisque.

1.3 Physiopathologie des lymphomes B

1.3.1 Différenciation lymphocytaire B normale

La production des lymphocytes B est assurée par deux mécanismes complémentaires : la lymphopoïèse et l'immunopoïèse. La lymphopoïèse se déroule au sein de la moelle osseuse hématopoïétique aboutissant à la production de lymphocytes B naïfs, c'est-à-dire n'ayant jamais rencontré l'antigène complémentaire de leur immunoglobuline de surface (BCR). Les lymphocytes B naïfs rejoignent, via la circulation sanguine, les organes lymphoïdes secondaires ou ganglions lymphatiques afin de poursuivre le processus de différenciation. Au sein de ces organes, le lymphocyte B naïf subit une série de transformations consécutives à la rencontre avec l'antigène. Il s'agit de l'immunopoïèse. L'étape ultime de différenciation aboutit soit au lymphocyte B mémoire, soit au plasmocyte capable d'accomplir la réaction humorale avec production d'Ig (3).

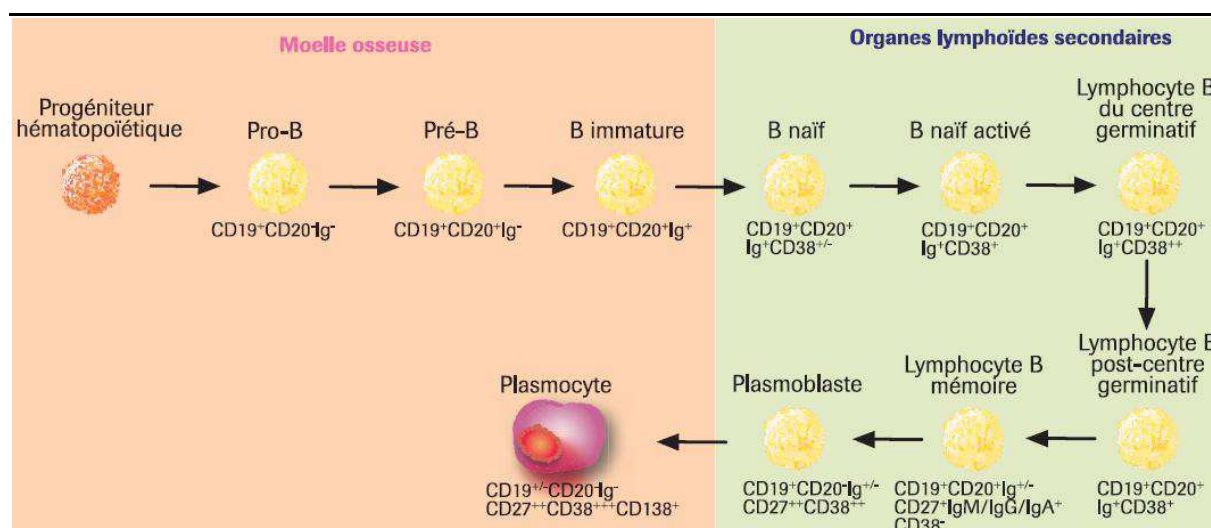


Figure 1 : Schéma de la différenciation lymphocytaire B avec les principaux marqueurs membranaires (3).

Les différentes étapes de la maturation lymphocytaire physiologique au sein des organes lymphoïdes secondaires (=immunopoïèse) permettent de comprendre l'origine des différents lymphomes observés.

L'activation du LB naïf mature lors de la réponse immunitaire peut être « T-dépendante » s'il y a une coopération cellulaire avec un lymphocyte T CD4⁺ (LTCD4⁺) de même spécificité antigénique ou « T-indépendante ». Ces deux types de réponses ont lieu : dans la zone marginale pour la réponse « T-indépendante » et dans la zone folliculaire pour la réponse « T-dépendante ».

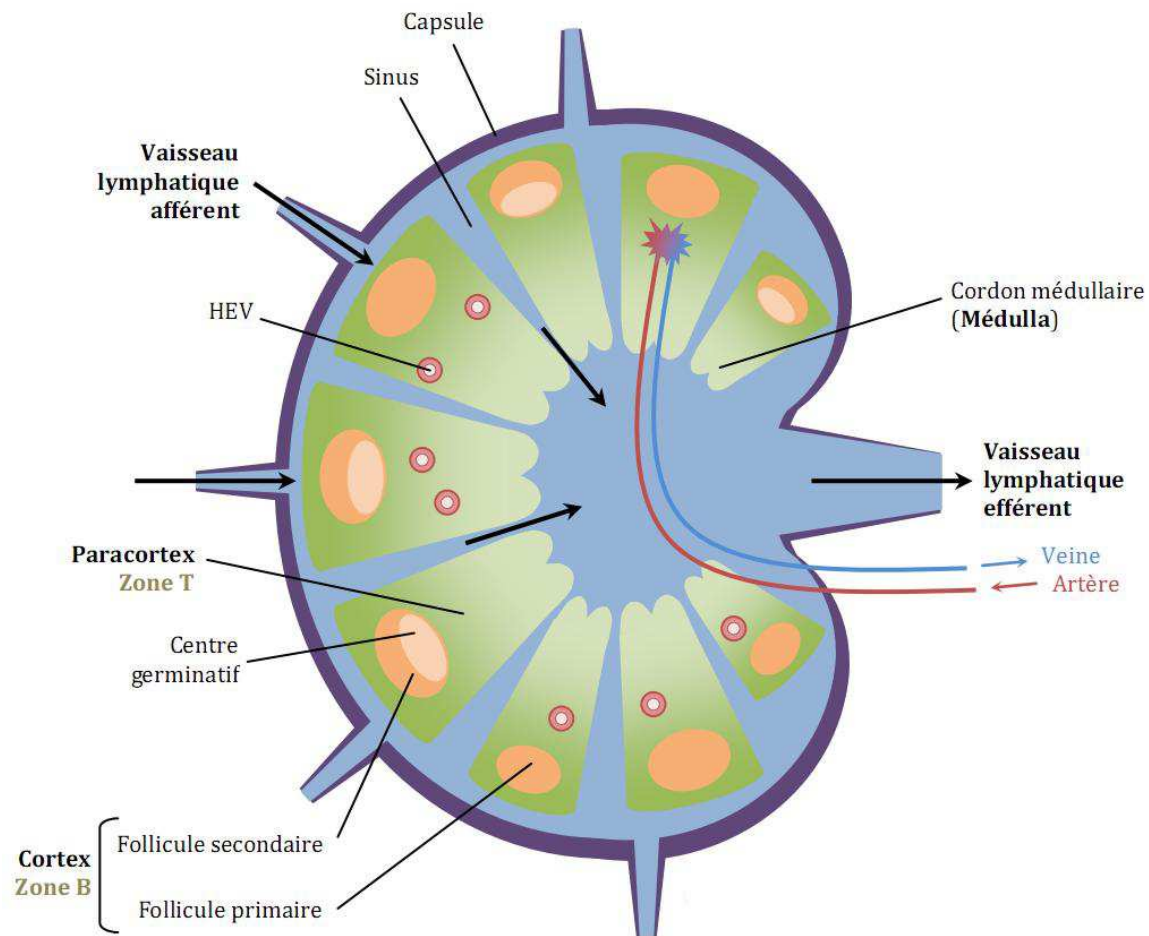


Figure 2 : Organisation structurale d'un ganglion lymphatique (4)

En effet, l'architecture ganglionnaire de la zone folliculaire permet un contact étroit entre LB, lymphocyte T (LT) et les cellules dendritiques folliculaires (CDF) présentatrices d'Ag (CPA). La formation du follicule secondaire résulte de cette co-stimulation lymphocytaire entre un LT CD4+ et un LB entraînant la prolifération des LB naïfs activés au sein du follicule primaire. Une modification de l'organisation folliculaire est observée : la prolifération rapide du LB naïf en centroblaste dans le follicule primaire crée une zone claire et repousse en périphérie le reste du contenu cellulaire du follicule en un « manteau » de cellules B quiescentes. Il s'agit de la transformation du follicule primaire en un follicule secondaire avec la formation du centre germinatif (CG). Dans la zone sombre du follicule secondaire, les LB ont l'aspect de centroblastes qui sont de grandes cellules lymphoïdes dont le noyau a une chromatine fine et nucléolée.

La zone claire est, elle, composée de centrocytes. La zone du manteau est la couronne folliculaire du follicule secondaire et est composée de LB naïfs pré-CG (5).

Au sein du centre germinatif, de nombreux événements se produisent (6) :

- Prolifération lymphocytaire B majeure à partir du stade de centroblastes ;
- Hypermutations somatiques des régions variables des deux chaînes légères des Ig ;
- Commutation isotypique de la classe d'Ig (IgM vers IgG, IgA, IgD ou IgE).

A l'issue de leur phase de prolifération, les centroblastes se transforment en centrocytes : petites cellules encochées et non proliférantes. Après les différentes mutations, les centrocytes ont tous une Ig de surface différente qui assure le caractère polyclonal du répertoire B. Les centrocytes quittent alors le CG pour donner des LB mémoires ou des plasmocytes qui regagneront la moelle osseuse (7).

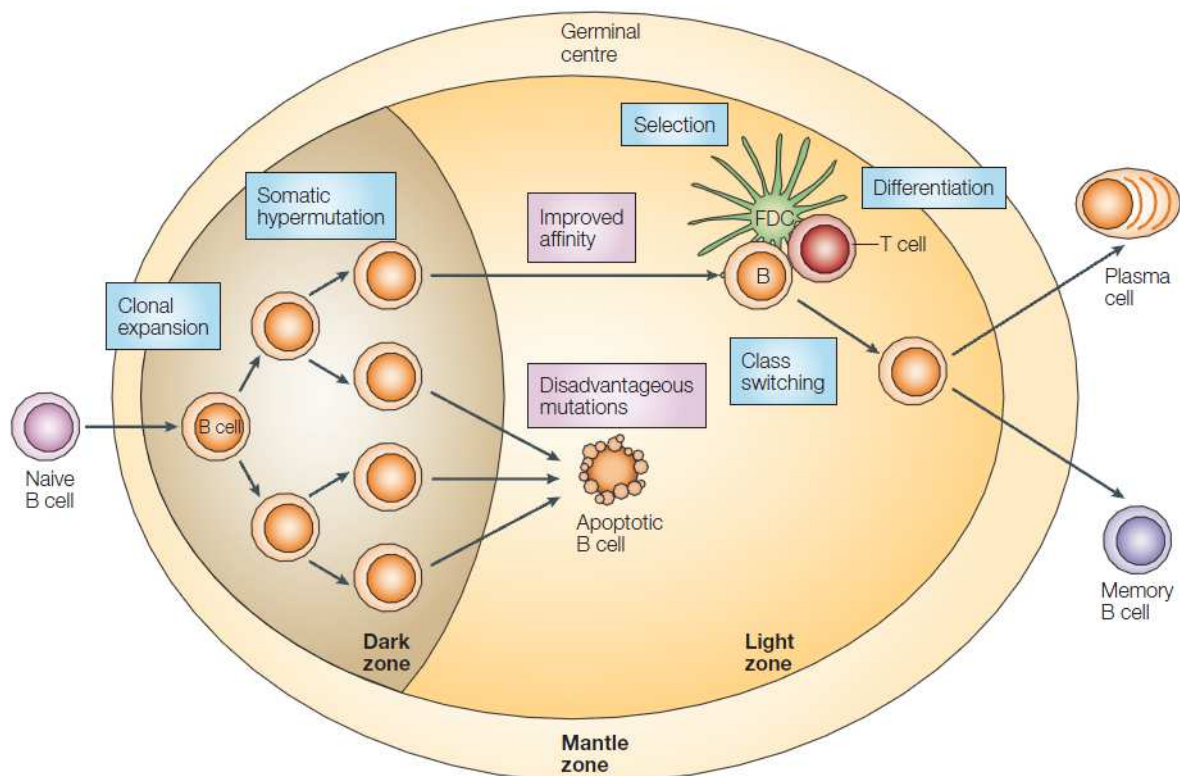


Figure 3 : Différenciation lymphocytaire B au sein des organes lymphoïdes périphériques (6)

1.3.2 Description du processus de lymphomagenèse et de l'origine cellulaire des principales néoplasies lymphoïdes B

Une prolifération cellulaire intense existe au cours de chaque étape de la lymphopoïèse B et expose par conséquent l'ADN de la cellule à de nombreuses cassures et réparations pouvant induire des remaniements chromosomiques et/ou des mutations somatiques. La plupart des anomalies génétiques initiant la lymphomagenèse résultent d'altérations de l'ADN souvent consécutives à l'action des enzymes qui réarrangent les segments d'Ig pour former le BCR ou qui participent aux phénomènes d'hypermutations somatiques (8). Toute anomalie génomique survenant au sein du lymphocyte B devrait enclencher son apoptose. Dans certains cas, cette anomalie fondatrice induit un avantage de prolifération et/ou de survie de la cellule mutée. Cette cellule initiatrice du lymphome aura une expansion clonale au cours de laquelle d'autres altérations génomiques pourront survenir. Citons l'exemple de la translocation chromosomique t(14;18)(q32;q21) qui met les séquences codantes du gène *BCL2* situé au locus q21.33 du chromosome 18 sous le contrôle des séquences régulatrices du gène de l'*IgH* localisé en q32.33 du chromosome 14 (9). Cette translocation est causée par des enzymes du groupe des recombinaisons VDJ (RAG1 et RAG2) et aboutit à la synthèse excessive de la protéine BCL2 à l'effet anti-apoptotique (10).

Ce mécanisme de dérégulation par translocations chromosomiques est également à l'origine de l'activation d'oncogènes comme *BCL6* t(3;14)(q27;q32) ou *c-MYC* t(8;14)(q24;q32) (11,12).

En fonction du stade de différenciation du lymphocyte B où surviennent ces anomalies chromosomiques, différents lymphomes sont décrits. En effet, chaque type de cellule lymphomateuse dérive de sa contre-partie normale. La classification des lymphomes tend à être physiopathologique en cherchant à identifier la contrepartie cellulaire normale de chaque type tumoral (Figure 4) (13).

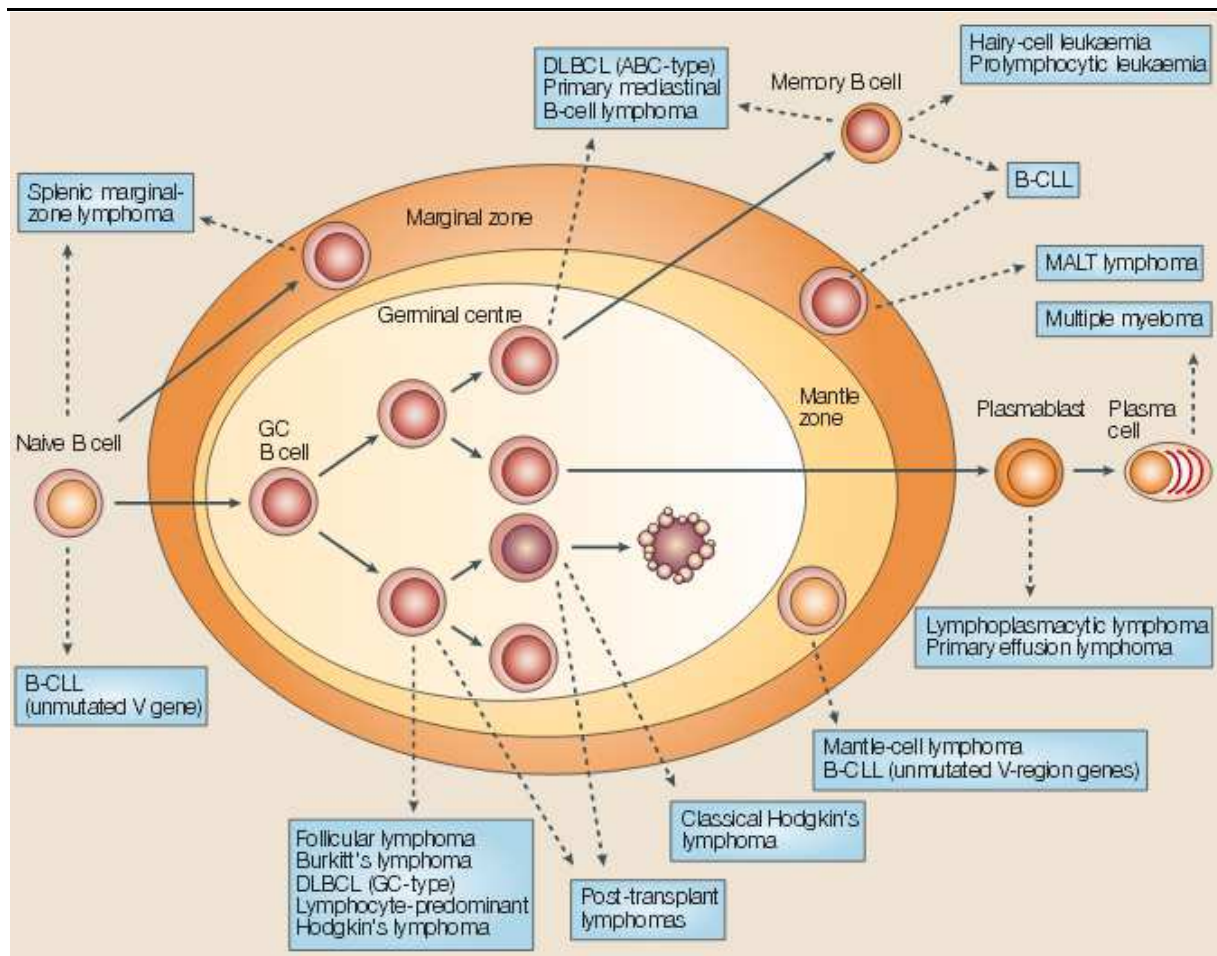


Figure 4 : Origine cellulaire des néoplasies lymphoïdes B (13)

Les lymphomes dérivent le plus fréquemment du centre germinatif ou sont post-CG. L'origine cellulaire de certains lymphomes est encore discutée. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) pourrait dériver d'un LB naïf ou d'un LB post-CG selon le statut mutationnel des gènes des Ig. Ces mutations surviennent au sein du CG (13).

Les lymphomes dits « agressifs » ou de haut grade de malignité sont les lymphomes de Burkitt, les lymphomes diffus à grandes cellules B et certains types de lymphomes du manteau (variant blastoïde). Leur évolution peut être fatale à court terme. En revanche, les lymphomes folliculaires, la LLC, les lymphomes de la zone marginale et la maladie de Waldenström sont dits « indolents » ou de bas grade de malignité et évoluent sur plusieurs années en dehors des formes sévères (14).

Nous détaillerons les aspects morphologiques et moléculaires de trois types de lymphomes pouvant être à l'origine de formes neuromeningées.

1.3.3 Caractéristiques morphologiques et moléculaires de quelques lymphomes

1.3.3.1 Les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL)

Les lymphomes diffus à grandes cellules B constituent la forme la plus fréquente des LNH avec une proportion estimée à environ 30-35% (14). Ce sont les lymphomes agressifs les plus fréquents. Ils relèvent d'une grande hétérogénéité moléculaire à la différence de l'aspect morphologique. Une perte de l'architecture ganglionnaire est observée en raison de la prolifération diffuse des cellules lymphomateuses. L'aspect morphologique des cellules ne permet pas de déterminer le sous-type histologique des DLBCL.

La classification repose sur des critères moléculaires. Les DLBCL se divisent en trois sous-groupes moléculaires distincts selon leur profil d'expression génique en ARNm déterminé initialement par des micropuces à ADN (Transcriptomique) (15) :

- Les DLBCL exprimant les gènes caractéristiques des cellules B du centre germinatif ou de phénotype GC (*Germinal Center*)
- Les DLBCL exprimant les gènes normalement induits lors de l'activation des cellules B dans le sang périphérique ou de phénotype ABC (*Activated B-Cell*).
- Les DLBCL dits « *others* » ne pouvant être classés dans aucun des deux groupes précédents. Il s'agit par exemple du lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B.

L'immunohistochimie permet de distinguer les deux premiers groupes en fonction de marqueurs exprimés par la cellule tumorale. Ces marqueurs sont repris dans un algorithme décrit par Hans (16). La positivité du marqueur CD10 oriente d'emblée vers le phénotype GC. Le marqueur BCL6 est également hautement spécifique des cellules B du centre germinatif. En effet, le gène *BCL6* code pour un facteur de transcription impliqué dans les fonctions et la formation du CG. Son rôle dans la lymphomagenèse est clairement établi (17,18). La positivité du marqueur BCL6 permet de conclure au phénotype GC dans les cas où les marqueurs CD10 et MUM-1 sont négatifs. Le marqueur MUM-1 appartient à la famille des facteurs de transcription régulant la voie de signalisation de l'interferon (IRF). L'oncogène *MUM-1/IRF4* est exprimé dans les cellules lymphoïdes activées et dans les plasmocytes. Dans ces derniers, le niveau d'expression le plus élevé est observé (19,20).

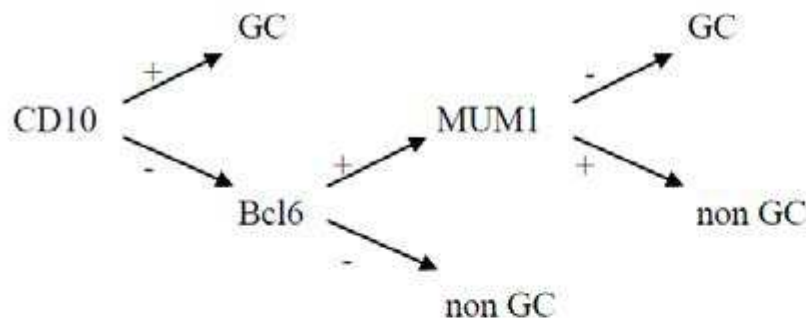


Figure 5 : Algorithme de Hans (16)

Cet algorithme présente un intérêt pronostique. En effet, le phénotype non GC ou ABC est plus péjoratif que le phénotype GC.

1.3.3.2 Les lymphomes folliculaires (LF)

Ils représentent la deuxième forme la plus fréquente des LNH avec une incidence évaluée à environ 20-25% (14). Ces lymphomes résultent de la prolifération d'une cellule du centre germinatif du follicule devenue tumorale comme en attestent les caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques. La dissémination sanguine du lymphome est rare (environ 10 %) : des petites cellules d'allure centroblastique-centrocytique sont observées sur le frottis sanguin. Leur rapport nucléo-cytoplasmique est proche de un : le cytoplasme étant difficilement visible. La chromatine du noyau est dense et dépourvue de nucléole. Une encoche du noyau est fréquemment observée et constitue un signe distinctif de ce type de lymphome donnant à la cellule un aspect en grain de café. L'immunophénotypage se caractérise par la positivité du CD10 dans 80% des cas, la forte intensité d'expression de l'Ig de surface et la négativité des marqueurs CD5 et CD23. Le score de Matutes varie de 0 à 2 (21).

L'examen cytogénétique retrouve dans 85% des cas une translocation t(14 ;18)(q32 ;q21) (22).

1.3.3.3 Les lymphomes lymphoplasmocytiques (LLP) et la maladie de Waldenström (MW)

Les LLP sont des lymphomes non hodgkiniens rares et se caractérisent par une population morphologique hétérogène selon l'OMS. Ils dérivent d'une cellule B post-centre germinatif ayant subi les hypermutations somatiques au sein du CG mais pas

la commutation isotypique de classe de l'Ig. C'est pour cette raison que le pic observé à l'électrophorèse des protéines sériques est de nature IgM. L'hypersécrétion de l'IgM est fréquemment associée à un syndrome d'hyperviscosité plasmatique et de troubles neurologiques centraux et/ou périphériques (23).

Morphologiquement, il s'agit de lymphocytes B matures d'allure lymphoplasmocytaire issus du ganglion et qui migreront ensuite dans la moelle osseuse. Le blocage de la différenciation lymphocytaire se produit avant le stade de plasmocyte mature (Figure 4).

Un des sous-types des LLP est la maladie de Waldenström qui représente moins de 5% des LNH. Le myélogramme retrouve une infiltration de la MO par des lymphoplasmocytes et la présence de mastocytes. L'expansion du clone lymphoplasmocytaire est fortement liée à la présence au niveau du microenvironnement de cytokines dont la principale est l'interleukine-6 (IL-6). Celle-ci a une action autocrine par l'intermédiaire des récepteurs à l'IL-6 à la surface des lymphoplasmocytes et participe à leur prolifération. Le lymphoplasmocyte sécrète lui aussi de l'IL-6 (24).

La présence de la mutation *MYD88*^{L265P} est retrouvée dans plus de 90% des cas (Figure 6) (25,26).

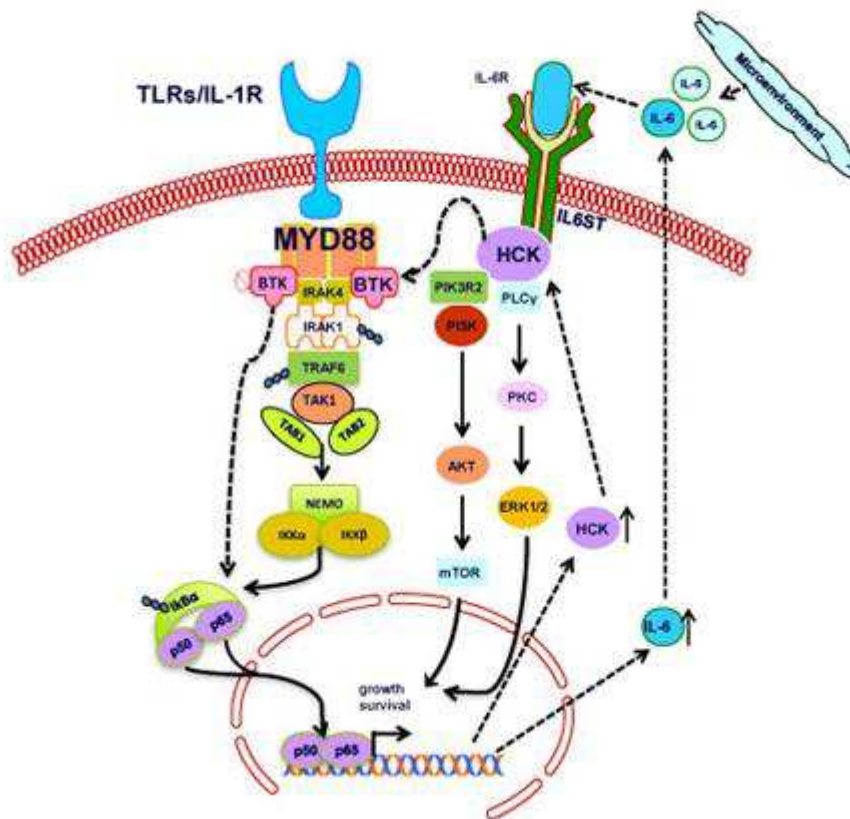


Figure 6 : Voie de signalisation impliquant la molécule adaptatrice MYD88 et la sécrétion cytokinique associée (27)

1.3.4 Principales voies de signalisation dans la lymphomagenèse et dérégulation de la synthèse de cytokines

Les cellules B malignes utilisent les voies de signalisation des cellules B normales afin d'assurer leur croissance et leur survie. Les diverses mutations sont à l'origine de l'activation des effecteurs de signalisation, de l'inactivation des régulateurs de signalisation et de l'activation de récepteurs autocrines. Au cours du processus lymphomateux, plusieurs voies de signalisation sont souvent activées simultanément. L'activation de la voie anti-apoptotique NFκB résulte de différents événements oncogéniques tels que les mutations somatiques dans le domaine TIR du gène *MYD88* et l'activation chronique du BCR à l'origine de la survie du LB (Figure 7) (8).

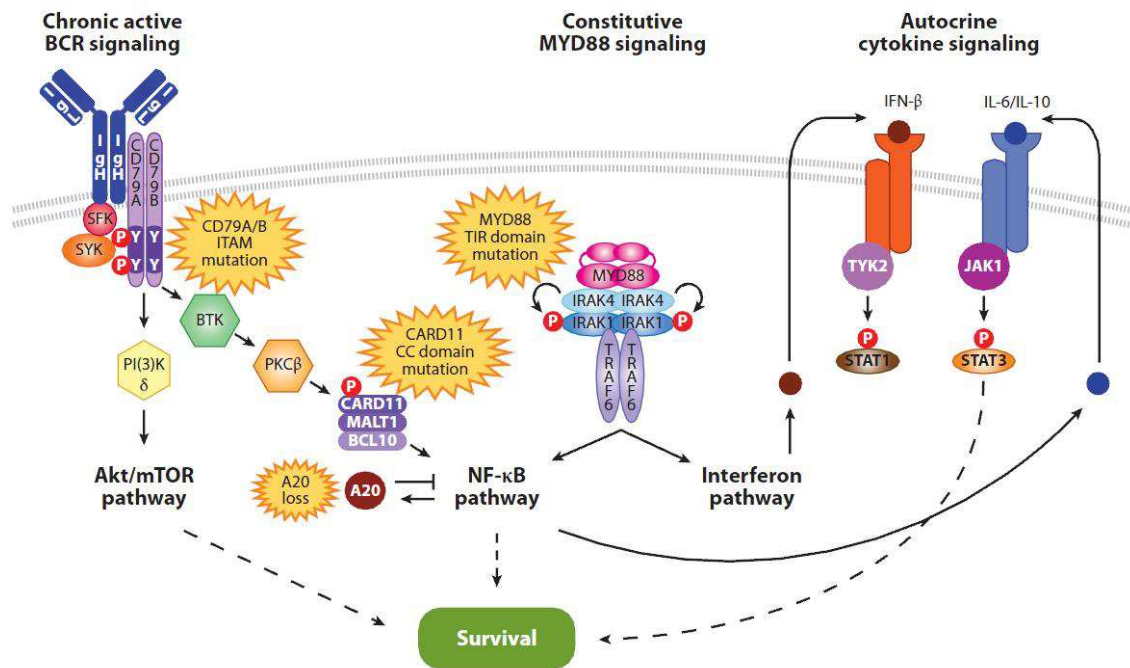


Figure 7 : Voies de signalisation à l'origine de la survie de la cellule lymphomateuse (8)

1.4 Evolution clonale des lymphomes

La cellule souche lymphomateuse possède des capacités à migrer et à se développer dans d'autres territoires. L'évolution du lymphome est évaluée régulièrement grâce à l'imagerie par Tomographie par Emission de Positons couplé à un scanner (TEP-scan) afin d'identifier le développement du lymphome dans de nouveaux sites anatomiques (28). L'évaluation est faite de façon comparative au TEP du diagnostic. Le suivi temporel de la maladie et des différents territoires atteints a montré l'émergence de différents sous clones issus du clone initial (29). L'étude des caractéristiques moléculaires permet de déterminer si les sous clones observés dérivent de la même cellule souche (30). L'objectif est d'établir la parenté entre deux localisations lymphomateuses car toute rechute, évolution ou transformation doit être documentée avant l'instauration d'un traitement.

2 Les lymphomes cérébraux ou neurolymphomes

Les lymphomes cérébraux représentent 1% des lymphomes non hodgkiniens et 5% des tumeurs cérébrales malignes (31). Celles-ci ont une incidence d'environ 5000 nouveaux cas par an en France. Les plus fréquentes sont les gliomes (32).

2.1 Anatomie et organisation structurelle du système nerveux (SN)

2.1.1 Définition du SN

Le système nerveux est constitué de l'ensemble du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs crâniens et rachidiens. Il se subdivise en deux parties : le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le SNC se compose de l'encéphale, regroupant le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral, et de la moelle épinière (Figure 8). Le SNC est dépourvu de tissu lymphoïde.

Le SNP est formé de l'ensemble des nerfs crâniens et rachidiens.

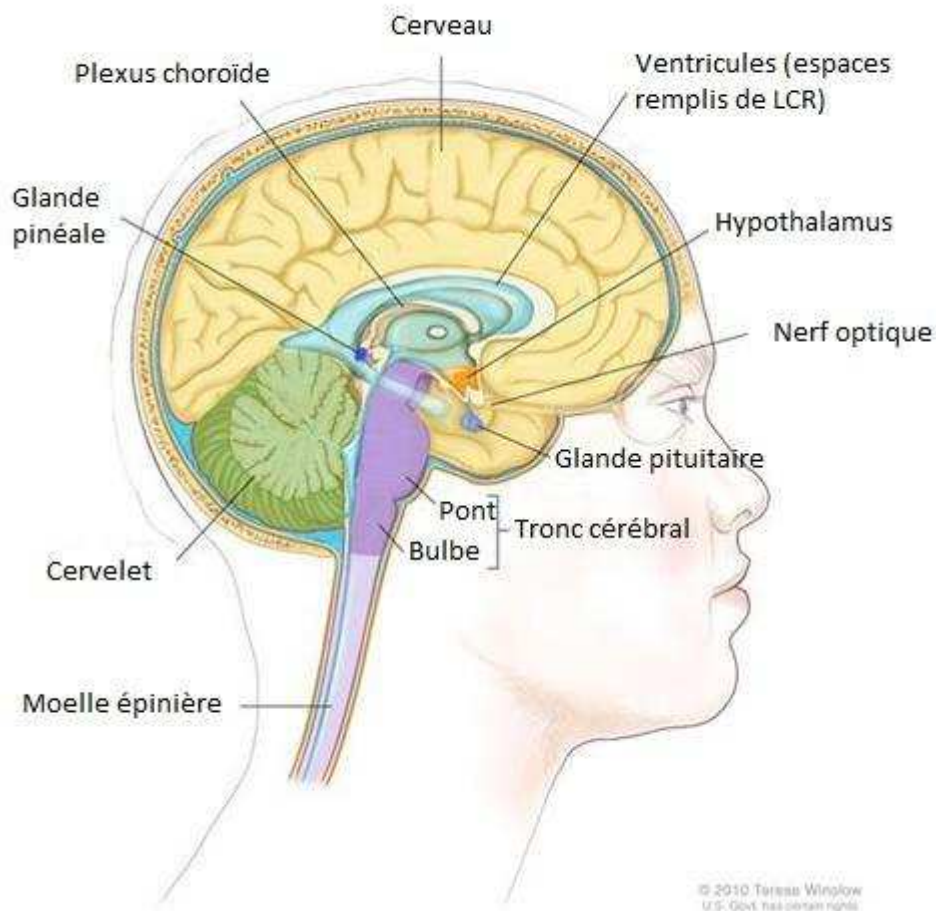


Figure 8 : Représentation anatomique du système nerveux central par Terese Winslow pour l'Institut National du Cancer (INCA), 2010

La protection du cerveau est assurée, de l'extérieur vers l'intérieur, par le crâne puis les méninges qui l'enveloppent avec une structure en trois feuillets : la dure-mère, la pie-mère et l'arachnoïde. Le LCR circule en partie au sein de l'espace sous arachnoïdien (Figure 9).

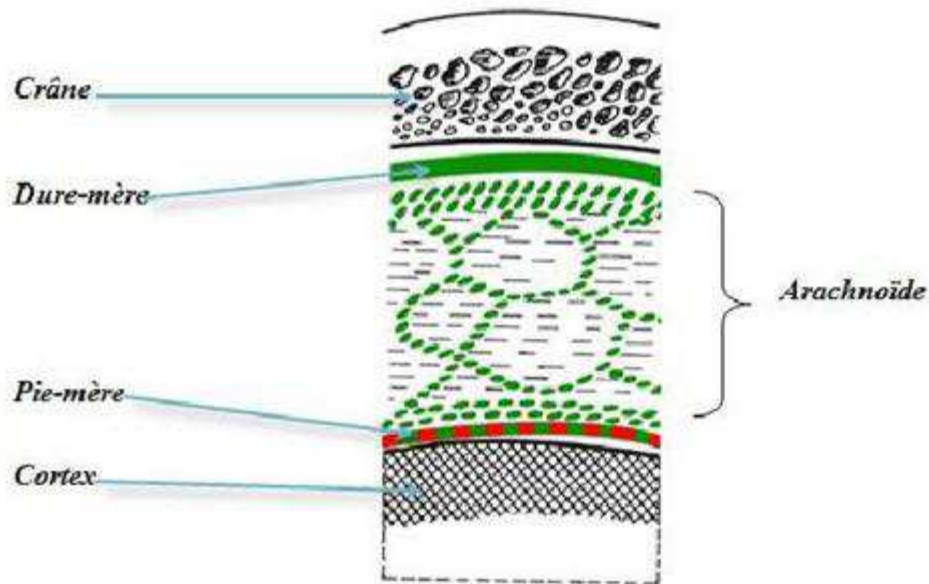


Figure 9 : Disposition générale des enveloppes protectrices du cerveau

2.1.2 Propriétés du liquide céphalo-rachidien

Le LCR est collecté au cours de la ponction lombaire. Les contre-indications principales de ce geste sont la présence de signes de focalisation neurologique, une suspicion d'hypertension intracrânienne, une thrombopénie inférieure à 50G/L, une anticoagulation active avec un TP inférieur à 50% et/ou un ratio TCA supérieur à 1,5 (33).

Le LCR est principalement formé dans les plexus choroïdes ventriculaires et distribué au sein du système ventriculaire et de l'espace sous arachnoïdien. Il assure différentes fonctions : l'apport de nutriments au SNC et l'élimination des résidus toxiques. Le LCR joue également le rôle d'absorbeur de choc. Sa composition physiologique dans l'espace sous arachnoïdien est la suivante :

- Concentration en protéines ou protéinorachie : 0,15 à 0,45 g/L ;
- Concentration en glucose ou glucorachie : 0,5 à 0,8 g/L ;
- Cellularité : 0 à 5 cellules leucocytaires par millimètre cube (mm³) ;
- pH d'environ 7,32.

La vitesse de formation du LCR est d'environ 20 millilitres (mL) par heure soit 500 mL par jour. Le LCR irrigue la totalité du système nerveux central et vient de ce fait au contact étroit de chaque partie du tissu cérébral. Ainsi, il est considéré comme la source idéale de composants cellulaires et de molécules pouvant traduire l'état des structures cérébrales. La ponction lombaire recueille jusqu'à 10 mL de LCR grâce à l'insertion d'une aiguille à PL entre la troisième et la quatrième vertèbre lombaire. L'analyse du LCR est utilisée pour le diagnostic et le suivi d'un nombre important de maladies neurologiques (34).

2.1.3 Les différentes barrières protectrices du SNC

Il existe trois barrières indispensables à l'intégrité du SNC :

- 1) La barrière hémato-méningée qui régit les échanges entre les capillaires cérébraux, c'est-à-dire le sang, et le LCR. Elle est située dans le plexus choroïde ;
- 2) La barrière hémato-encéphalique située entre le sang et l'encéphale ;
- 3) La barrière méningo-encéphalique séparant l'encéphale et les méninges (35).

La barrière hémato-encéphalique est formée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales dont sont formés les capillaires cérébraux. Les jonctions serrées comportent des molécules d'adhésion cellulaire : claudines, occludines (36). La nature imperméable de la BHE signifie qu'elle agit comme une interface fonctionnelle entre la circulation sanguine, le système immunitaire et le cerveau. L'entrée des éléments figurés du sang est limitée. Le cerveau est donc un site immunologique privilégié. La BHE assure un rôle protecteur et de défense contre les toxiques ou les agents infectieux circulant dans le sang. Cependant, la faible diffusion des médicaments au niveau du SNC est une problématique majeure dans le traitement des pathologies neuronales (tumeurs cérébrales, méningites infectieuses...).

Il existe plusieurs mécanismes à l'origine du transfert de cellules et de molécules entre le sang et le cerveau : la diffusion transmembranaire ou facilitée, le transport médié par un récepteur, la diffusion paracellulaire, la diapédèse. Ceux-ci se produisent physiologiquement pour permettre l'acheminement des éléments essentiels au fonctionnement cérébral (35). Ces mécanismes sont exacerbés dans le cas de l'inflammation neuronale chronique par exemple.

Le phénomène de diapédèse se produit et consiste au passage de cellules immunitaires à travers la BHE. Les leucocytes peuvent envahir le parenchyme du SNC à cause de la perte de l'intégrité de la BHE liée à l'inflammation. Les lymphocytes et les cellules myéloïdes sont les principaux médiateurs des dommages tissulaires en délivrant des cytokines au sein du tissu cérébral. Ceci alimente la cascade de l'inflammation. L'interleukine-1 β (IL-1 β), l'IL-6 et le TNF jouent un rôle central dans le processus inflammatoire (37). (Figure 10)

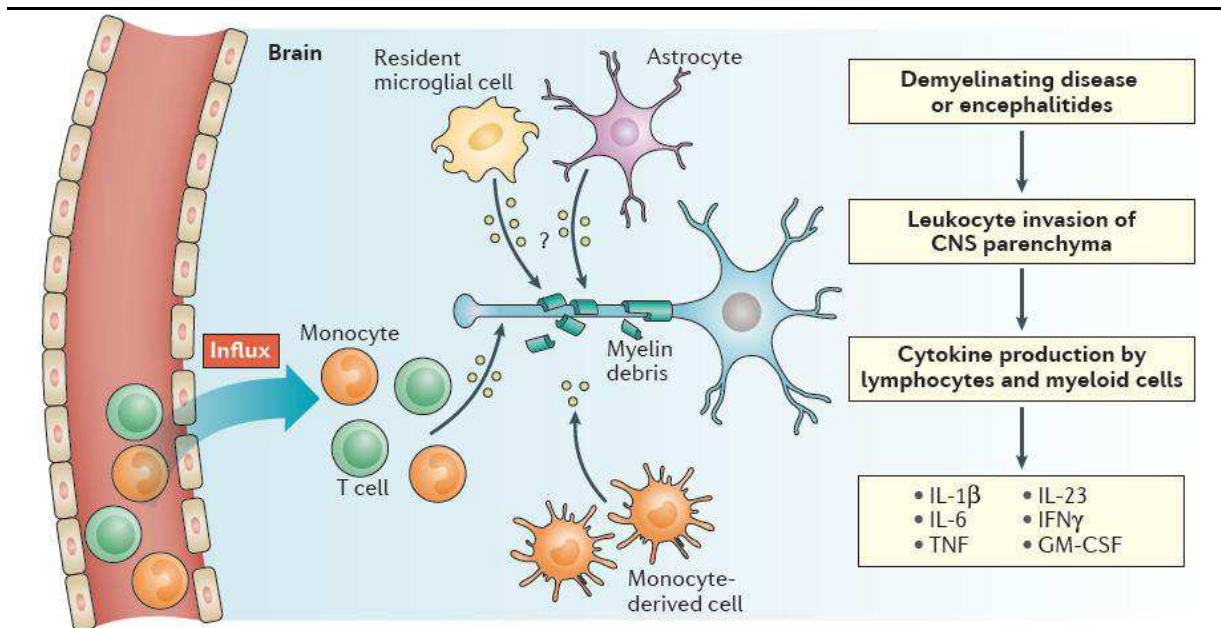


Figure 10 : Neuro-inflammation (37)

La rupture de la BHE est donc un évènement critique dans le développement et la progression de nombreux désordres cérébraux (Maladies neurodégénératives chroniques : maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladies neuro-inflammatoires chroniques : sclérose en plaques, neuropaludisme, tumeurs et métastases cérébrales...).

2.2 Tropisme neuro-méningé selon le type de LNH

Tous les lymphomes non hodgkiniens peuvent donner des atteintes malignes du système nerveux central. L'atteinte lymphomateuse du SNC est de pronostic sombre avec une survie moyenne évaluée à moins de 6 mois après le diagnostic (38). Il est donc primordial de définir les patients à risque de développer une localisation méningée afin de proposer une prophylaxie neuroméningée dès le diagnostic. Cependant, cette prophylaxie ne peut être appliquée à tous les patients en raison du risque élevé de neurotoxicité (39).

De nombreuses études se sont intéressées à identifier des facteurs de risque de localisation ou de rechute neuroméningée. Les principaux facteurs de risque retenus sont le nombre de sites extranodaux atteints, le taux de LDH, les localisations du lymphome dans certains sites anatomiques et l'index pronostique international (IPI) (40,41). Les localisations des LNH systémiques à haut risque d'envahissement du SNC sont les localisations : sinusale, testiculaire, médullaire, épidurale, rénale, surrénale et au niveau du sein (38,42). La présence et le nombre de facteurs de risque augmentent considérablement l'incidence d'envahissement secondaire du SNC (43). La prophylaxie neuro-méningée est donc indiquée chez ces patients à haut risque et diminue l'incidence de rechute au niveau du SNC à 1,6% comparativement à l'incidence de 5% observée en l'absence de prophylaxie (40,41).

La fréquence de survenue d'une dissémination au sein du SNC varie selon le type de lymphome non hodgkinien systémique. En effet, ce risque est évalué à moins de 2% pour les lymphomes indolents (LF, LZM, LLP), de 4 à 5 % pour les DLBCL et les lymphomes du manteau, 5 à 20 % pour les DLBCL avec des localisations à haut risque et les lymphomes du manteau variants blastoïdes (40).

Le risque de localisation méningée secondaire est plus important chez les patients atteints d'un LNH de haut grade de malignité ou agressif. La dissémination cérébrale des lymphomes indolents est rare et survient le plus souvent lors d'une transformation en lymphome plus agressif (41).

2.3 Localisations cérébrales secondaires à des lymphomes non hodgkiniens

2.3.1 LNH de bas grade : exemple de la maladie de Waldenström : le syndrome de Bing Neel

2.3.1.1 Définition

Le syndrome de Bing Neel (SBN) est une manifestation neurologique et pathologique très rare de la macroglobulinémie de Waldenström. Il résulte de l'infiltration du SNC par des cellules lymphoplasmocytaires malignes. Cette atteinte centrale peut révéler (1/3 des cas) ou compliquer la maladie de Waldenström (2/3 des cas). L'atteinte centrale peut être le seul signe de la progression de la maladie, c'est-à-dire que le SBN peut survenir alors que la maladie de Waldenström est en rémission avec un taux stable ou indétectable d'IgM (44).

2.3.1.2 Epidémiologie

Deux cas ont été décrits pour la première fois par Bing et Neel en 1936 soit sept ans avant la première description de la maladie de Waldenström. Il s'agit de deux patientes de 32 et 59 ans. Une hyperviscosité sanguine prononcée a été décrite pour les deux patientes. La patiente de 59 ans présentait des fourmillements et un défaut de sensibilité des doigts alors que la patiente de 32 ans décrivait une perte considérable de puissance dans les jambes, les bras et la totalité du corps ainsi que des vomissements importants et des céphalées intenses (45). Depuis cette première présentation de cas, au moins 50 cas ont été recensés avec le diagnostic de SBN. Deux études rétrospectives récentes décrivent respectivement 44 et 34 patients atteints du SBN qui s'ajoutent aux 50 cas déjà connus (46,47). L'incidence précise du SBN n'est pas connue.

2.3.1.3 Clinique

Les signes cliniques s'installent en général de manière progressive sur des semaines voire des mois et sont aspécifiques : céphalées, déficits cognitifs, paresthésies, symptômes psychiatriques (48). Ce qui souligne l'importance de s'appuyer sur des éléments paracliniques tels que l'imagerie et la biologie.

2.3.1.4 Diagnostic biologique

Le diagnostic est fait sur la présence de cellules lymphoplasmocytaires malignes en cytologie et par la clonalité des lymphocytes B du LCR qui doivent avoir les mêmes caractéristiques immunologiques que ceux de la moelle osseuse sur l'immunophénotypage multiparamétrique réalisé en CMF.

Le bilan diagnostique doit comprendre certains examens particuliers du liquide céphalo-rachidien dans le cadre de l'exploration d'un syndrome de Bing Neel.

L'immunofixation des protéines du LCR est utilisée pour déterminer l'isotype de la chaîne lourde et de la chaîne légère. Dans le cas présent, le résultat attendu est celui d'une chaîne lourde de type IgM associée à une monotypie Kappa ou Lambda. Le dosage des chaînes légères libres Kappa et Lambda et leur ratio Kappa/Lambda est également une aide au diagnostic. Cependant, la positivité de l'IgM monoclonale dans le LCR ne signifie pas obligatoirement la présence de cellules lymphoplasmocytaires méningées (49). En effet, s'il y a une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la protéine monoclonale peut diffuser à partir du sang dans le LCR.

Il faut donc s'assurer de l'intégrité de la BHE et de l'absence de contamination sanguine du LCR (50). Ces examens peuvent être réalisés en parallèle dans le sang et le sérum du patient. Les résultats sont ainsi comparés entre le sang et le LCR afin d'exclure une contamination sanguine du LCR. La synthèse intrathécale par le clone des cellules lymphoplasmocytaires malignes d'une Immunoglobuline (Ig) de type M monoclonale est pathognomonique du SBN.

La recherche de la mutation MYD88^{L265P} par PCR est retrouvée avec une forte prévalence de plus de 90% dans la maladie de Waldenström (25,26). Pour la majorité des patients, il s'agit d'une mutation ponctuelle avec le changement d'une leucine en proline en position 265.

2.3.2 LNH de haut grade : exemple des lymphomes diffus à grandes cellules B

La réalisation d'une ponction lombaire dans le groupe des patients atteints d'un DLBCL n'est pas systématique. Elle est indiquée si plus d'un site extra-ganglionnaire est atteint en association avec une élévation du taux de LDH ou en cas de localisation lymphomateuse à haut risque d'envahissement du SNC ou en cas de score IPI élevé ou en présence de réarrangement des gènes *c-MYC* et *BCL2/BCL6*. La prophylaxie neuro-méningée est indiquée chez ces patients, même si les résultats de la cytologie et de la CMF du LCR sont négatifs. Celle-ci consiste soit en l'injection de méthotrexate haute dose par voie intraveineuse en alternance avec une immunochimiothérapie ou des injections intrathécales de méthotrexate pendant les premiers cycles de chimiothérapies (4 à 6 doses). La prise en charge est thérapeutique quand la cytologie et la CMF sont positives et quand la CMF est positive isolément. Le traitement de l'atteinte leptoméningée consiste en l'association du méthotrexate par voie intraveineuse et par voie intrathécale en l'absence de contre-indication et avec un suivi pharmacologique adapté (Figure 11) (42).

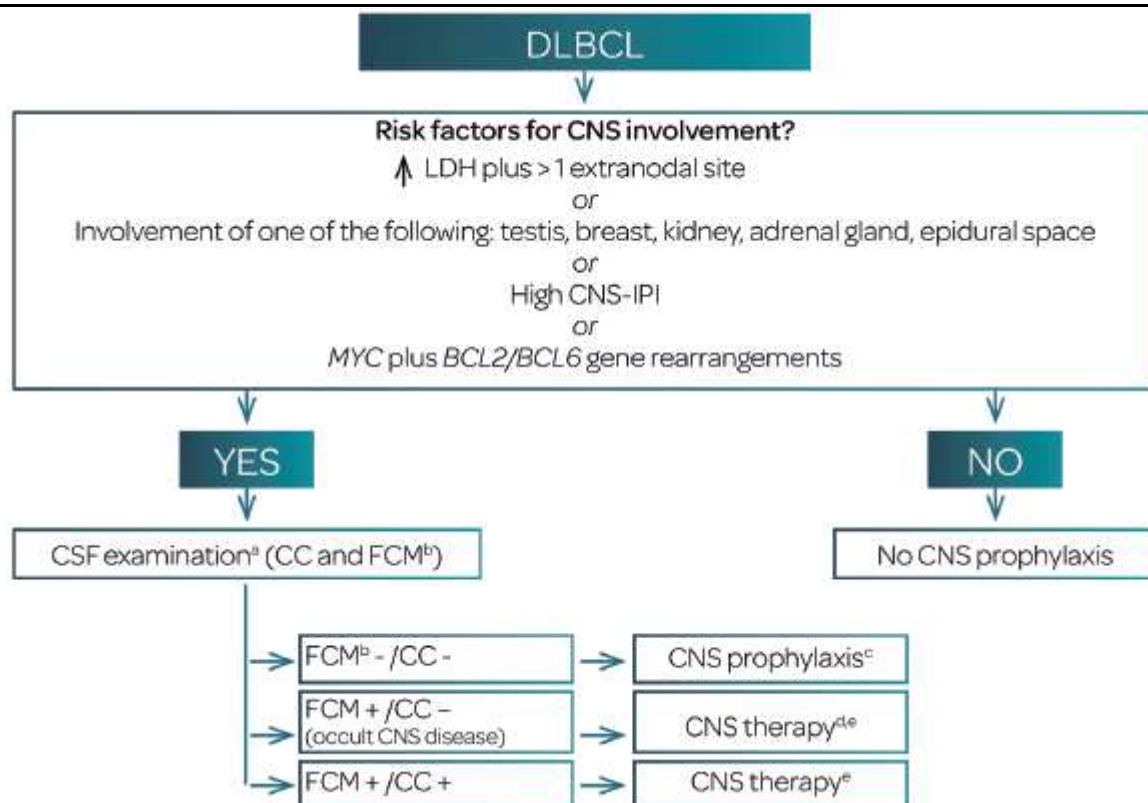


Figure 11 : Recommandations pratiques pour la réalisation d'une PL et pour la prise en charge prophylactique ou thérapeutique chez les patients atteints d'un DLBCL selon les résultats de la cytologie (CC) et de la cytométrie en flux (FCM) du LCR.

Le but est d'évaluer le risque d'envahissement du système nerveux central et de le rechercher.(42)

2.4 Le lymphome primitif du système nerveux central (LPSNC)

2.4.1 Épidémiologie et définition

L'incidence du LPSNC est en augmentation significative depuis une vingtaine d'années et est estimée à 250 nouveaux cas par an en France (51–53). Il s'agit d'un sous-type de tumeur cérébrale rare. Le sexe-ratio homme/femme est de 1,5. La maladie peut survenir à tous les âges avec un pic de fréquence aux alentours de 65 ans. La survenue de cette pathologie est favorisée dans un contexte de déficit immunitaire congénital ou acquis : infection par le VIH, traitement immunosuppresseur au long cours, contexte de post-transplantation d'organes... Cependant, la majorité de ces lymphomes survient chez des patients immunocompétents (54).

Le lymphome primitif du SNC appartient aux lymphomes non Hodgkiniens extra-ganglionnaires et correspond à l'entité de la classification de l'OMS 2016 : « DLBCL primitif du SNC » (Tableau 1). En effet, il s'agit histologiquement d'un lymphome diffus à grandes cellules B dans 95% des cas de LPSNC du sujet immunocompétent.

Le phénotype non GC est le plus communément observé et est associé à un mauvais pronostic (55).

La localisation du LPSNC peut se situer dans toute partie du système nerveux central : le cerveau, le cervelet, le tronc cérébral, la moelle épinière, les yeux et les méninges (56).

2.4.2 Physiopathologie du LPSNC et de l'atteinte leptoméningée

Le processus lymphomateux se développe aux dépens des structures du SNC bien que celui-ci soit dépourvu de tissu lymphoïde.

Le LPSNC atteint préférentiellement le parenchyme cérébral et l'atteinte leptoméningée n'est pas constante. La probabilité de détecter des cellules lymphomateuses dans le LCR est plus importante s'il existe une atteinte leptoméningée qu'en cas de localisation profonde du LPSNC, le liquide céphalo-rachidien circulant dans l'espace sous-arachnoïdien en contact étroit avec les méninges et l'espace ventriculaire. Cependant, la fréquence de cette atteinte au diagnostic diffère selon les études car elle semble difficile à mettre en évidence et varie selon les critères de positivité retenus. Le réseau expert national LOC a rapporté une atteinte leptoméningée dans 15% des LPSNC au diagnostic (54).

2.4.3 Signes cliniques

La présentation clinique dépend de la localisation de l'atteinte lymphomateuse. Les symptômes observés sont donc très variés : déclin cognitif, changement de personnalité, déficit neurologique focal, convulsions, céphalées, paralysie des nerfs crâniens. (31,57)

2.4.4 Eléments diagnostiques

2.4.4.1 Imagerie

En imagerie, l'examen de référence est l'imagerie cérébrale par résonance magnétique avec injection de gadolinium. L'aspect typique est celui de lésions prenant le contraste de façon intense et homogène sur la séquence d'imagerie T2 (31,58). Dans 70% des cas la lésion est unique, dans 30% des cas les lésions sont multiples chez l'immunocompétent. La localisation typique de la ou des lésions est

péri-ventriculaire (59). Les cellules lymphomateuses de la tumeur sont dans ces cas au contact du liquide céphalo-rachidien qui circule dans l'espace ventriculaire (60).

2.4.4.2 Diagnostic histologique

Le diagnostic de certitude du lymphome primitif du SNC est histologique. La biopsie cérébrale est réalisée dans des conditions stéréotaxiques après visualisation de la ou les lésion(s) tumorale(s) en imagerie. Avant la réalisation de la biopsie, l'absence de la prise de corticoïdes par voie orale ou intraveineuse devra être vérifiée. En cas de prise de corticoïdes, une fenêtre thérapeutique de 15 jours doit être observée en raison du risque de négativité de l'examen. (31)

2.4.5 Bilan d'extension

Le diagnostic de LPSNC se fait après la recherche d'un lymphome systémique à l'origine d'une dissémination au SNC. Pour éliminer toute atteinte systémique de lymphome, il est réalisé une imagerie par TEP.

Une recherche d'atteinte oculaire associée doit être réalisée systématiquement et est présente au diagnostic dans 15 à 20% des lymphomes primitifs cérébraux. La présentation clinique est celle d'une uvéite (54).

2.5 Le lymphome intra-oculaire primitif (LIOP)

Cette atteinte primitive est rare : 30 à 50 cas par an en France. Le LIOP ne présente pas d'envahissement du SNC initialement, ni d'atteinte systémique. Par sa localisation anatomique, il peut évoluer par contiguïté vers une atteinte cérébro-méningée dont la fréquence est évaluée à 60-80% des cas. Cette évolution se produit en moyenne 29 mois après le diagnostic initial. Lorsque les deux yeux sont atteints, le terme de lymphome oculo-cérébral est privilégié. L'histologie correspond à un DLBCL dans plus de 90% des cas (61).

2.6 Atteintes méningées métastatiques

Les métastases cérébrales peuvent être de type parenchymateuses ou se présenter sous forme d'atteintes leptoméningées. Dans les deux cas, celles-ci sont secondaires à des tumeurs solides. Les cancers primitifs du poumon, du sein et de la peau sont ceux où l'incidence d'une localisation cérébrale secondaire est la plus élevée. Le cancer broncho-pulmonaire représente la première cause de métastases cérébrales et sont présentes dans 20% des cas au diagnostic de ce cancer (62).

3 Outils diagnostiques disponibles au laboratoire d'hématologie pour caractériser une infiltration lymphoïde maligne du SNC

3.1 Etude cytomorphologique du LCR

L'examen cytologique est considéré comme la méthode « *gold standard* » pour la mise en évidence de cellules tumorales méningées. Une prise d'essai de 50 à 100µL de liquide céphalo-rachidien est cytocentrifugée afin d'obtenir un dépôt concentrique où un maximum de cellules est concentré sur une surface délimitée de la lame. La lame est ensuite colorée au May Grünwald Giemsa avant observation au microscope. L'observation à l'objectif x100 permet de mieux visualiser l'aspect de la chromatine des cellules. Les caractéristiques morphologiques des cellules lymphomateuses sont la grande taille des cellules, la persistance de la basophilie, les irrégularités nucléaires (Encoches profondes, replis et bourgeonnements de la chromatine), la présence d'un ou plusieurs nucléoles et les irrégularités cytoplasmiques (63,64). Ces caractéristiques sont illustrées par la figure 12.

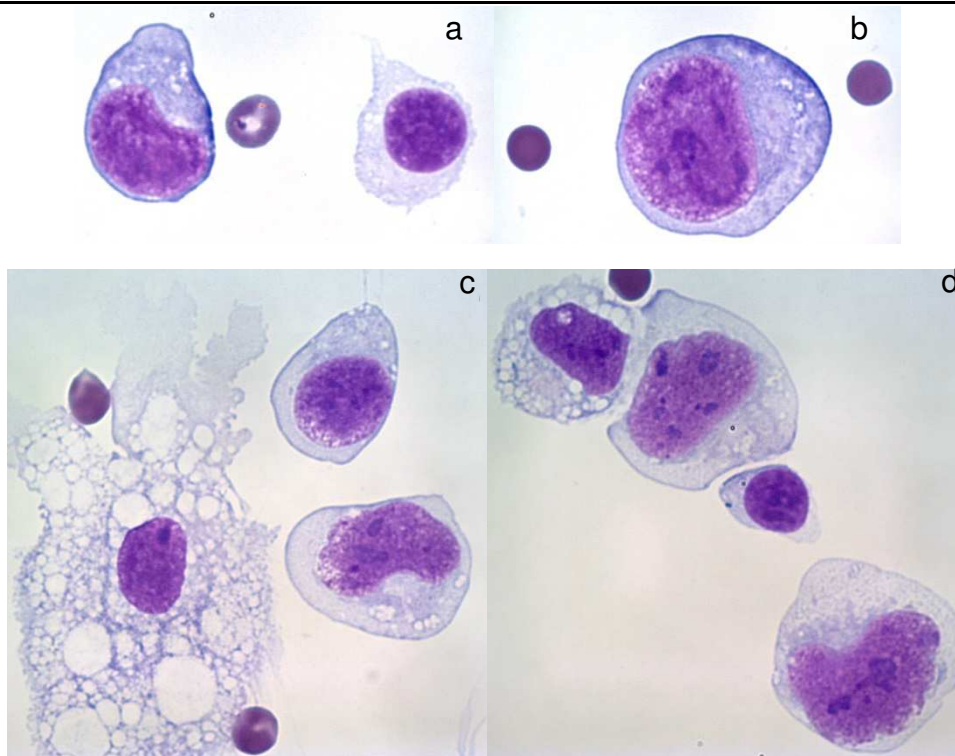


Figure 12 : Cytologie à partir de la cytocentrifugation du LCR d'une patiente avec suspicion de lymphome cérébral, après coloration au MGG.

a : de gauche à droite : grande cellule maligne basophile, hématie, lymphocyte ; b : deux hématies et une grande cellule maligne basophile au centre ; c : un histiocyte avec deux hématies à gauche et deux grandes cellules malignes basophiles ; d : trois grandes cellules malignes basophiles et un lymphocyte au centre.

3.2 Immunophénotypage cellulaire du LCR

L'analyse en cytométrie en flux du LCR nécessite l'immunomarquage préalable des cellules par des anticorps couplés à des fluorochromes. Ces anticorps sont spécifiques d'antigènes ou de marqueurs immunologiques présents à la surface des cellules, appelés également « *clusters* de différenciation » (CD). Physiologiquement, le LCR contient moins de 5 leucocytes/mm³ qui sont essentiellement des lymphocytes T CD4+. Les caractéristiques immunologiques des cellules lymphomateuses orientent le panel d'anticorps choisis pour l'immunomarquage. Les anticorps anti-CD45, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD5, anti-CD10 sont utiles à la détermination des propriétés immunologiques des cellules lymphomateuses. Les anticorps anti-chaînes légères Kappa et Lambda permettent de détecter une éventuelle monotypie des lymphocytes B.

3.3 Etude de la clonalité des lymphocytes par PCR

En cas de forte suspicion de localisation neuroméningée d'un lymphome et en l'absence de cellules lymphomateuses révélées en cytologie et en CMF, une étude de réarrangement des gènes des chaînes légères et des chaînes lourdes peut être effectuée par PCR. Cette étude amplifie la région CDR-3 du gène *IgH*. Dans les cas de prolifération maligne ou monoclonale des lymphocytes, toutes les cellules dérivent de la même cellule souche lymphomateuse présentant un réarrangement unique de la portion VDJ. Ceci entraîne la présence d'une bande unique sur le gel d'agarose (43,65).

4 Diagnostics différentiels d'une infiltration lymphoïde maligne du SNC

Les principaux diagnostics différentiels sont :

- Les autres tumeurs primitives du SNC : tumeurs du tissu neuroépithélial (astrocytomes, oligodendrogliomes, épendymomes, tumeurs des plexus choroïdes, gliomes mixtes...), tumeurs méningées, tumeurs à cellules germinales, tumeurs de la région sellaire, tumeurs métastatiques (66);
- Les atteintes neurologiques de maladies inflammatoires systémiques : sclérose en plaques, sarcoïdose, périartérite noueuse, vascularites, connectivites, granulomatoses, histiocytoses avec cellules de Langerhans (67);

- Les syndromes neurologiques paranéoplasiques non expliqués par une complication métastatique, iatrogène, infectieuse, métabolique, compressive ou carencielle (68).

5 Réponse immunitaire et sources cellulaires de la sécrétion cytokinique

Une réponse immunitaire s'organise en réponse à une situation inflammatoire ou tumorale. Les cellules présentatrices d'antigènes interagissent avec les lymphocytes TCD4⁺ auxiliaires ou T *helper* (Th). Grâce à cette interaction et à la production de cytokines par les CPA et les cellules NK, une maturation et une différenciation des LTCD4⁺ en lymphocytes T Th1/Th2 seront induites (69). L'IL-12 joue un rôle important dans le développement de la réponse lymphocytaire Th1 capable d'initier une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Cette réponse Th1 se caractérise par la production des cytokines : IL-2, IFN-gamma et TNF. La réponse lymphocytaire Th2 est déclenchée sous l'influence de l'IL-4 et initie une réponse immunitaire à médiation humorale. La réponse Th2 est à l'origine de la production des cytokines : IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. L'IL-3 et le GM-CSF sont produits par les deux types de réponse lymphocytaire Th1 et Th2 (70). Une inhibition réciproque est observée entre les deux systèmes Th1 et Th2. L'IL-10 inhibe la réponse lymphocytaire Th1 et la sécrétion cytokinique associée. De la même façon, l'IFN-gamma inhibe la réponse lymphocytaire Th2 (71).

6 Les cytokines

Les cytokines sont des messagers intercellulaires ayant un rôle dans la réaction inflammatoire, l'hématopoïèse et la réponse immunitaire. Ce sont des glycoprotéines de faible poids moléculaire (8 à 70 kDa) qui agissent à très faibles concentrations : entre le nanomole/mL et le picomole/mL, en cascade et en réseau de régulation. (72)

6.1 L'interleukine-1bêta (IL-1 β)

Le gène de l'IL-1 β code une protéine composée de 269 acides aminés dont le poids est d'environ 30 kilodaltons (kDa). La synthèse de la forme précurseur de l'IL-1 β est déclenchée par des signaux inflammatoires et pathogènes tels que le lipopolysaccharide bactérien. Ensuite, l'activation de la forme précurseur se fait par clivage protéolytique par l'enzyme caspase-1 (73). L'IL-1 β est sécrétée

principalement par les monocytes et les macrophages activés (74). Cette cytokine possède des propriétés pro-inflammatoires puissantes et pyrogènes (75). Elle active les polynucléaires neutrophiles (PNN), les lymphocytes T et les lymphocytes B. Parmi les fonctions de l'IL-1 β , celle-ci est capable de stimuler la production d'anticorps et la synthèse d'IL-2, d'IL-6 et d'IL-8 (73).

6.2 Le *Tumor necrosis factor* (TNF)

Le gène du TNF code une protéine de 233 AA et d'environ 25 kDa (76). Le TNF a des propriétés inflammatoires, anti-tumorales et pyrogènes et active la sécrétion d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8 (77). Le TNF amplifie et entretient ainsi le processus inflammatoire. Il est sécrété par les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les cellules NK (78). Son rôle a été prouvé dans la physiopathologie de nombreuses maladies inflammatoires auto-immunes et des thérapeutiques anti-TNF ont été développées.

6.3 L'interleukine-12p70 (IL-12p70)

L'IL-12p70 est un hétérodimère de 70kDa comprenant une sous-unité p35 de 30-33 kDa et une sous-unité p40 de 35-44 kDa (79). L'IL-12p70 est un facteur induisant la différenciation, la prolifération et le maintien de la sous population Th1. Cette cytokine augmente l'activité cytotoxique des cellules NK et des lymphocytes T. Elle est produite en réponse aux composants bactériens tels que le LPS, aux pathogènes intracellulaires et à l'interaction avec les cellules T activées. Cette cytokine a un rôle critique dans la pathogénèse d'une variété de maladies liées à l'immunité (SEP), dans les infections virales et bactériennes (VIH, *Mycobacterium tuberculosis*), choc septique... L'IL-12p70 est synthétisée par les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. (80)

6.4 L'interleukine-8 (IL-8)

L'IL-8 se présente sous la forme d'un peptide précurseur de 99 AA d'environ 11 kDa avant d'être clivée en isoformes actives. L'IL-8 ou CXCL8 est une chimiokine angiogénique et chimioattractive capable d'attirer les polynucléaires neutrophiles (PNN), les polynucléaires basophiles, les lymphocytes T au site de l'infection et favorise la phagocytose. L'IL-8 est impliquée dans l'activation des PNN. Elle est libérée par plusieurs types cellulaires : monocytes, lymphocytes, granulocytes,

fibroblastes, cellules endothéliales, astrocytes et cellules épithéliales en réponse à une situation inflammatoire. (79,81)

6.5 L'interleukine-6 (IL-6)

Le gène de l'IL-6 code une protéine de 212 AA et d'environ 23 kDa. L'IL-6 est une cytokine inflammatoire sécrétée par les macrophages et les lymphocytes T à la phase aiguë d'une lésion tissulaire ou d'une infection. L'IL-6 a une action sur les lymphocytes T et les lymphocytes B. Elle est également appelée « facteur de stimulation des lymphocytes B ». Son rôle est essentiel dans la différenciation finale des lymphocytes B en plasmocytes (82). La surexpression d'IL-6 a été décrite dans certaines pathologies lymphoïdes B telles que le myélome et la maladie de Waldenström (72).

6.6 L'interleukine-10 (IL-10)

Le gène de l'IL-10 code un peptide de 178 AA d'environ 35-40 kDa. L'IL-10 est sécrétée sous la forme d'un peptide mature de 160 AA (83). L'IL-10 agit comme un facteur de croissance en participant à la différenciation et à la prolifération des lymphocytes B (84). Cette cytokine est également appelée « facteur d'inhibition de la synthèse des cytokines » puisqu'elle antagonise la génération de la sous-population Th1 des lymphocytes T auxiliaires. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par les lymphocytes T Th2 et agit sur les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages. Cette cytokine inhibe les cellules présentatrices d'antigène et la synthèse de cytokines : IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IFN-gamma, TNF et GM-CSF. L'IL-10 est produite après la libération de cytokines inflammatoires pour empêcher des lésions tissulaires irréversibles (72,83).

7 La cytométrie en flux appliquée au dosage d'analytes solubles

7.1 Principes de fonctionnement du cytomètre NaviosTM (Beckman Coulter)

Un cytomètre associe 3 systèmes : un système fluide, un système optique et un système électronique et informatique. Le système fluide se compose d'un liquide de gaine pressurisé caractérisé par un flux continu. Il a pour but de réaliser une focalisation hydrodynamique de l'échantillon, c'est-à-dire que les éléments à analyser sont au centre de cette veine liquide. Il permet d'amener les cellules ou les

particules une à une devant les lasers et toujours au même niveau. Le banc optique du cytomètre NaviosTM est composé de trois lasers capable d'exciter les fluorochromes des anticorps fixés à la surface des cellules ou des particules. Les longueurs d'onde d'excitation des lasers à lumière monochromatique sont de 488 nm pour le laser bleu, 638 nm pour le laser rouge et 405 nm pour le laser violet. Les fluorochromes excités émettent une fluorescence à une longueur d'onde supérieure à celle d'excitation. Il s'agit de la longueur d'onde d'émission.

Le système optique se compose également d'un appareillage de collection des signaux de fluorescences émises. Le signal de diffraction de la lumière à petit angle, correspondant à la taille de la cellule ou « *Forward scatter* », est détecté par les photodiodes. Les photomultiplicateurs (PMT) détectent le signal de diffraction de la lumière à grand angle, correspondant à la structure de la cellule ou « *Side scatter* », et les fluorescences. Ils sont capables de détecter et d'amplifier des signaux lumineux très faibles. Le cytomètre NaviosTM de chez Beckman Coulter possède 10 PMT permettant d'analyser 10 émissions de fluorescence. Les détecteurs (PMT) convertissent les signaux optiques en signaux électriques et les amplifient selon les réglages de leurs voltages. L'utilisateur peut donc modifier le voltage des PMT, l'augmentation du voltage permet l'amplification du signal de fluorescence ce qui déterminera la sensibilité de détection de fluorescences de faible intensité et permettra de séparer les événements positifs et négatifs. Les filtres et les miroirs sont placés devant chaque type de détecteur afin de récupérer le signal lumineux correspondant à une longueur d'onde choisie et émis par un fluorochrome spécifique.

Chaque fois qu'un signal est généré, le système électronique mesure la hauteur de l'impulsion (volts), sa largeur et sa surface, la hauteur étant proportionnelle à l'intensité du signal. Un convertisseur analogique numérique convertit ces «impulsions» en signaux numériques enregistrés par le logiciel d'exploitation du cytomètre. (85,86)

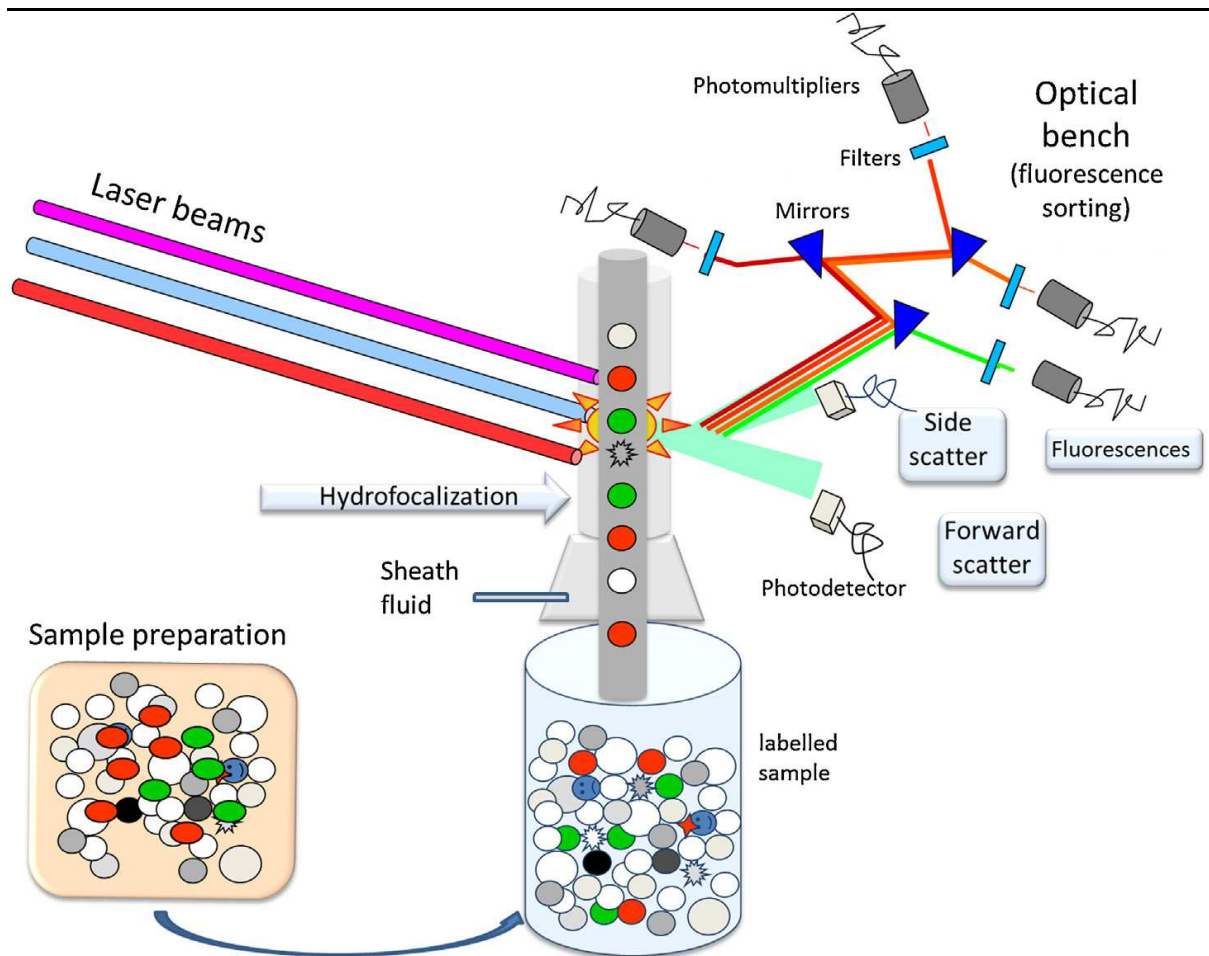


Figure 13 : Principes de fonctionnement d'un cytomètre en flux (86)

7.2 Principe de la méthode *Cytometric Bead Array*

Il s'agit d'une méthode multiplexe permettant la détection simultanée de plusieurs analytes solubles au sein d'un même échantillon en cytométrie en flux. L'analyse repose sur un mélange de billes de capture recouvertes de l'anticorps spécifique de la cytokine à doser. Le principe de la méthode de dosage est détaillé sur la figure 14.

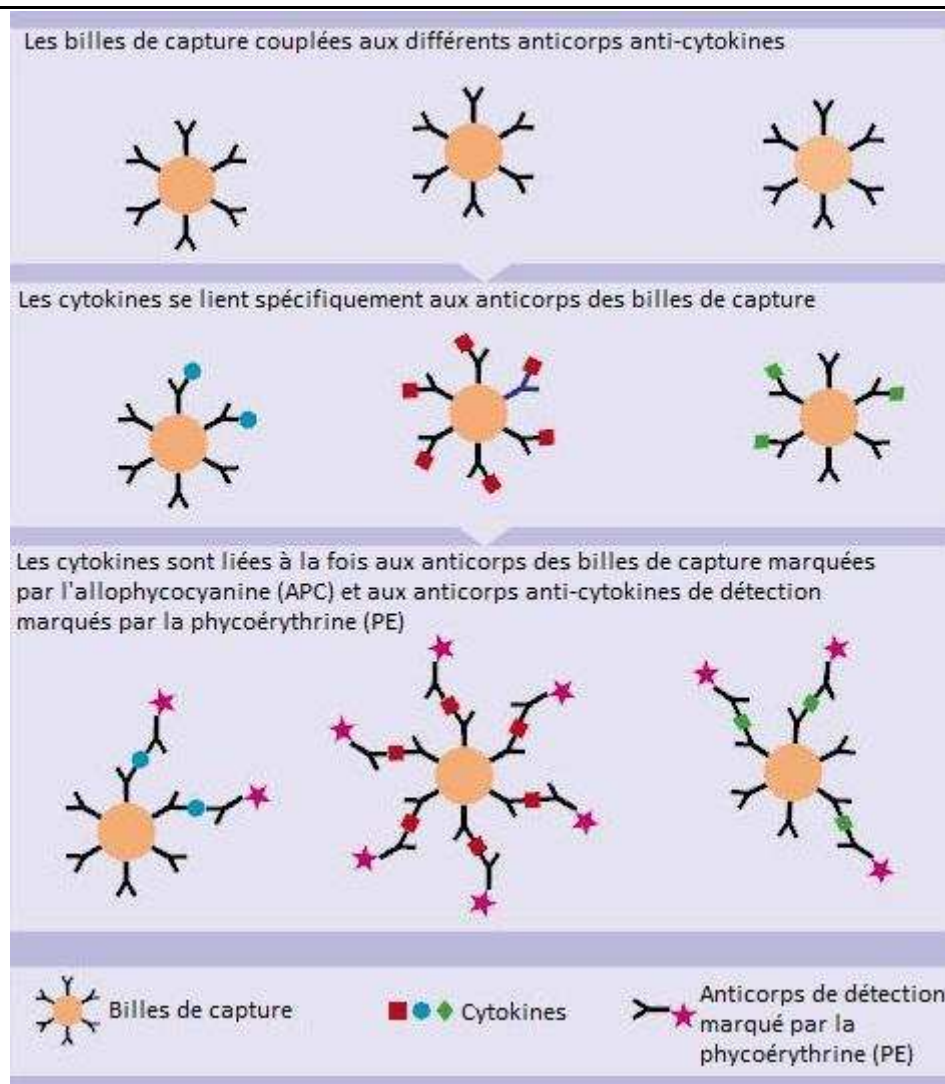


Figure 14 : Principe de dosage des cytokines par la méthode Cytometric Bead Array.

La méthode s'apparente à une technique ELISA sandwich. L'anticorps de détection secondaire reconnaît un autre épitope de la cytokine que celui reconnu par la bille de capture.

Le mélange de billes est constitué de six populations de billes qui diffèrent par leur intensité de fluorescence dans le canal FL6. Cette caractéristique permet de les séparer dans le canal FL6 selon leurs propriétés de fluorescence intrinsèques. Ainsi, chaque pic correspond à une population de billes de capture anti-cytokines : IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β et IL-8.

La quantification se réalise à l'aide de l'histogramme biparamétrique FL6 versus FL2. La phycoérythrine (PE) appartient aux fluorochromes brillants. Ce fluorochrome a donc été choisi par le fabricant pour détecter sur chacune des billes la quantité de cytokines fixée. La brillance de ce fluorochrome permet d'avoir un signal mesurable

même quand très peu de molécules de la cytokine sont capturées par la bille. Au total, la nature de la cytokine est donnée par la fluorescence en FL6 et la quantité de cette cytokine par la fluorescence en FL2.

Une gamme étalon est réalisée à partir de cytokines lyophilisées. Une modification du signal est alors observée en fonction de la concentration en cytokines pour chacun des points de gamme. La progression de la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) est reportée sur un graphique en ordonnée avec en axe des abscisses les concentrations théoriques des points de gamme.

II Méthodologie : patients, matériel et méthodes

1 Patients

Nous avons étudié de manière prospective entre janvier 2016 et mai 2017 une cohorte composée de 53 patients ayant bénéficié d'une ponction lombaire au CHRU de Lille et dans les CH périphériques d'Arras, Boulogne, Tourcoing et Valenciennes. Le transport des LCR est effectué à 4 degré Celsius (°C) pour les hôpitaux extérieurs à Lille.

Nous avons complété notre série de prélèvements en y ajoutant de manière rétrospective 5 patients présentant une suspicion de syndrome de Bing Neel. Ces échantillons provenaient des Centres Hospitaliers de Clermont-Ferrand (transport à -80°C) et de Valenciennes.

L'immunophénotypage cellulaire et le dosage des cytokines sont réalisés sur le même tube de LCR. L'analyse cellulaire en cytométrie en flux est réalisée par immunomarquage des cellules après centrifugation du LCR. Le surnageant de ce LCR est congelé à -80°C. Au total, 56 LCR ont été analysés par les deux méthodes.

Les données cliniques et biologiques ont été obtenues à partir des dossiers patients informatisés. Chaque prélèvement (P) est désigné par un numéro. Trois patients ont eu une seconde ponction lombaire, ce qui est indiqué par l'appellation « bis ».

Les patients ont été répartis en différents groupes selon l'hypothèse diagnostique et le contexte clinique.

A) Groupe de patients avec pathologies hématologiques :

1) Patients immunocompétents avec suspicion de lymphome primitif du système nerveux central (LPSNC) :

(Nombre de patients n= 3)

- P38, P38bis
- P39
- P84

2) Lymphomes non hodgkiniens (LNH) :

2.1) LNH de haut grade ou agressifs, à haut risque d'envahissement du SNC :

(n=8)

- Lymphome B à grandes cellules intra-vasculaire : P62
- DLBCL GC : P76
- DLBCL non GC : (n=4) P80, P85, P93, P99
- Lymphome de Burkitt : P83
- DLBCL EBV+ : P102

2.2) LNH de bas grade ou indolents :

(n=3)

- LNH folliculaire : P47
- LNH du manteau : P22
- Lymphome CD5- CD10- : P70

3) Maladie de Waldenström

3.1) Suspicion d'un syndrome de Bing Neel :

(n=6)

- P69, P104, P105, B, D, E

3.2) Suivi d'un syndrome de Bing Neel :

(n=3)

- P74, P104bis, A

4) Autres pathologies hématologiques :

(n=4)

- Myélome multiple : P6
- Maladie de Hodgkin : P9
- LAM : P24
- LLC : P51

B) Patients relevant de l'oncologie :

(n=2)

- Néo-mammaire : P61
- Adénocarcinome bronchique : P68

C) Autres pathologies non hématologiques :

1) Maladies neuro-inflammatoires :

(n=13)

- Sclérose en plaques (SEP) : (n=4) P3, P20, P28, P55, P55bis
- Sarcoïdose (Suspicion de neuro-sarcoïdose) : P5, P19
- Myélite : P18, P56
- Pseudopolyarthrite rhizomélique cortico-dépendante : P33
- Péri-artérite noueuse : P49
- Méningo-radiculite : P72
- Méningo-encéphalite : P75
- Polyradiculonévrite : P90

2) Troubles neurologiques divers :

(n=12)

a) Céphalées

(n=3)

- Syndrome cérébelleux (Céphalées, vertiges) : P7, P111
- Algie vasculaire de la face : P57

b) Troubles moteurs

(n=5)

- Ataxie spinocérébelleuse : P10, P23
- Mouvements choréiques : P66
- Paraplégie : P67
- Myopathie myotonique proximale (Maladie de PROMM) : P91

c) Autres :

(n=4)

- Epilepsie : P36, P59
- Fibromyalgie : P96
- Lésion du pédoncule cérébelleux : P10

2 Matériel

Réactifs :

- Kits cytokines inflammatoires humaines Cytometric Bead Array (CBA), 80 tests par kit, référence catalogue 551811, Becton Dickinson (BD®)
- Cytokine lyophilisée, IL-6 humaine recombinante 20 µg, référence catalogue 78050.1, Stemcell™ technologies
- Panel d'anticorps marqués par les fluorochromes correspondants :

CD	Fluorochrome	Fournisseur	Clone	Référence	Isotype	Spécificité
CD2	PE	lotest	39C1.5	A07744	IgG2a	Lymphoïde T
CD3	AA750	lotest	UCHT1	A94680	IgG1	Lymphoïde T
CD4	PB	lotest	13B8.2	B49197	IgG1	Lymphoïde T
CD5	PC7	lotest	BL1a	A21690	IgG2a	Lymphoïde T
CD7	FITC	lotest	8H8.1	A07755	IgG2a	Lymphoïde T
CD8	PC5.5	lotest	B9.11	B21205	IgG1	Lymphoïde T
CD10	AA700	lotest	ALB1	A86353	IgG1	Lymphoïde B
CD19	ECD	lotest	J3119	A07770	IgG1	Lymphoïde B
CD20	PB	lotest	B9E9	B49208	IgG2a	Lymphoïde B
CD45	KO	lotest	J33	A96416	IgG1	Panleucocytaire
CD56	APC	lotest	N901 (NKH-1)	IM2474	IgG1	Lymphoïde NK
Kappa	FITC	Dako	Polyclonal	F0434	Fab	Lymphoïde B
Lambda	PE	Dako	Polyclonal	F0437	Fab	Lymphoïde B
Glycophorine A CD235a	PE	Dako	JC159	R7078	IgG1	Erythroïde

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour l'immunomarquage des cellules du LCR

Equipements:

- Cytomètre en flux Navios™ 10 couleurs, équipé de 3 lasers 405 nm, 488 nm et 638 nm.
- Agitateur de plaques Labnet™ Shaker 20 (500 RPM pendant 5 minutes)
- Vortex VTX 500 electronic tube shaker LMR®

Logiciels:

- Logiciel d'analyse des fichiers d'acquisition obtenus par la méthode CBA :
- FCAP Array™ version 3.0
- Logiciels de réanalyse des graphes obtenus après passage des tubes au cytomètre : Kaluza® et Navios Software®.

3 Méthodes

3.1 Mode opératoire de l'immunophénotypage des lymphocytes dans le LCR

3.1.1 Immunomarquage des cellules

Etapes préalables :

- Effectuer la numération des éléments du LCR : leucocytes et hématies, en cellule de Nageotte
- Renseigner la fiche technique pour l'aspect macroscopique et la quantité de LCR
- Centrifuger à 430G pendant 5 minutes à 20°C puis récupérer le surnageant pour congélation à -80°C
- Faire un lavage en RPMI et SVF dilué à 10% à 37°C puis centrifuger (430G, 5 minutes, 20°C) et éliminer le surnageant
- Remettre en suspension avec 250 µL de PBS+SAB1%

Immunomarquage :

- Dans un premier tube, effectuer le mélange d'anticorps dont le panel est cité ci-dessous : 5 µL de chaque anticorps dans 50 µL de PBS+SAB1%. Le marquage par la glycophorine A est effectué dans un second tube selon le même protocole.

Fluorochromes	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA700	AA750	PB	KO
Tube 1	K-7	L-2	19	8	5	56	10	3	20	45
Tube 2	-	glycoA	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 3 : Composition des tubes utilisés pour l'immunophénotypage des LCR

- Ajouter 100 µL de la suspension cellulaire du LCR au mélange d'anticorps du premier tube et 100 µL de la suspension cellulaire du LCR au tube contenant la glycophorine A
- Incuber 15 minutes à température ambiante à l'obscurité
- Laver avec du PBS, centrifuger, éliminer le surnageant puis reprendre les cellules dans 500 µL de PBS.

3.1.2 Acquisition au cytomètre

Les tubes doivent être conservés à l'abri de la lumière et à 4°C jusqu'au passage au cytomètre.

- Réaliser un cycle de rinçage du cytomètre avant de passer les tubes
- Acquérir 10 000 évènements minimum (selon la cellularité du prélèvement).

3.1.3 Masque et stratégie d'analyse des données

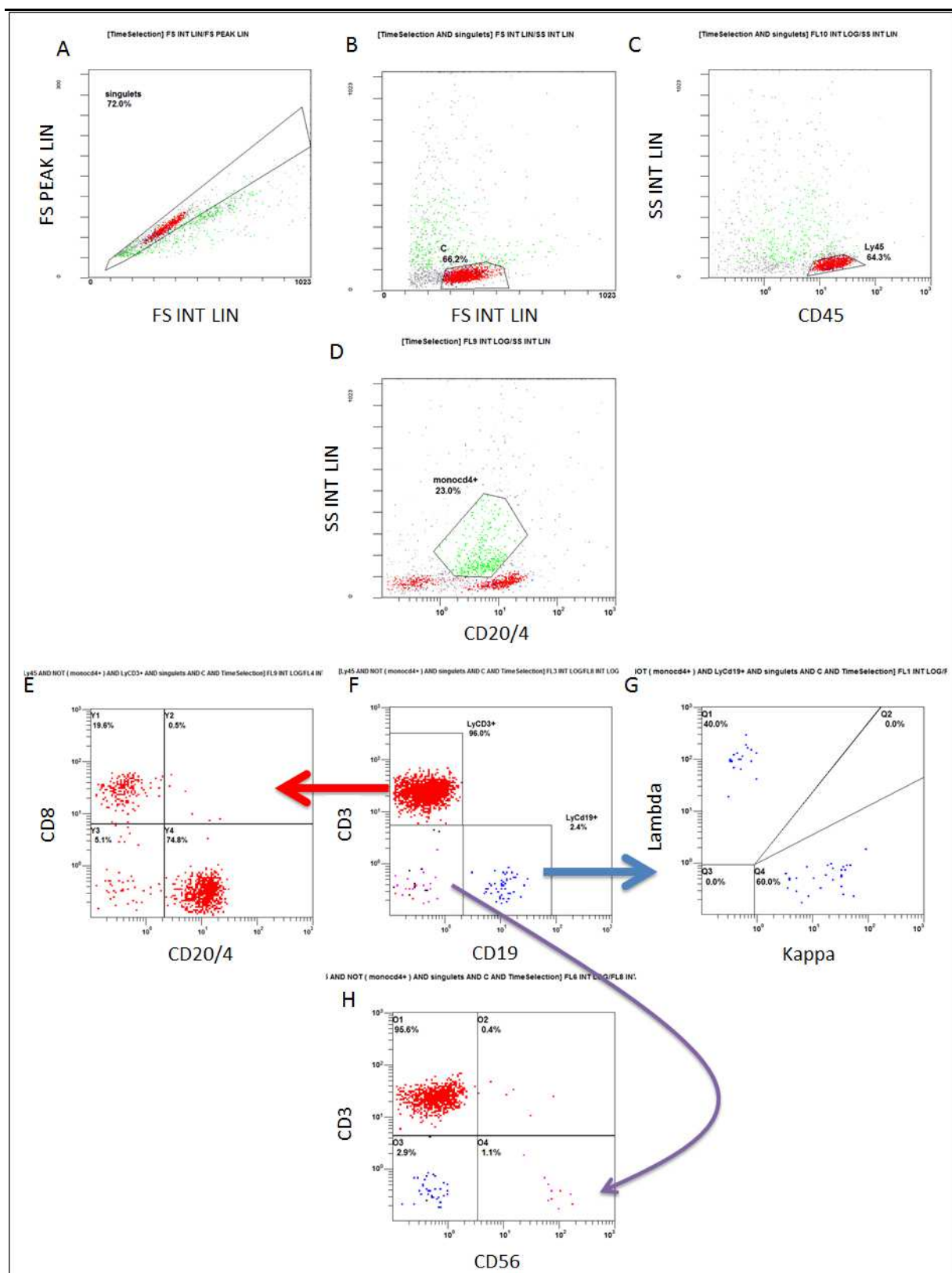


Figure 15 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P91

L'histogramme A permet de conserver uniquement les événements singulets et d'éliminer les doublets se situant à l'extérieur de l'encadré noir. Les événements singulets sont ciblés sur les paramètres « *FS PEAK* » et « *FS INTEGRAL* ».

Les lymphocytes sont fenêtrés sur l'histogramme B « *SS INTEGRAL* » versus le marqueur pan-leucocytaire CD45 et ont pour caractéristiques d'être CD45 fort, FS faible et SS faible. Dans le LCR P91, ils représentent environ 64% des événements singulets soit environ 2100 événements. Plus de 200 événements doivent être fenêtrés sur cet histogramme pour poursuivre l'analyse lymphocytaire.

Après élimination des événements correspondant aux monocytes (1019 événements) (Histogramme D), l'analyse lymphocytaire retrouve sur l'histogramme E :

- 96% de lymphocytes T CD3+ soit 1913 événements : parmi les lymphocytes CD3+, 74,8% (1430 événements) sont des lymphocytes TCD3+CD4+ et 19,6% (374) sont des lymphocytes T CD3+ CD8+.
- 2,4% de lymphocytes B CD19+ soit 50 événements. Il s'agit du minimum d'événements pour effectuer l'analyse des lymphocytes B. 60 % des lymphocytes B sont Kappa et 40% sont Lambda.
- 1,6% de lymphocytes NK CD3-CD19-CD56+ soit 137 événements.

Au total, les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T sans particularités. Le ratio des lymphocytes TCD3+ CD4+/CD8+ est d'environ 4. Absence de monotypie des lymphocytes B.

3.2 Mode opératoire du dosage des cytokines selon les préconisations du fournisseur du kit

3.2.1 Préparation des standards de la gamme d'étalonnage

- 1) Prendre un flacon du standard de cytokines lyophilisées inflammatoires humaines et transférer les sphères dans un tube de 15 mL de polypropylène correspondant au tube « *Top standard* » (TS).
- 2) Reconstituer le standard avec 2 mL de diluant « *Assay Diluent G* » (flacon de 30 mL)
 - a) Laisser le standard se reconstituer 15 minutes à température ambiante.
 - b) Mélanger doucement par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette la solution reconstituée sans vortexer, ni réaliser d'agitation trop vigoureuse.
- 3) Identifier les tubes de la gamme d'étalonnage :

Dilution	Concentration (pg/mL)
<i>Top standard</i>	5000
1:2	2500
1:4	1250
1:8	625
1:16	312,5
1:32	156
1:64	80
1:128	40
1:256	20

Tableau 4 : Les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage selon les préconisations fournisseur

- 4) Mettre 300 µL d'*Assay Diluent G* dans chaque tube.
- 5) Réaliser une dilution en série
 - a) Transférer 300 µL du top standard au tube de dilution 1:2 et mélanger soigneusement à la pipette. Ne pas de vortexer les solutions.
 - b) Continuer les dilutions en série en transférant 300 µL du tube 1:2 au tube 1:4 et ainsi de suite jusqu'au tube 1:256. Bien homogénéiser à chaque étape à l'aide de la pipette.
- 6) Préparer un tube contenant uniquement de l'*Assay Diluent G* comme blanc réactif (0 pg/mL).

3.2.2 Préparation du mélange des billes de capture des cytokines humaines inflammatoires

- 1) Vortexer vigoureusement chaque flacon de billes de capture pendant 3 à 5 secondes avant de prélever. Les billes ont tendance à sédimenter dans le fond du flacon.
- 2) Préparer une suspension de billes de capture à raison de 10 µL de chaque flacon de billes anti-cytokines pour chacun des tubes à tester.
- 3) Vortexer vigoureusement le mélange de billes.

3.2.3 Préparation des échantillons des patients

Nous avons travaillé sur des échantillons conservés à -80°C. La décongélation des échantillons s'est effectuée à température ambiante.

3.2.4 Préparation des tubes standards et des tubes patients à acquérir au cytomètre

- 1) Vortexer le mélange de billes avant chaque ajout de 50 µL du mélange dans chacun des tubes à essais.
- 2) Ajouter 50 µL de chaque point de la gamme d'étalonnage dans les tubes standards et 50 µL du LCR à tester dans les tubes échantillons.

N° tube	Concentration (pg/mL)	Dilution du standard
1	0	Std 1
2	20	Std 2
3	40	Std 3
4	80	Std 4
5	156	Std 5
6	312,5	Std 6
7	625	Std 7
8	1250	Std 8
9	2500	Std 9
10	5000	Std 10
Echantillon 1	?	/
Echantillon 2	?	/
Echantillon 3	?	/

Tableau 5 : Correspondance entre numéro du standard (Std) et concentration de la gamme d'étalonnage.

- 3) Ajouter 50 µL du mélange d'anticorps anti-cytokines inflammatoires humaines marqués à la phycoérythrine dans la totalité des tubes standards et des tubes échantillons.
- 4) Incuber les tubes 3 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.
- 5) A la fin de l'incubation, ajouter 1 mL de *Wash Buffer* ou solution de lavage dans chaque tube à essais et centrifuger à 200G pendant 5 minutes.
- 6) Aspirer et éliminer avec précaution le surnageant de chaque tube.
- 7) Ajouter 300 µL de *Wash Buffer* à chaque tube à essais pour resuspendre le culot de centrifugation.
- 8) Passer rapidement les tubes au cytomètre en les ayant vortexés au préalable.

3.3 Adaptation du mode opératoire au LCR

3.3.1 *Adaptation de la concentration des standards de la gamme d'étalonnage*

Le kit cytokines inflammatoires humaines est validé pour le dosage de cytokines dans les surnageants de cultures cellulaires, le plasma et le sérum. Dans ces différents milieux, la concentration en cytokines est plus élevée que dans le liquide céphalo-rachidien. Pour cette raison, nous avons adapté la gamme d'étalonnage afin d'avoir une meilleure sensibilité pour la détection des basses concentrations.

Numéro du standard	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09
Concentration du standard (pg/mL)	0	2,5	5	10	19,53	39,06	78,12	156,25	312,5
Prise d'essai (µL)	0	200 (S03)	200 (S04)	40 (solution S')	200 (S06)	200 (S07)	200 (S08)	200 (S09)	100 (TS)
Assay Diluent G (µL)	200	200	200	960	200	200	200	200	1500

Tableau 6 : Nouvelle gamme d'étalonnage

Pour préparer la solution S' à 250 pg/mL: diluer la solution mère (TS) au 1/20^{ème} : mettre 50µL de TS dans 950µL d'Assay Diluent G.

L'étendue de la gamme d'étalonnage passe donc de l'intervalle 0-5000 pg/mL à l'intervalle 0-156 pg/mL.

3.3.2 Adaptation du mode d'incubation : un temps versus deux temps avec ou sans agitation

L'incubation en un temps impose que la cytokine soit reconnue à la fois par l'anticorps anti-cytokine de la bille correspondante et par l'anticorps de détection marqué par la phycoérythrine. Ces deux types d'anticorps ne se fixant pas sur le même épitope, le phénomène de compétition ne se produit pas. Cependant, d'autres kits de dosage du même fournisseur préconisent une incubation en deux temps qui se décompose ainsi :

- 1^{ère} incubation d'une heure : les cytokines présentent dans l'échantillon se fixent sur les billes de capture.
- 2^{ème} incubation de deux heures : ajout de l'anticorps de détection marqué à la PE qui se fixe sur les complexes bille-cytokine formés lors de la 1^{ère} incubation.

L'agitation augmente la probabilité de rencontre entre la cytokine à doser et la bille de capture. En effet, les billes de capture constituent le support solide de la réaction et sédimentent au fond du tube en l'absence d'agitation.

Les tubes sont disposés sur un portoir placé sur l'agitateur de plaques. L'agitation se déroule pendant 5 minutes à 500 vibrations par minute avant chacun des temps d'incubation, soit :

- Immédiatement après la mise en présence du mélange de billes avec le standard ou l'échantillon à doser : la première incubation peut démarrer ;
- Immédiatement après la mise en présence de l'anticorps de détection marqué PE avec les complexes bille-cytokine formés lors de la 1^{ère} incubation : la seconde incubation débute à son tour.

3.4 Adaptation de la méthode de dosage au cytomètre Navios™

La notice d'instruction du kit indique les réglages à effectuer lors de l'utilisation du kit sur un cytomètre BD™ de type FACSCanto. Or, les cytomètres BD™ et Navios™ diffèrent sur plusieurs propriétés : leur banc optique, les filtres, la sensibilité des photomultiplicateurs et la numérisation du signal analogique. Ces différences nous ont amené à adapter les voltages du cytomètre Navios afin d'optimiser l'enregistrement du signal.

III Résultats

1 Adaptation du kit cytokines inflammatoires humaine (BD®) au cytomètre Navios™ et réglages de la sensibilité du cytomètre

1.1 Mode opératoire pour la modification des gains et des volts (V)

1.1.1 *Première étape : ajustement de la fenêtre P1 aux billes de standardisation*

Le passage des billes de standardisation sur le cytomètre permet de déterminer une fenêtre appelée P1 sur un histogramme biparamétrique représentant la structure des billes (SS) en fonction de leur taille (FS). Le réglage des voltages pour les paramètres FS et SS est fait de manière à amener les billes de capture anti-cytokines dans la fenêtre P1.

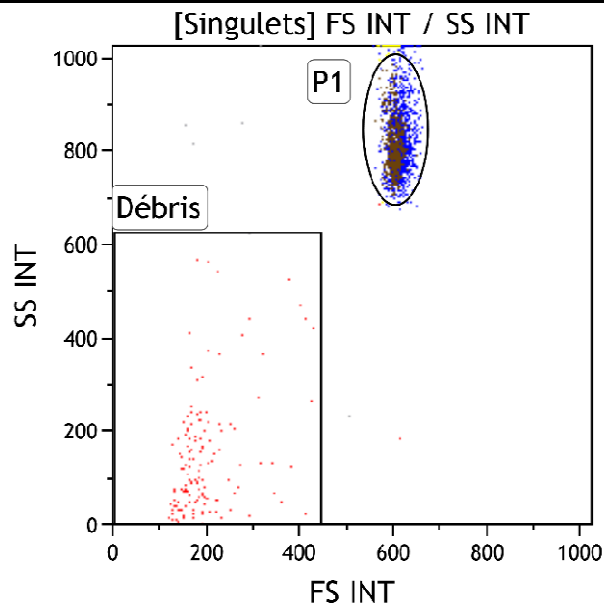


Figure 16 : Histogramme biparamétrique représentant la structure versus la taille des billes de standardisation

Les valeurs retenues pour les voltages des paramètres FS et SS sont de 154V et de 120V respectivement.

1.1.2 *Deuxième étape : réglage des voltages du canal FL6*

La séparation des six populations de billes de capture s'effectue en fonction de l'intensité de fluorescence mesurée dans le canal FL6. En effet, le fluorochrome qui marque les billes, est excité par le laser rouge à 633 nm et émet sa fluorescence à 675 nm.

Un tube contenant 5 μ L de chaque type de billes recouvertes d'anticorps humains anti-IL-8, anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti IL-10, anti-TNF et anti-IL-12p70 et 500 μ L de solution de lavage est passé au cytomètre en flux. Les billes se séparent de la façon suivante, selon leur intensité de fluorescence, du moins brillant (IL-12p70) au plus brillant (IL-8).

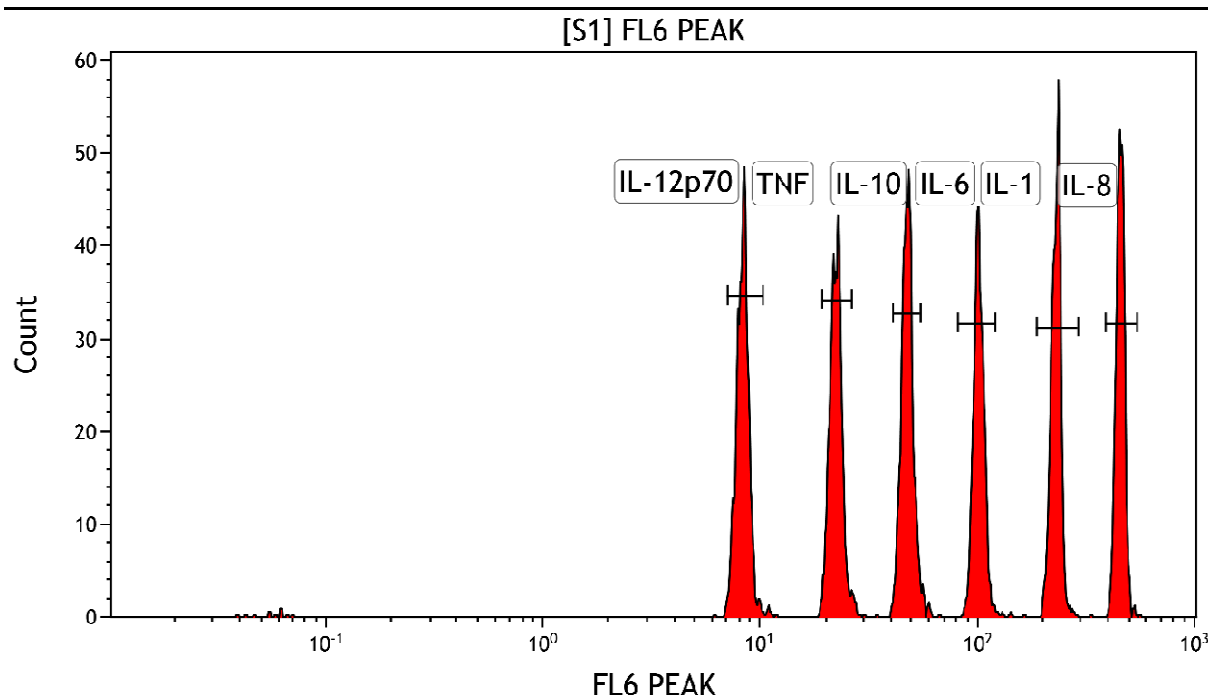


Figure 17 : Visualisation de la séparation des six populations de billes dans le canal FL6

Le réglage du voltage du canal FL6 est effectué en augmentant la valeur du voltage de manière à amener la population la plus brillante en dernière décade de ce canal. La valeur retenue du voltage pour le canal FL6 est de 303 volts (V).

1.1.3 Troisième étape : réglage des voltages du canal FL2

Les réglages des voltages du canal FL2 sont réalisés à partir de tubes passés en mode de vitesse faible, dit « *low* », pour être au maximum à 40 évènements acquis par seconde. Pour chaque population de bille, environ 500 évènements au minimum sont à acquérir.

- 1) Le point de concentration de la gamme à 156,25 pg/mL est passé de cette façon au cytomètre et le voltage est réglé de manière à amener le signal en FL2 au milieu de la dernière décade (10^2 à 10^3).

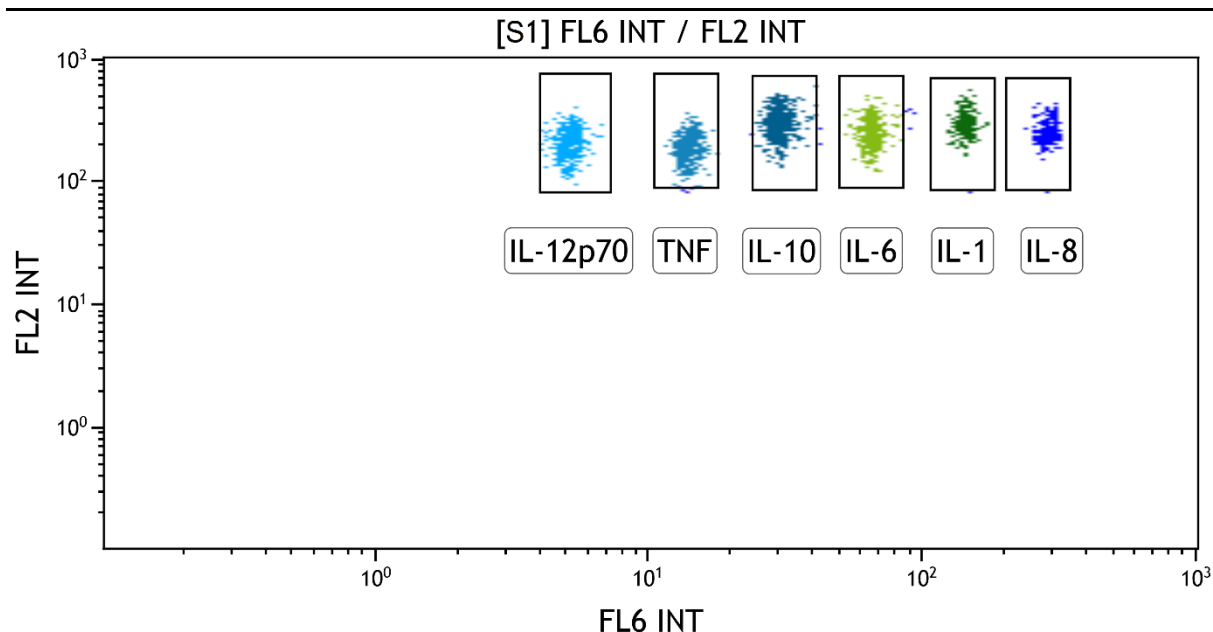


Figure 18 : Histogramme biparamétrique FL2 versus FL6 pour le point de gamme à 156,25 pg/mL

2) Le point de la gamme à 5 pg/mL est mesuré avec les mêmes réglages. Les complexes billes-cytokines marquées par la phycoérythrine à cette concentration ont une fluorescence située au milieu de l'avant-dernière décade (10^1 à 10^2).

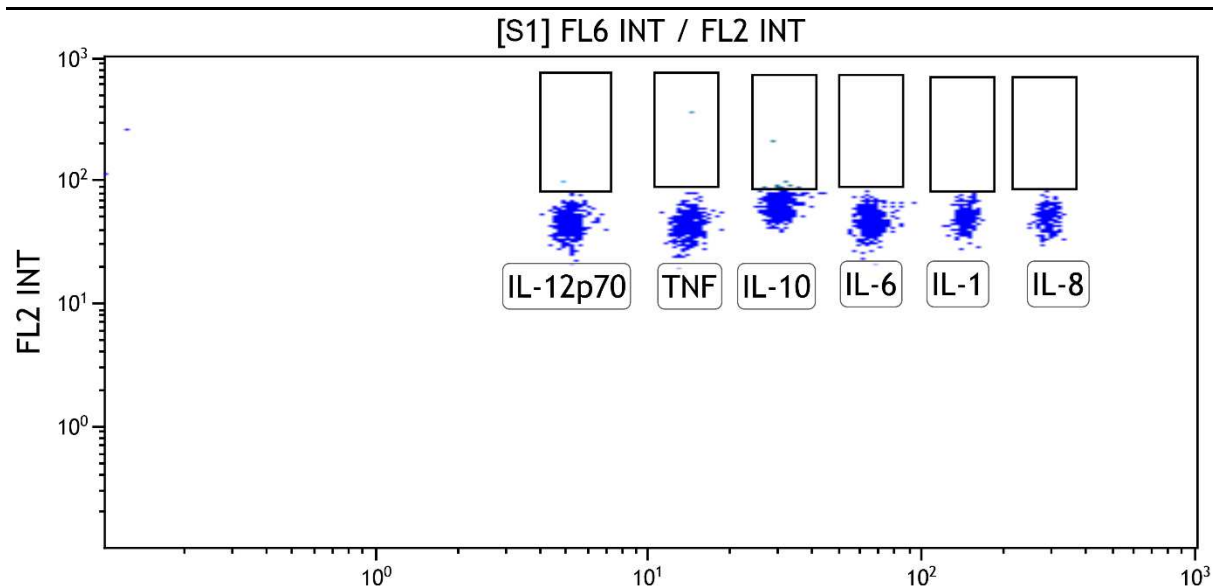


Figure 19 : Histogramme biparamétrique FL2 versus FL6 pour le point de gamme à 5 pg/mL.

La valeur retenue du voltage pour le canal FL2 est de 666V. La moyenne de fluorescence du point de gamme à 156,25 pg/mL est d'environ 200 et celle du point de gamme à 5 pg/mL est d'environ 45 pour toutes les cytokines.

- 3) Une fois ces réglages réalisés, les billes de standardisation sont passées à nouveau au cytomètre. Elles se composent de deux populations de billes différentes ayant la même taille et la même structure (P1). Elles se séparent au niveau du canal FL6 par leur niveau d'intensité de la même manière que les billes de capture. Une des deux populations de billes a une fluorescence importante alors que la deuxième population fluoresce faiblement. Ces deux intensités de fluorescence correspondent aux extrémités de la plage utilisée dans le canal FL6 pour classer les six populations de billes de capture anti-cytokines. Celles-ci seront présentes dans les tubes des standards et les tubes des échantillons à tester.
- 4) Un contrôle positif PE est ajouté aux billes de standardisation. Ce tube est passé au cytomètre avec les paramètres du dernier réglage afin de définir des fenêtres très précises R1 et R2 (Figure 20).

Ces fenêtrages sont utilisés comme cibles pour vérifier la stabilité du cytomètre.

En effet, les billes de standardisation marquées par le contrôle positif PE sont passées avant chaque expérience et devront tomber dans ces fenêtres R1 et R2. Ensuite, les tubes des standards de la gamme d'étalonnage et les échantillons patients peuvent être passés au cytomètre.

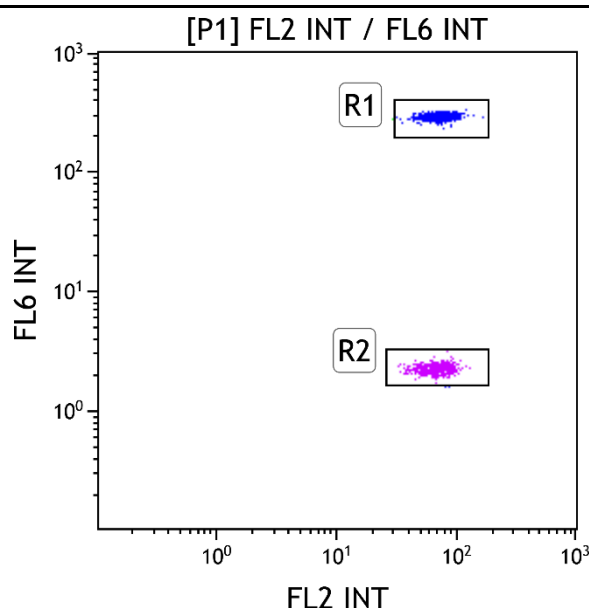


Figure 20 : Détection en FL2 des billes de standardisation marquées par la phycoérythrine et utilisées comme contrôle positif.

Les réglages retenus sont synthétisés dans le tableau suivant :

Cytometer Control

Acquisition Setup | Compensation

Settings

Blue

Red

Violet

Details

☐ Setup Model

Dots: 1000

☐ QuickCOMP

☐ QuickSET

☐ Baseline Offset

Parameters

	Label	Discr.	Volts	Gain
FS	FS	100	154	5.0
SS	SS	OFF	120	5.0
FL1	FL1	OFF	418	1.0
FL2	FL2	OFF	666	1.0
FL3	FL3	OFF	250	1.0
FL4	FL4	OFF	250	1.0
FL5	FL5	OFF	250	1.0
FL6	FL6	OFF	303	1.0
FL7	FL7	OFF	250	1.0
FL8	FL8	OFF	250	1.0
FL9	FL9	OFF	250	1.0
FL10	FL10	OFF	250	1.0

Limits

Acquisition Time: 500

Elapsed Time: 500

Maximum Events: 100000

Live Gate: Ungated

Max Acquirable Events: 1,500,000

Set Times

Figure 21 : Gains et voltages du protocole utilisé pour la méthode Cytometric Bead Array (CBA)

1.2 Impact de l'adaptation des voltages sur la capacité du cytomètre à résoudre les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage

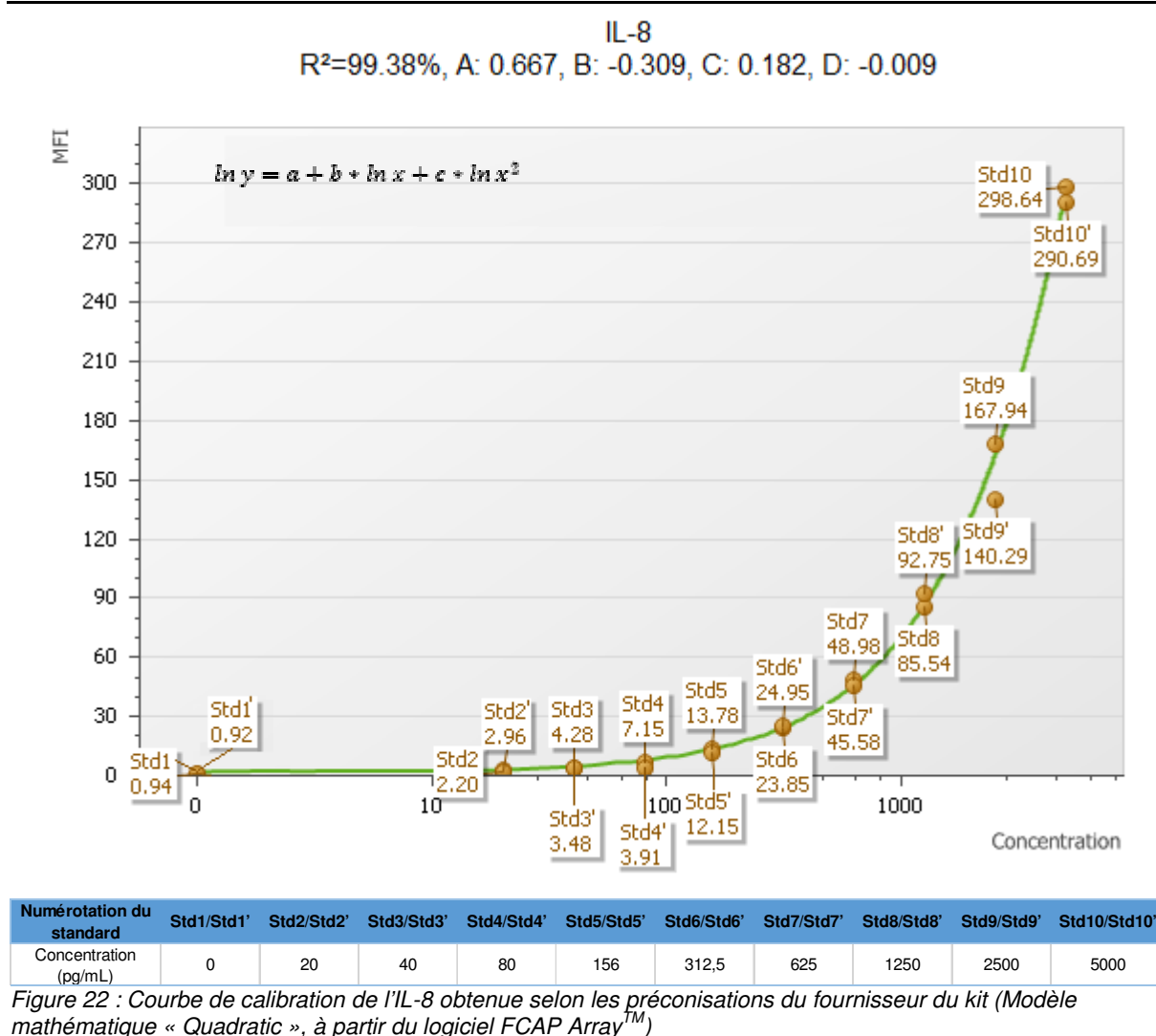
Lors du passage d'un tube (standard ou échantillon) au cytomètre en flux, les événements acquis sont enregistrés dans un fichier et peuvent être réanalysés dans le logiciel KaluzaTM sous forme d'histogrammes mono- ou bi-paramétriques.

La société BD® propose un logiciel d'analyse des fichiers générés lors de l'acquisition des différents tubes ainsi que des valeurs cibles adaptées aux instruments de la marque. Ce logiciel FCAP ArrayTM offre la possibilité de tracer la courbe de calibration de la gamme d'étalonnage pour chaque cytokine selon différents modèles mathématiques. Il permet également l'extrapolation en concentration des résultats à partir des moyennes de l'intensité de fluorescence (MFI) obtenues pour chaque cytokine dans chacun des échantillons.

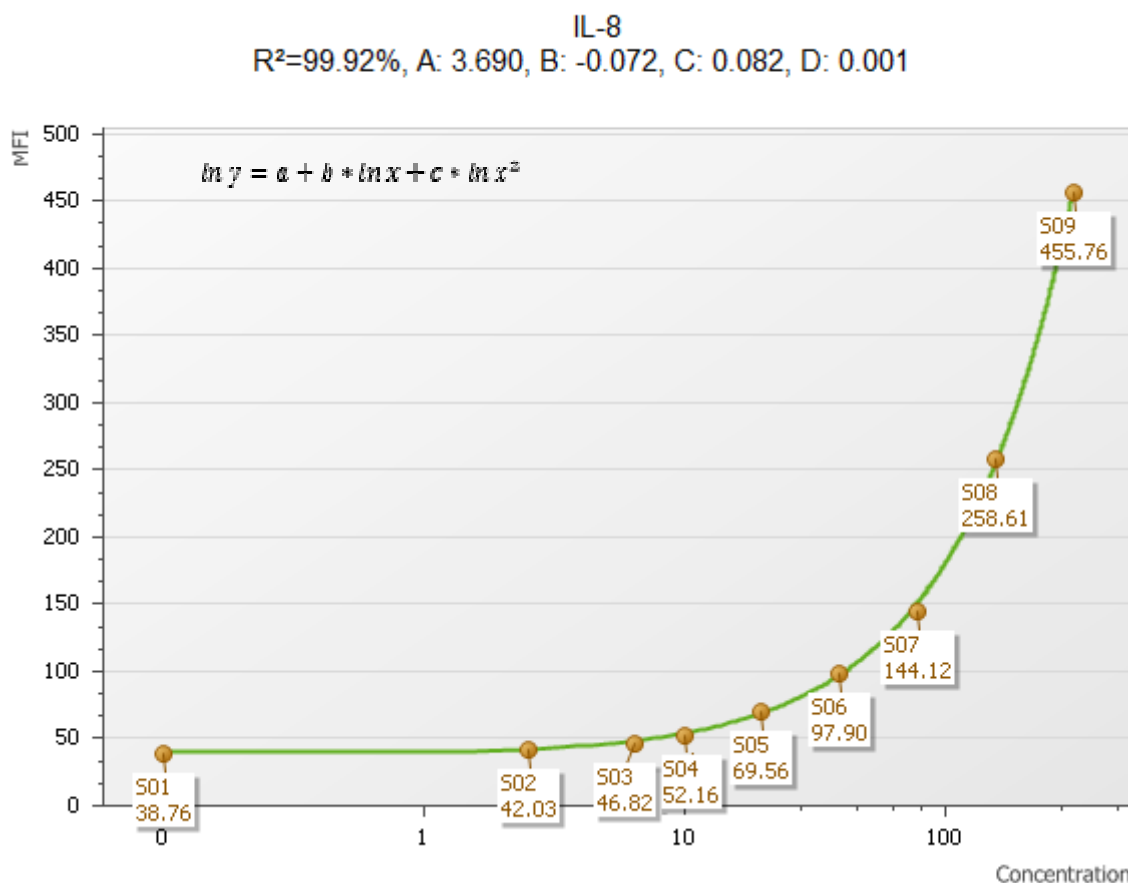
Nous comparons, à travers l'exemple de l'IL-8, l'allure de la courbe de calibration de la gamme d'étalonnage obtenue avec les réglages proposés par BD® et celle obtenue avec nos propres réglages.

Avec les préconisations du fournisseur, la courbe de calibration des standards comprenait 10 points de gamme allant des concentrations 0 pg/mL à 5000 pg/mL.

Chaque point de gamme est passé deux fois (Std et Std'). Le signal en FL2 devient détectable à partir du point de standard 5 soit une concentration de 156 pg/mL en IL-8. En effet, en dessous de cette concentration la valeur des MFI est stable et ne permet donc pas de détecter la présence de cytokines (Figure 22).



Après modification des voltages, nous avons retracé une courbe pour des concentrations plus faibles. Désormais, les concentrations de la nouvelle gamme d'étalonnage s'étendent de 0 pg/mL à 312,5 pg/mL. Nous observons pour la concentration à 0 pg/mL en IL-8, une valeur de MFI à 38,76 qui correspond à la valeur du bruit de fond. Le seuil de quantification se situe à la concentration de 5 pg/mL pour l'IL-8. A cette concentration, la MFI est mesurée à 46,82. Cette valeur est distincte de celle du bruit de fond. La modification des concentrations de la gamme d'étalonnage permet d'améliorer la capacité de détection de l'analyse pour les faibles concentrations.



Numéro du standard	S01	S02	S03	S04	S05	S06	S07	S08	S09
Concentration du standard (pg/mL)	0	2,5	5	10	19,53	39,06	78,12	156,25	312,5

Figure 23 : Courbe de calibration de l'IL-8 selon les modifications apportées aux voltages des canaux (Modèle mathématique « Quadratic», à partir du logiciel FCAP Array™)

2 Optimisation des conditions opératoires pour la formation des complexes billes de capture-cytokine reconnus par l'anticorps de détection marqué à la phycoérythrine (PE) : étude de l'influence du mode d'incubation et de l'agitation

Nous avons comparé l'incubation en un temps avec ou sans agitation à l'incubation en deux temps avec ou sans agitation. Les résultats montrent une augmentation de la valeur de la MFI mesurée pour toutes les cytokines du kit à l'exception du TNF lors de l'incubation en deux temps avec agitation (Figure 24).

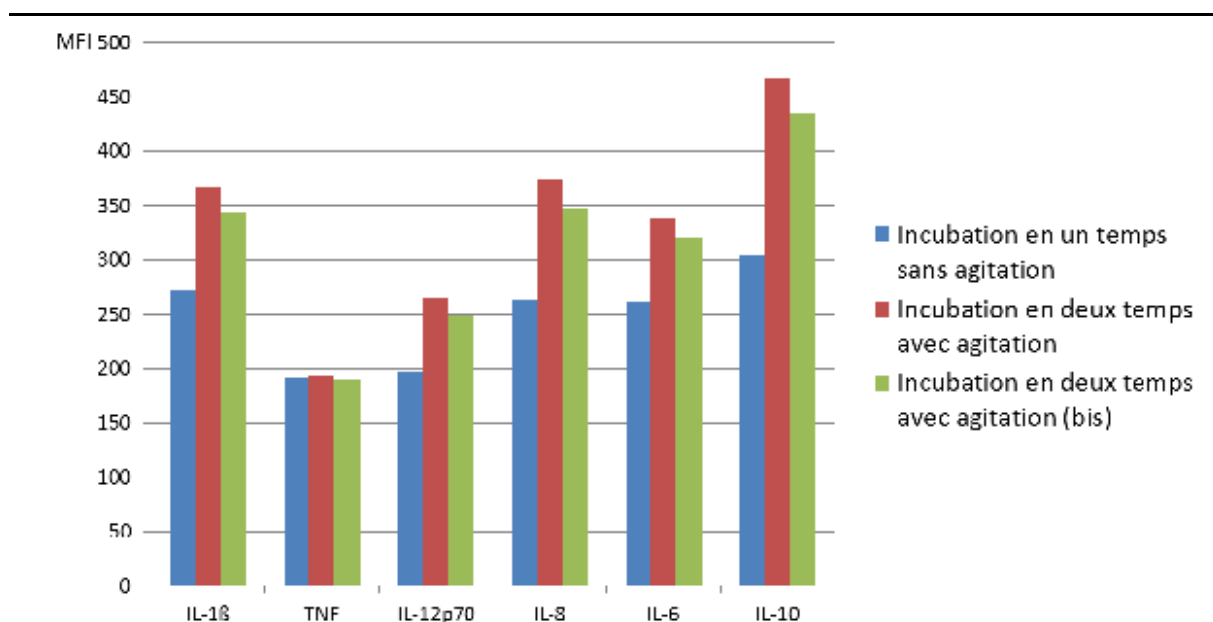


Figure 24 : Comparaison des moyennes de fluorescence (MFI) obtenues pour le standard 8 à la concentration de 156,25 pg/mL en fonction du mode d'incubation et de l'agitation

Pour le standard 8 à la concentration de 156,25 pg/mL, la valeur de la MFI augmente en moyenne de 30% selon la cytokine. Le gain le plus important est mesuré pour l'IL-10.

Standard 8 (156,25pg/mL)	Incubation en un temps sans agitation	Incubation en deux temps avec agitation	Incubation en deux temps avec agitation (bis)	Gain (%)
IL-1 β	272,95	367,27	344,86	30,45
TNF	192,19	193,93	190,47	0,01
IL-12p70	197,45	265,68	249,47	30,45
IL-8	263,3	373,94	347,98	37,09
IL-6	260,95	338,71	320,92	26,39
IL-10	304,06	468,23	435,72	48,65

Tableau 7 : Evaluation du gain obtenu sur la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) dans le cas d'une incubation en deux temps avec agitation

Nous avons également vérifié l'absence de modification du bruit de fond en présence de l'agitation afin de s'assurer que l'augmentation de la valeur de MFI correspond à un signal spécifique relié à la concentration en cytokines.

Standard 1 (0 pg/mL)	Incubation en un temps sans agitation	Incubation en deux temps avec agitation
IL-1 β	32,09	29,33
TNF	26,81	25,63
IL-12p70	29,33	28,04
IL-8	31,52	31,80
IL-6	27,54	26,33
IL-10	40,55	39,82

Tableau 8 : Comparaison des MFI obtenues pour le standard 1 en fonction du mode d'incubation et de l'agitation

La stabilité du bruit de fond et l'augmentation des valeurs de MFI permettent de retenir l'incubation en deux temps avec agitation pour l'expérimentation des échantillons de patients.

Les courbes de calibration obtenues pour chaque cytokine avec l'incubation en deux temps avec agitation sont présentées ci-dessous (Figure 25).

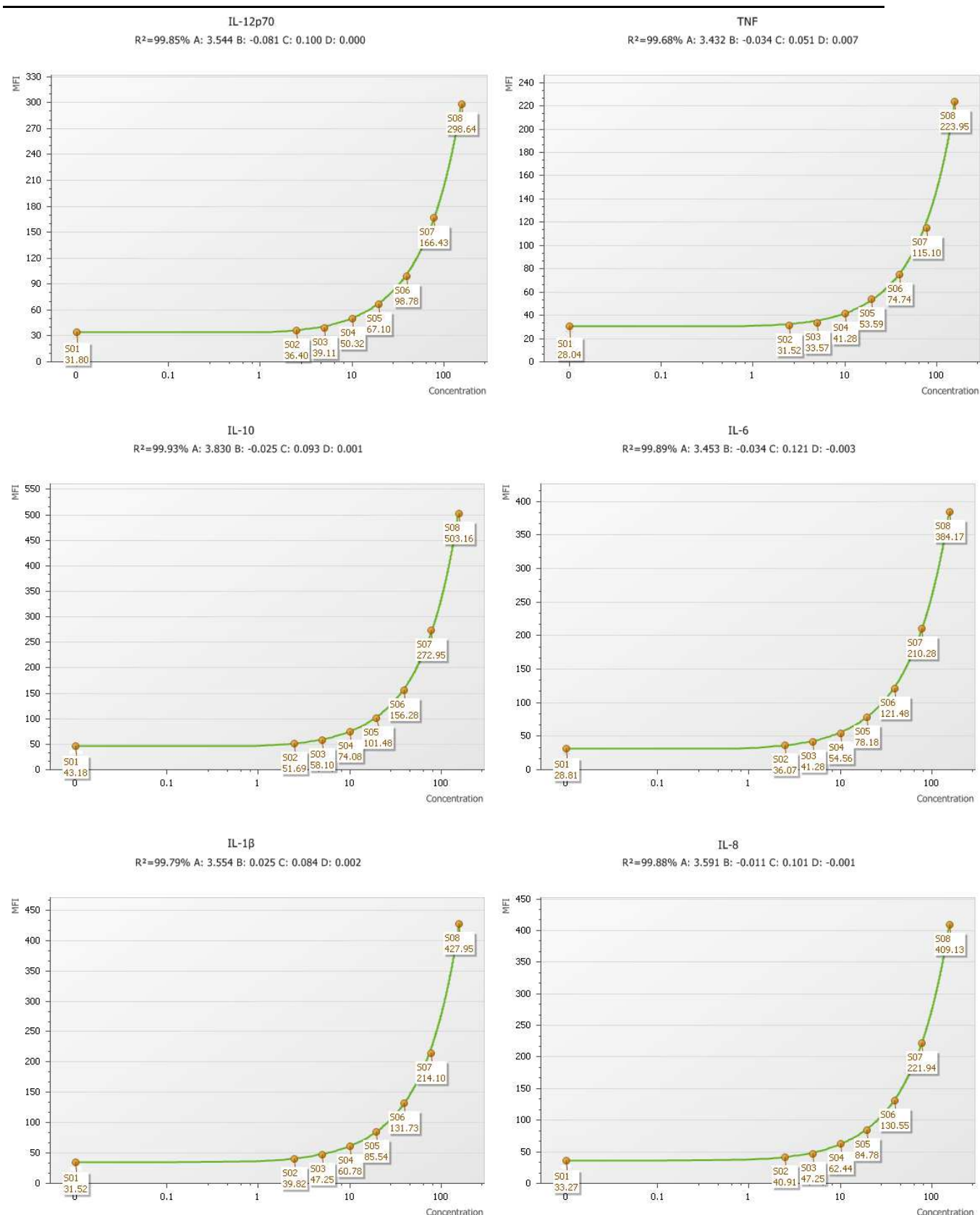


Figure 25 : Courbes de calibration de la nouvelle gamme d'étalonnage obtenues avec l'incubation en deux temps avec agitation. Equation de la courbe : $\ln y = a + b * \ln x + c * \ln x^2$ (Modèle mathématique « Quadratic », à partir du logiciel FCAP Array™)

3 Etude de reproductibilité et de la répétabilité

3.1 Reproductibilité inter-kit de la gamme d'étalonnage

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'ouverture d'un kit. Nous avons réalisé deux gammes d'étalonnage correspondant aux deux kits nécessaires à l'expérimentation des échantillons patients. La superposition des courbes montre la reproductibilité des MFI mesurées pour l'IL-8 d'un kit à l'autre (Figure 26). Nous utiliserons donc la moyenne des deux valeurs de MFI de chaque standard afin de déterminer la valeur du bruit de fond correspondant au standard 1 (0 pg/mL) et la valeur du seuil de quantification correspondant au standard 3 (5 pg/mL). Les valeurs de MFI de chaque point de la gamme d'étalonnage des deux expériences et pour les six cytokines sont présentées en [Annexe I](#).

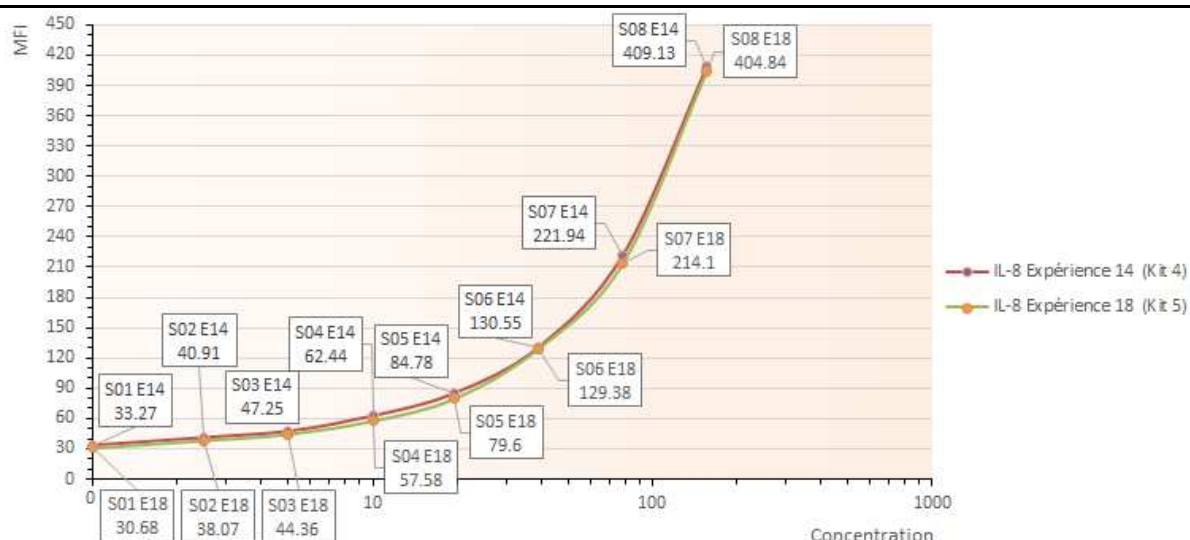


Figure 26 : Représentation des moyennes de l'intensité de fluorescence (MFI) obtenues pour l'IL-8 pour les deux gammes d'étalonnage de chaque kit

3.2 Répétabilité et reproductibilité des moyennes de l'intensité de fluorescence mesurées dans les échantillons patients

3.2.1 *Echantillons de patients au sein d'une même expérience*

Les échantillons de trois patients ont été testés en double, dit « *duplicate* », dans la même expérience. Pour les six cytokines, la valeur de la MFI mesurée est répétable ([Annexe II 2.1](#)).

La figure montre la répétabilité des valeurs de MFI mesurées pour l'IL-10. Il est donc décidé de réaliser un seul tube à analyser par échantillon patient. Au sein d'une expérience, jusqu'à huit échantillons peuvent être testés.

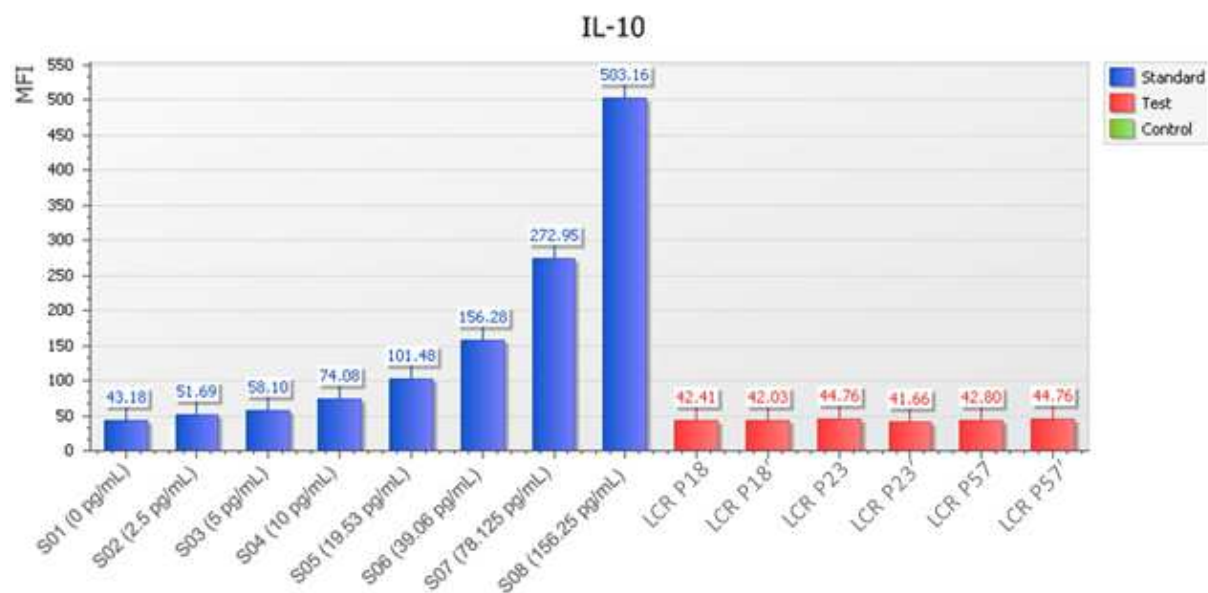


Figure 27 : Répétabilité des MFI mesurées pour l'IL-10 pour trois échantillons de patients testés en double, à partir du logiciel FCAP Array™

3.2.2 Echantillon d'un patient dans deux expériences distinctes

Le LCR d'un même patient a été testé lors de deux expériences différentes. Nous avons utilisé deux aliquots congelés provenant de la même ponction lombaire. Une MFI semblable a été retrouvée pour toutes les cytokines ([Annexe II 2.2](#)).

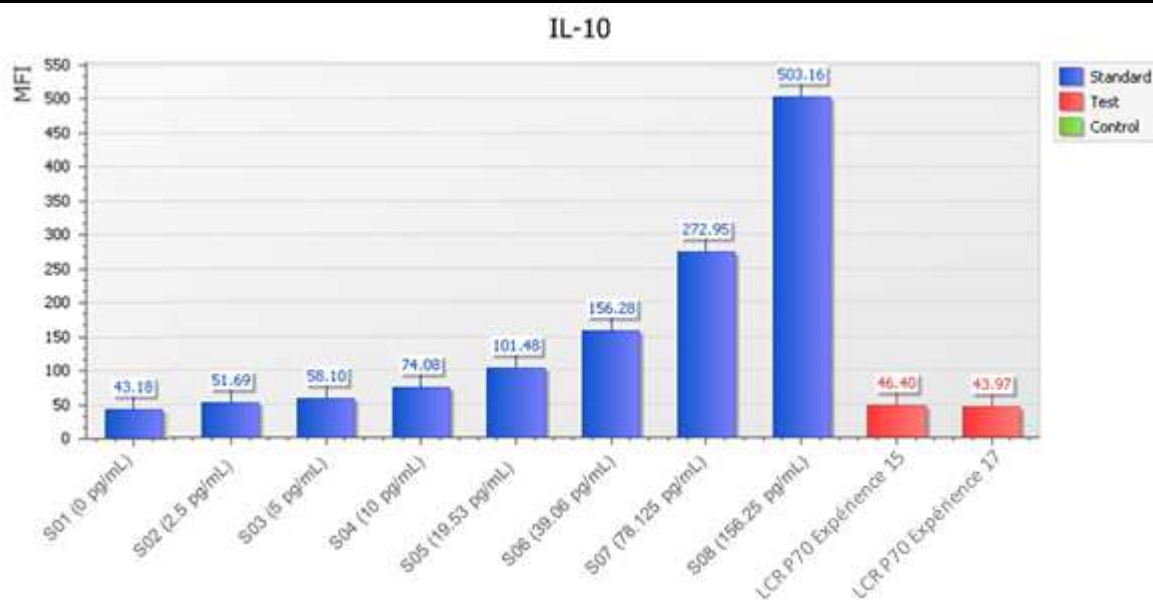


Figure 28 : Reproductibilité des MFI mesurées pour les six cytokines dans le LCR P70 dans deux expériences différentes, à partir du logiciel FCAP Array™

3.3 Vérification de la capacité de détection en cytokine à l'aide d'un standard externe

L'IL-6 lyophilisée à la concentration de 20 µg a été diluée dans le réactif du kit (*Assay Diluent G*) afin d'obtenir une concentration du même ordre de grandeur que celui de la gamme d'étalonnage. La préparation de la solution mère et les dilutions successives sont détaillées en [Annexe III](#). Nous présentons dans la figure suivante les MFI obtenues pour des concentrations théoriques en IL-6 de 100 pg/mL et de 10 pg/mL.

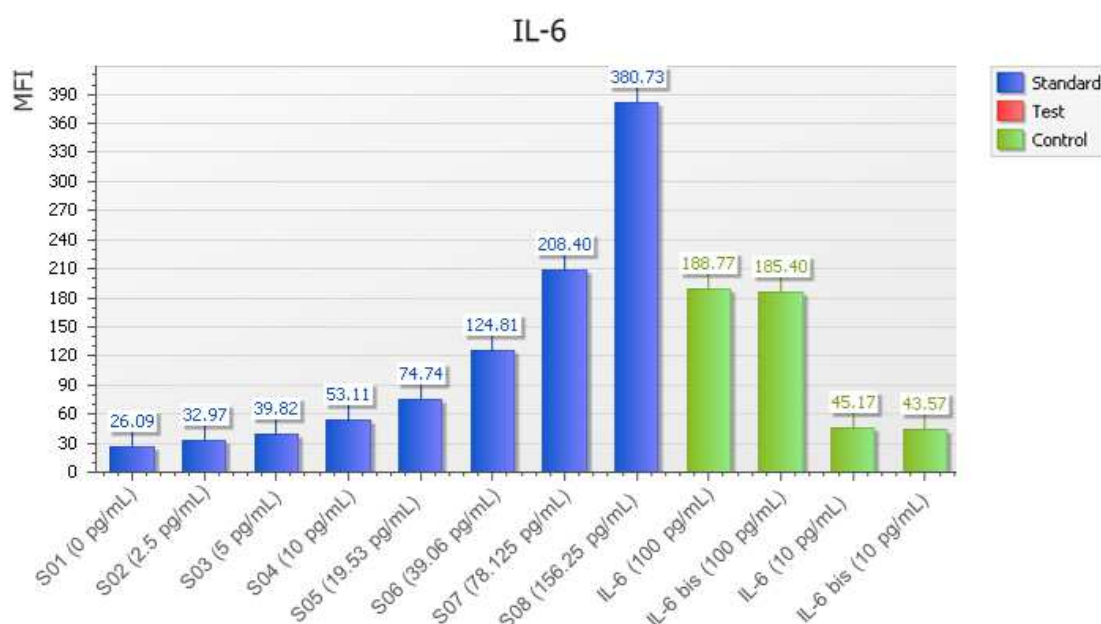


Figure 29 : Représentation des MFI obtenues pour des concentrations théoriques en IL-6 de 100 pg/mL et de 10 pg/mL

La correspondance entre la MFI et la concentration en pg/mL est présentée dans la figure 30. Les concentrations extrapolées à partir de la courbe d'étalonnage ont des valeurs inférieures aux concentrations théoriques (68 pg/mL mesuré versus 100 pg/mL attendu).

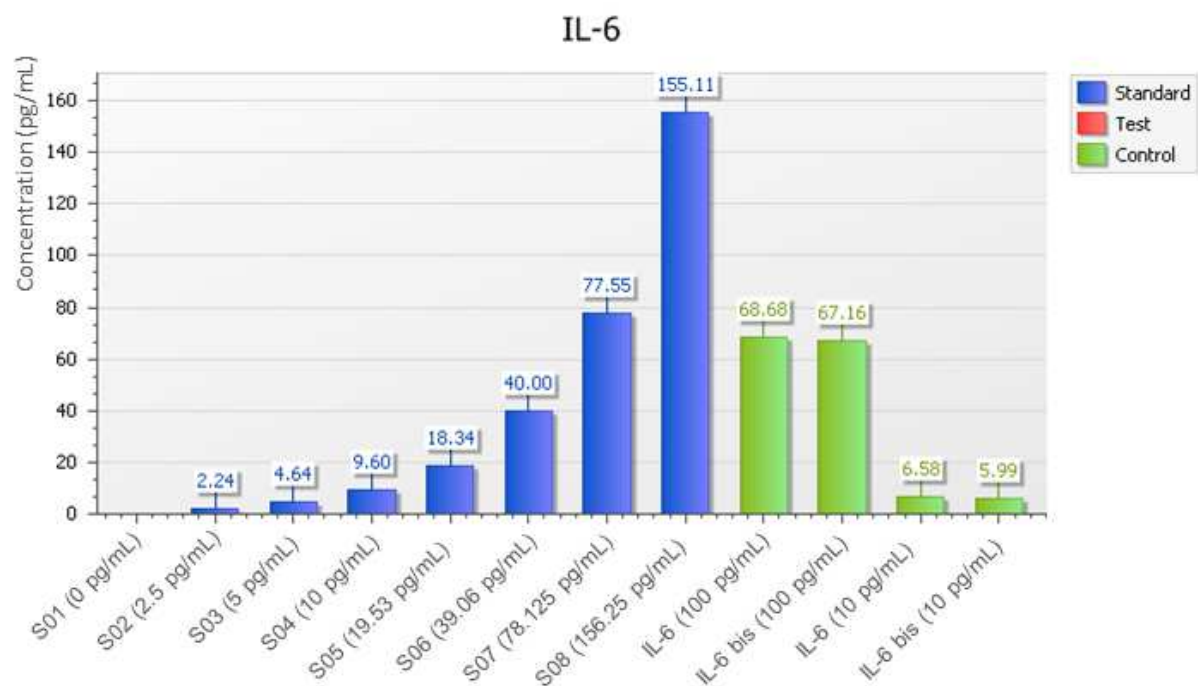


Figure 30 : Correspondance entre la moyenne de fluorescence (MFI) mesurée en IL-6 et la concentration en pg/mL après extrapolation sur la gamme d'étalonnage

4 Résultats des profils cellulaire et cytokinique des LCR des patients étudiés

4.1 Résultats de la recherche de cellules lymphomateuses ou blastiques par immunophénotypages cellulaires réalisés en cytométrie en flux sur le LCR

Un immunomarquage a été effectué sur les 56 prélèvements :

Plus de 200 lymphocytes, identifiés sur les critères CD45 fort, SS faible et FS faible, ont pu être analysés dans 42 prélèvements donnant les résultats suivants :

- Négatifs pour 28 prélèvements : absence de monotypie observée sur les lymphocytes B, absence de lymphocytes B ou absence de blastes;
- Positifs pour 14 prélèvements dont les résultats sont exposés ci-dessous (Tableau 9).

Pour 14 prélèvements, moins de 200 lymphocytes ont pu être analysés. Il n'a pas pu être mis en évidence de population monotypique sur ces prélèvements qui ont, de ce fait, été considérés comme négatifs. Les données cliniques et des résultats biologiques pour l'ensemble des patients sont synthétisés dans l'[Annexe VI](#) du document.

Numéro du prélèvement	Groupe	Répartition des populations lymphocytaires du LCR (%)			Lymphocytes B		Conclusion de la cytométrie en flux du LCR	Contamination sanguine	Evaluation de la contamination sanguine
		Lymphocytes T	Lymphocytes NK	Lymphocytes B	Chaînes légères Kappa	Lambda			
P76	LNH	76	15	9	2	98 (forte intensité)	Présence d'une population lymphoïde B monotypique lambda représentant environ 9% des lymphocytes du LCR.	Non	Glycophorine A
P99	LNH	38	2	60	2	98 (intensité modérée)	Présence d'une population lymphoïde B monotypique lambda représentant 60% des lymphocytes du LCR.	Non	Glycophorine A Immunophénotypage sur sang
P47	LNH	97	2	0,9	100	0	Présence d'une très faible population de lymphocytes B monotypiques kappa représentant 0,9% des lymphocytes du LCR.	Non	Glycophorine A Immunophénotypage sur sang
P70	LNH	78	1	17	80	20	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant environ 10% des lymphocytes du LCR.	Non	Immunophénotypage sur sang
P38bis	LPSNC	92	2	6	86	12	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant environ 4% des lymphocytes du LCR.	Non	Immunophénotypage sur sang
P74	Maladie de Waldenström	25	5	70	100 (forte intensité)	0	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant 70% des lymphocytes du LCR.	Non	Glycophorine A Immunophénotypage sur sang
P104	Maladie de Waldenström	59	3	35	99 (forte intensité)	1	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant 35% des lymphocytes du LCR.	Non	Immunophénotypage sur sang
P104bis	Maladie de Waldenström	88	3	8	100	0	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant environ 8% des lymphocytes du LCR.	Non	Glycophorine A Immunophénotypage sur sang
P105	Maladie de Waldenström	34	5	61	99 (faible intensité)	1	Présence d'une population lymphoïde B mature monotypique kappa représentant environ 60% des lymphocytes du LCR	Non	Glycophorine A Immunophénotypage sur sang
B	Maladie de Waldenström	71	4	20	70	0	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant environ 20% des lymphocytes du LCR.	Non	Immunophénotypage sur sang
D	Maladie de Waldenström	81	8	11	98	2	Présence d'une population lymphocytaire B monotypique kappa représentant environ 10% des lymphocytes du LCR.	Non	Immunophénotypage sur sang
E	Maladie de Waldenström	52	3	45	90	10	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant environ 40 % des lymphocytes du LCR	Non évaluée	/
P51	Autres pathologies hématologiques	6	1	93	98	2	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa (Score de Matutes = 5) représentant environ 90% des lymphocytes du LCR.	Oui	Immunophénotypage sur sang

Numéro du prélèvement	Groupe	Recherche de blastes dans le LCR dans un contexte de leucémie aiguë myéloïde				Conclusion de la cytométrie en flux du LCR	Contamination sanguine	Evaluation de la contamination sanguine
		Blastes (%)	Marqueurs de la lignée T (%)	Marqueurs de la lignée B (%)	Marqueurs de la lignée myéloïde			
P24	Autres pathologies hématologiques	68	CD3 : 0, CD7 : 0, CD4 : 60 (faible intensité)	CD10 : 0, CD19 : 5	CD33 : 40, CD13 : 99, CD117 : 96, MPO (Ag) : 41%	Les blastes présentent un immunophénotype myéloïde : CD34+, CD117+, CD13+, CD33+ partiel et MPO+, avec expression de marqueurs monocytaires CD36+, CD4+ faible. Aspect compatible avec des blastes myéloïdes.	Non évaluée	/

Tableau 9 : Résultats des immunophénotypes cellulaires positifs avec les pourcentages des différentes populations cellulaires identifiées dans le LCR

4.1.1 Exemples d'immunophénotypages cellulaires du LCR de trois patients

4.1.1.1 Patiente atteinte d'un lymphome diffus à grandes cellules B de phénotype GC avec suspicion de rechute neuro-méningée

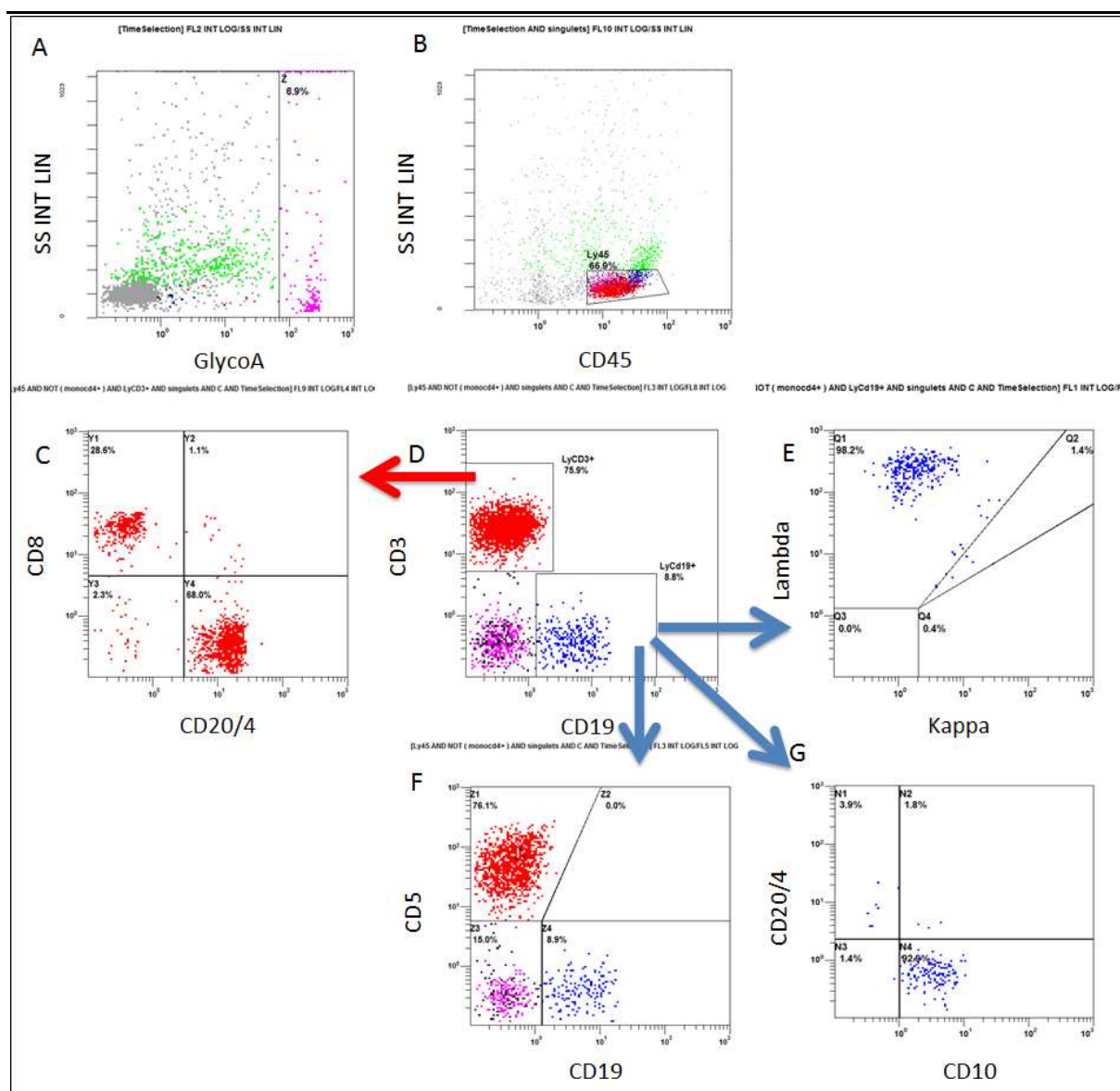


Figure 31 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P76

L'histogramme biparamétrique A représente la structure des événements versus le marquage des cellules par la glycophorine A. Il permet d'évaluer la contamination par les hématies du LCR. Cette contamination peut survenir au cours d'une ponction traumatique et influencer sur l'analyse du LCR. Ainsi, il est important de l'évaluer soit par le marquage des cellules du LCR par la glycophorine A, soit par un immunophénotypage sanguin réalisé en parallèle de celui du LCR.

Une contamination sanguine du LCR se traduit par la présence d'un rapport de l'ordre de mille entre les hématies et les leucocytes comme celui observé dans le sang périphérique (Hématies de l'ordre du Téra/L et leucocytes du Giga/L). Ici, la contamination sanguine est exclue car les cellules marquées par la glycophorine A, c'est-à-dire des hématies, sont au nombre de 273 (fenêtre Z) pour un nombre d'évènements totaux de 4950. Les leucocytes analysés ne proviennent donc pas du sang périphérique.

L'histogramme B représente les lymphocytes fenêtrés sur les caractéristiques CD45fort, SS faible et FS faible dont le nombre d'évènements s'élève à 3313.

Sur l'histogramme D, nous observons :

- 76% de lymphocytes T CD3+ (2412 évènements) ;
- 15% de lymphocytes NK CD3-CD19-CD56+ (620 évènements) ;
- 9% de lymphocytes B CD19+ (281 évènements).

Tous les lymphocytes B sont CD5- (Histogramme F), 92% sont CD10+ (Histogramme G) et 98% sont monotypiques Lambda (Histogramme E).

Au total, nous observons une infiltration du LCR par des cellules lymphomateuses CD5-, CD10+ et monotypiques Lambda représentant environ 9% des lymphocytes du LCR.

4.1.1.2 Patient atteint d'un lymphome folliculaire avec suspicion de localisation neuro-méningée

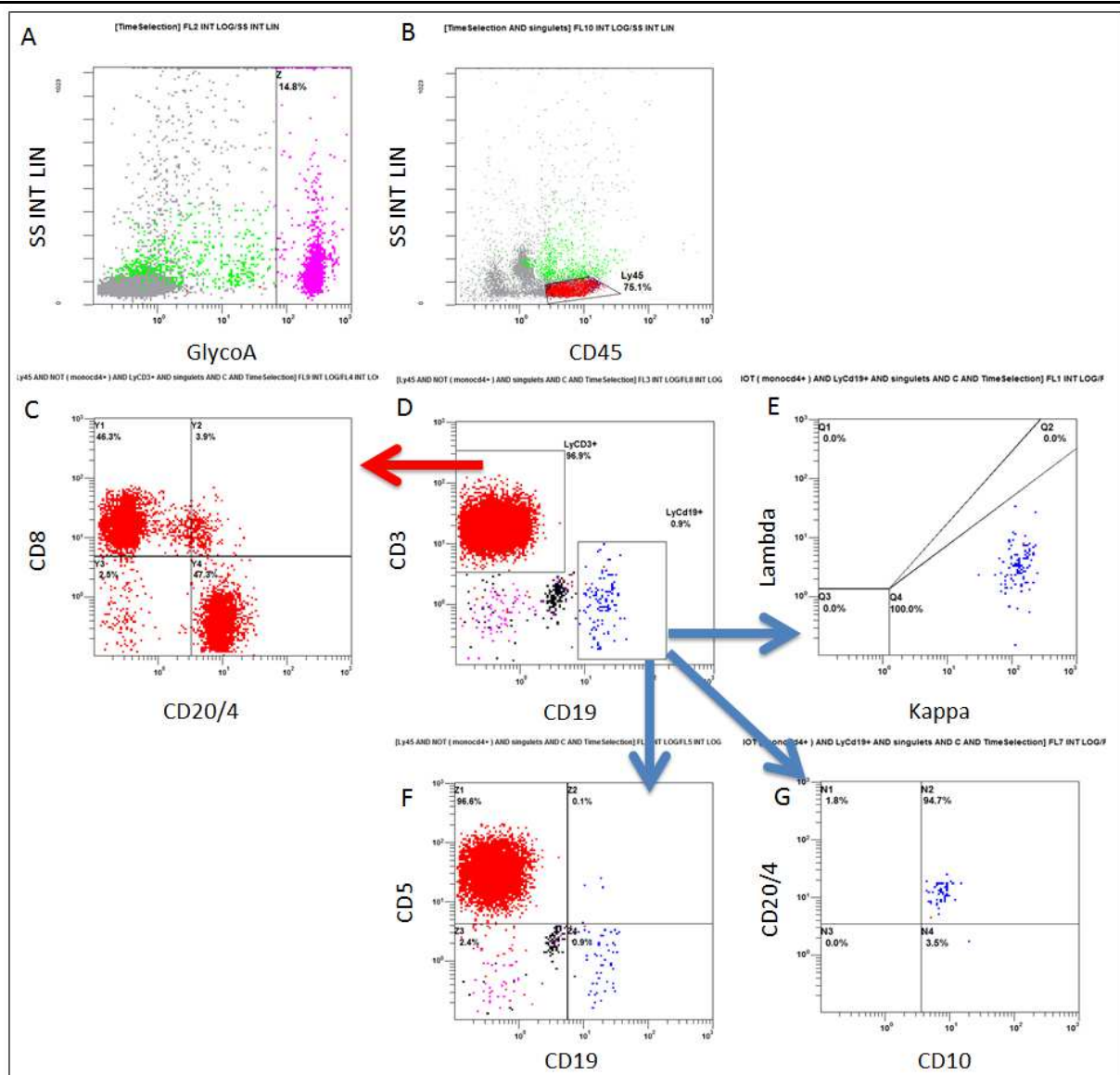


Figure 32 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P47

L'histogramme A montre 2002 évènements ou cellules marqué(e)s par la glycophorine A (fenêtre Z) pour un total d'évènements de 13502. La contamination sanguine du LCR est donc exclue. De plus, l'immunophénotypage réalisé sur le sang retrouve une lymphopénie B profonde.

L'histogramme B représente les lymphocytes dont le nombre d'évènements s'élève à 18298.

Sur l'histogramme D, nous observons :

- 97% de lymphocytes T CD3+ (12430 évènements) ;
- 2% de lymphocytes NK CD3-, CD19-, CD56+ (5758 évènements) ;
- 0,9% de lymphocytes B CD19+ (110 évènements).

97% des lymphocytes B sont CD5- (Histogramme F), 95% sont CD10+ (Histogramme G) et 100% sont monotypiques Kappa (Histogramme E).

Au total, nous observons une infiltration du LCR par des cellules lymphomateuses CD5+, CD10+ et monotypiques Kappa représentant environ 0,9% des lymphocytes du LCR.

4.1.1.3 Patient avec suspicion de lymphome cérébral

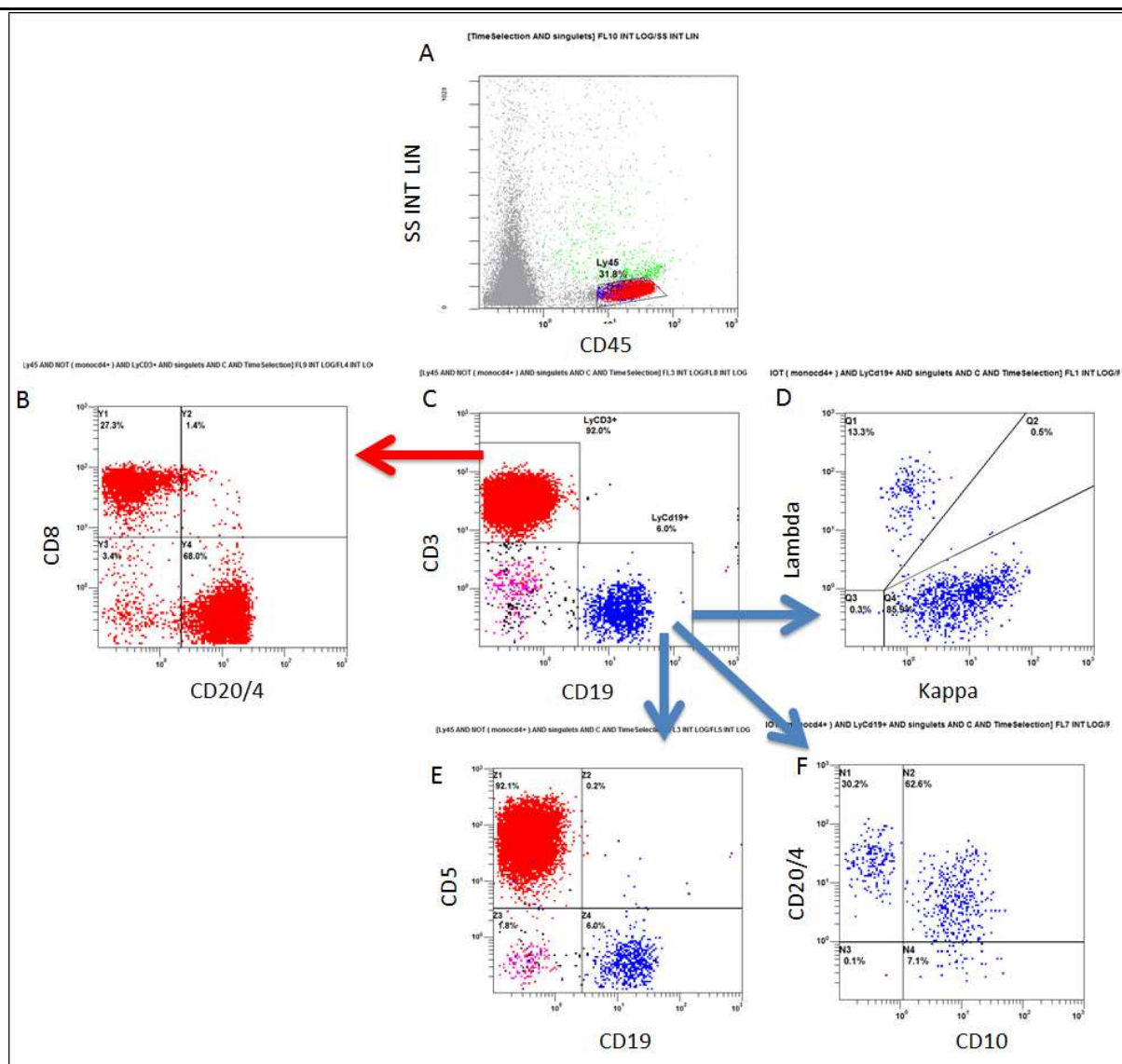


Figure 33 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P38bis

Le tube avec immunomarquage par la glycophorine A n'est pas réalisé.
L'immunophénotypage sanguin retrouve 16% de lymphocytes B normaux (53% Kappa, 47% Lambda) ce qui permet d'exclure une contamination sanguine du LCR.

L'histogramme A représente les lymphocytes dont le nombre d'évènements s'élève à 18460.

Sur l'histogramme C, nous observons :

- 92% de lymphocytes T CD3+ (16742 évènements) ;
- 2% de lymphocytes NK CD3-, CD19-, CD56+ (641 évènements) ;
- 6% de lymphocytes B CD19+ (1077 évènements).

Tous les lymphocytes B sont CD5- (Histogramme E), environ 65% sont CD10+ (Histogramme F) et 85% sont monotypiques Kappa (Histogramme D).

Au total, nous observons une infiltration du LCR par des cellules lymphomateuses CD5+, CD10+ et monotypiques Kappa représentant environ 4% des lymphocytes du LCR.

4.1.1.4 Patient atteint d'une maladie de Waldenström avec suspicion de rechute d'un syndrome de Bing Neel

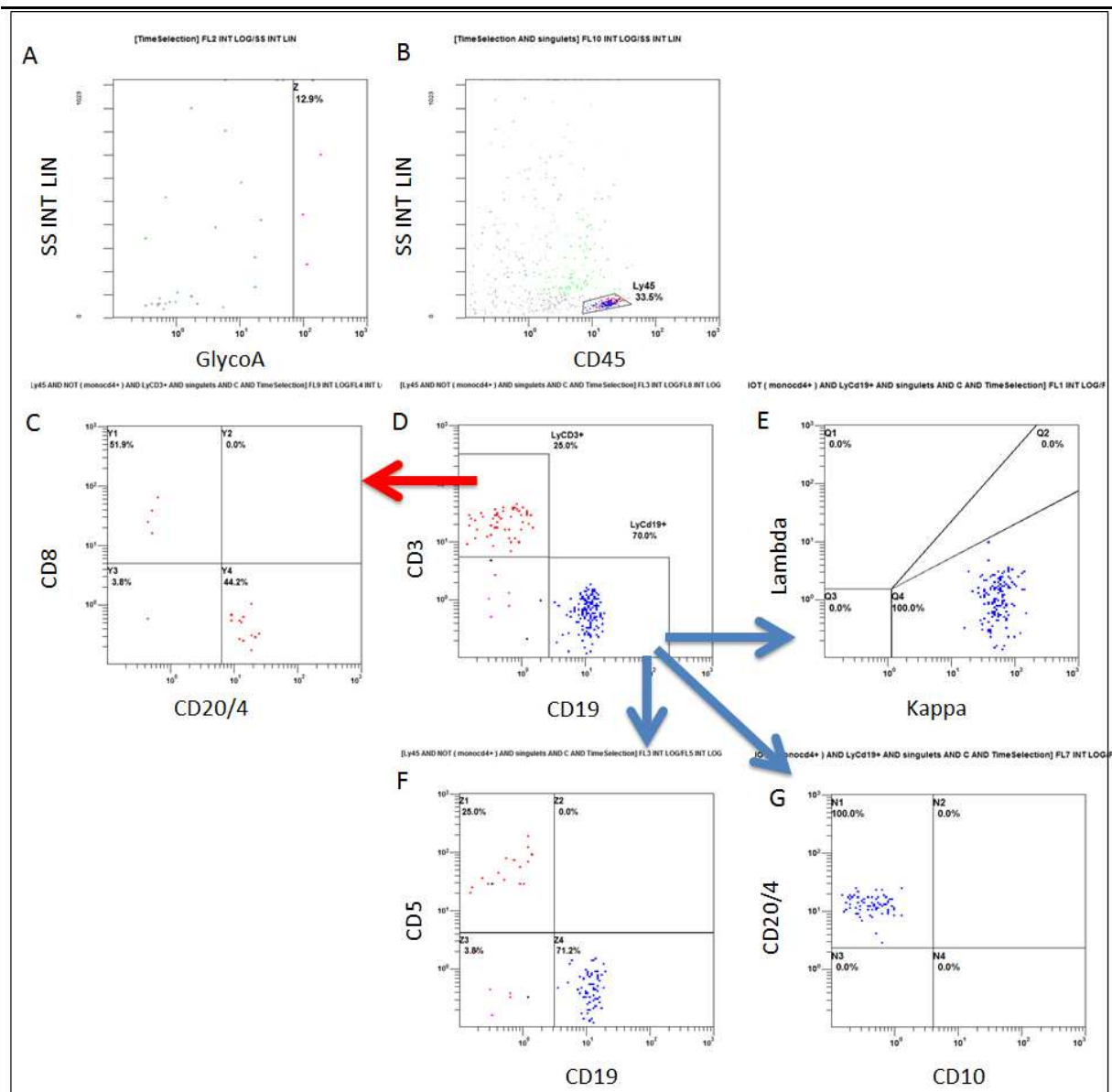


Figure 34 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P74

L'histogramme A montre 4 évènements ou cellules marqué(e)s par la glycophorine A (fenêtre Z) pour un total de 31 évènements. Le faible nombre d'évènements acquis ne permet pas de conclure sur la contamination sanguine du LCR à partir du marquage par la glycophorine A. L'immunophénotypage sanguin retrouve 4% de lymphocytes B normaux (59% Kappa, 41% Lambda) ce qui permet d'exclure la contamination sanguine du LCR.

L'histogramme B représente les lymphocytes dont le nombre d'évènements s'élève à 222.

Sur l'histogramme D, nous observons :

- 25% de lymphocytes T CD3+ (52 évènements) ;
- 5% de lymphocytes NK CD3-, CD19-, CD56+ (22 évènements) ;
- 70% de lymphocytes B CD19+ (148 évènements).

Tous les lymphocytes B sont CD5- (Histogramme F), CD10- (Histogramme G) et monotypiques Kappa (Histogramme E).

Au total, nous observons une infiltration du LCR par des cellules lymphomateuses CD5-, CD10- et monotypiques Kappa représentant environ 70% des lymphocytes du LCR.

4.2 Résultats du profil cytokinique pour chacun des prélèvements

4.2.1 Interleukine-1bêta (IL-1 β)

La valeur de la MFI du bruit de fond méthodologique de l'IL-1 β , correspondant à la moyenne des deux MFI du standard 1 des deux courbes de calibration ([Annexe I](#)), est de 30,29. Le seuil de quantification a été établi à une MFI de 45,61.

Les valeurs de MFI mesurées pour l'IL-1 β sont similaires pour tous les prélèvements avec une médiane de 31,52. La valeur minimale est de 29,07. Un seul prélèvement présente un taux élevé d'IL-1 β dont la moyenne de fluorescence (MFI) est de 87,88. Il s'agit du LCR n°28 (P28). Une sclérose en plaques rémittente récurrente a été diagnostiquée en 1998 chez cette patiente.

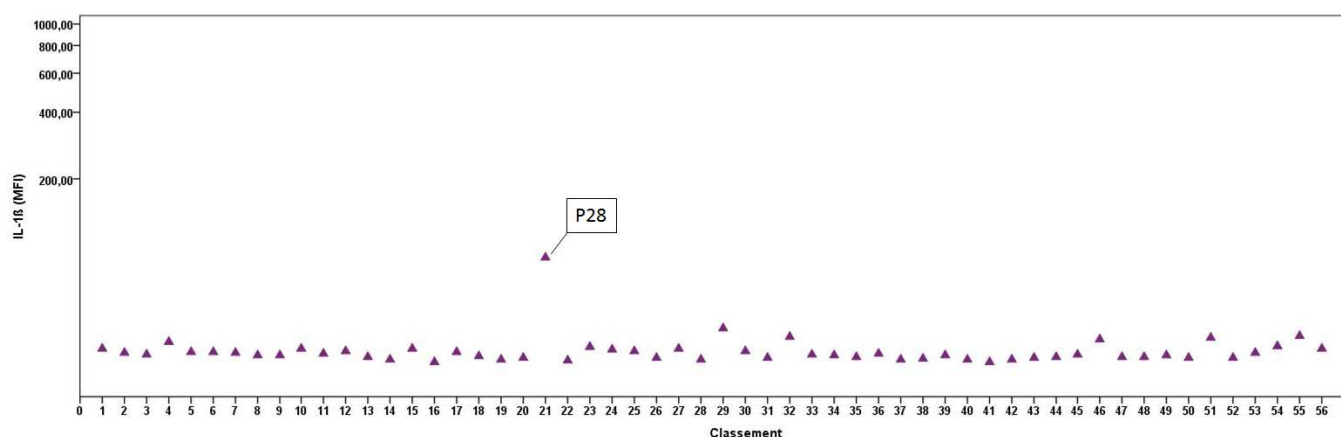


Figure 35 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) obtenues pour l'IL-1 β dans tous les prélèvements étudiés

4.2.2 Tumor Necrosis Factor ou facteur de nécrose tumorale (TNF)

La valeur de la MFI du bruit de fond méthodologique du TNF est de 26,83 et celle du seuil de quantification a été établie à 33,42. Pour l'ensemble des prélèvements, la médiane des valeurs de MFI du TNF est de 26,69 avec un minimum à 24,95 et un maximum à 40,91. Une valeur supérieure au seuil de quantification est détectée dans le LCR n°105 (P105) pour lequel la MFI est de 40,91. La patiente consulte pour des myoclonies diffuses atteignant les quatre membres dans un contexte de maladie de Waldenström diagnostiquée en 2009.

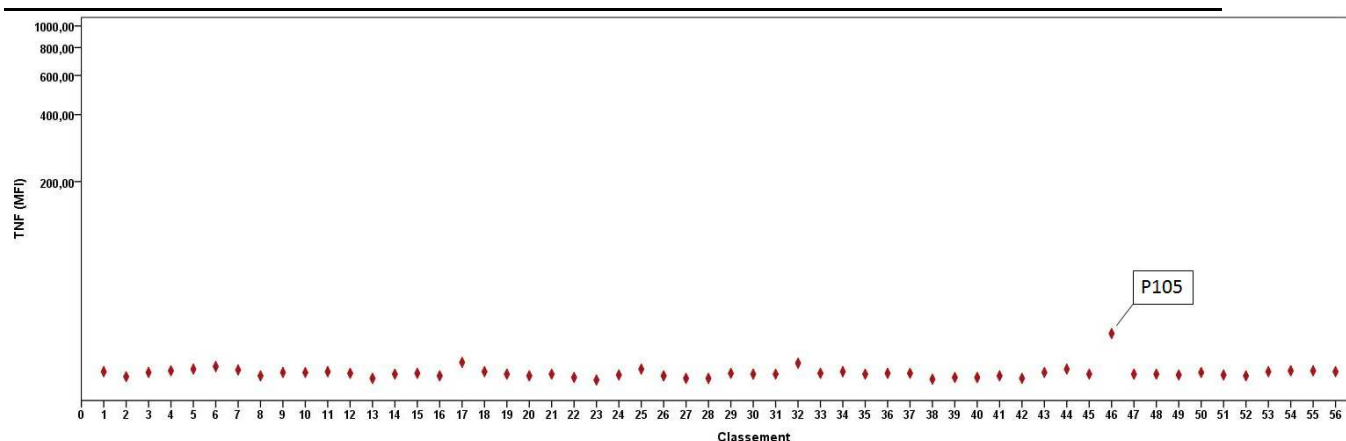


Figure 36 : Représentation des MFI obtenues pour le TNF dans tous les prélèvements étudiés

4.2.3 Interleukine-12p70 (IL-12p70)

La MFI du bruit de fond méthodologique pour l'IL-12p70 est de 29,54 et celle du seuil de quantification est de 38,42. La médiane des valeurs de MFI de l'IL-12p70 pour tous les prélèvements est de 29,46 avec une valeur minimale de 27,29 et une valeur maximale de 33,27. Aucun des prélèvements ne contient d'interleukine 12p70.

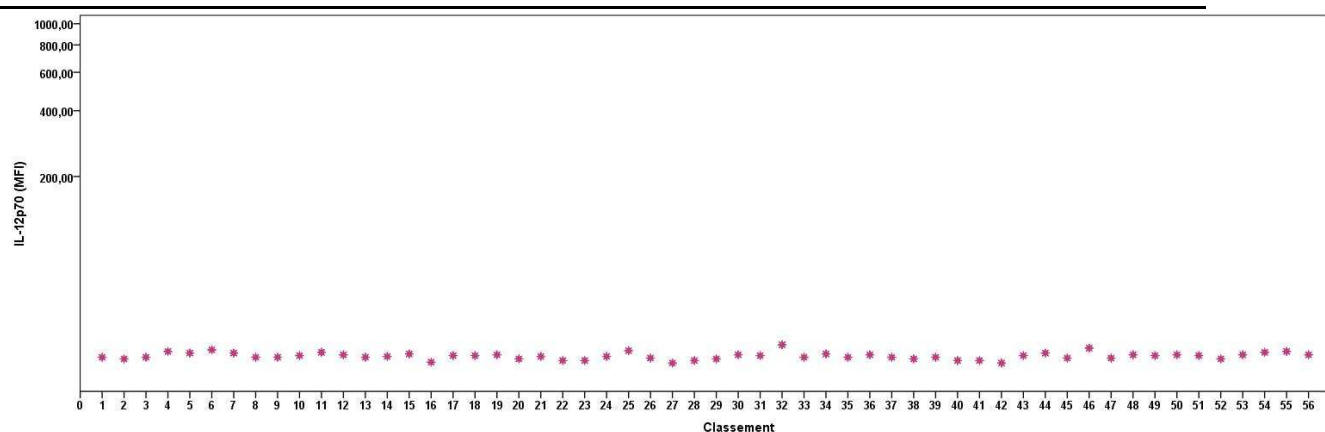


Figure 37 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-12p70 dans tous les prélèvements étudiés

4.2.4 Interleukine-8 (IL-8)

La MFI du bruit de fond méthodologique de l'IL-8 est de 31,97 et celle du seuil de quantification de 45,80. La valeur minimale de la MFI en IL-8 est de 55,05 et la valeur maximale est de 1005,74. Cette valeur maximale correspond à la valeur haute maximale mesurable avec les réglages effectués. La médiane des valeurs de MFI de l'IL-8 est de 275,96. Tous les prélèvements contiennent de l'IL-8.

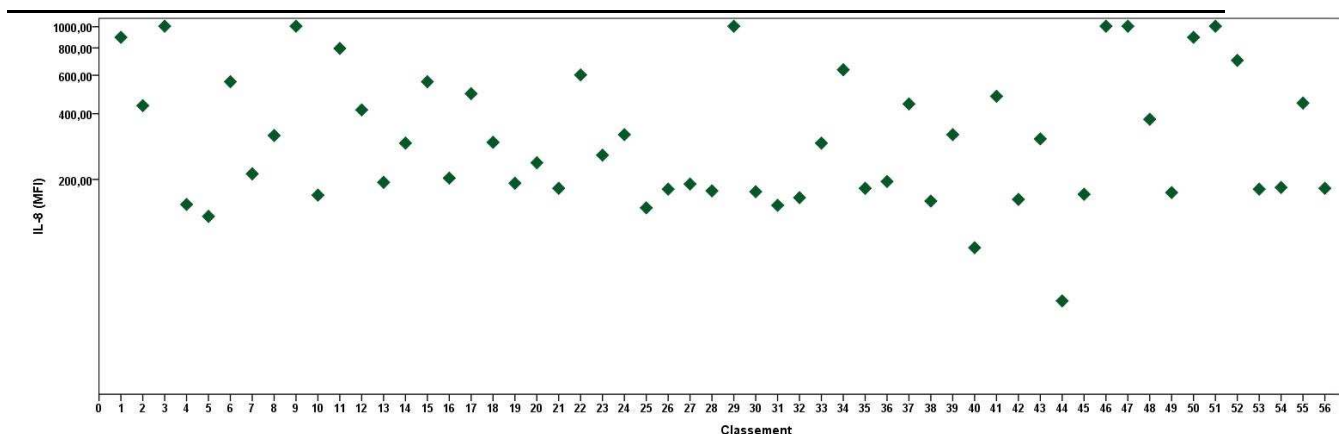


Figure 38 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-8 dans tous les prélèvements étudiés

4.2.5 Interleukine-6 (IL-6)

La MFI du bruit de fond méthodologique de l'IL-6 est de 27,45 et celle du seuil de quantification est de 40,55. La valeur minimale de la MFI en IL-6 est de 30,68 et la valeur maximale est de 1005,74. La médiane des valeurs de MFI de l'IL-6 est de 53,59. 35 prélèvements contiennent de l'IL-6 (MFI supérieure à 40,55). Parmi eux, 14 prélèvements proviennent de patients atteints de troubles neurologiques divers et de maladies neuro-inflammatoires, 9 de patients ayant un lymphome non hodgkinien, 5 de patients avec une maladie de Waldenström, 3 de patients atteints d'un lymphome primitif du SNC, 2 de patients ayant un cancer solide et 2 de patients issus du groupe autres pathologies hématologiques.

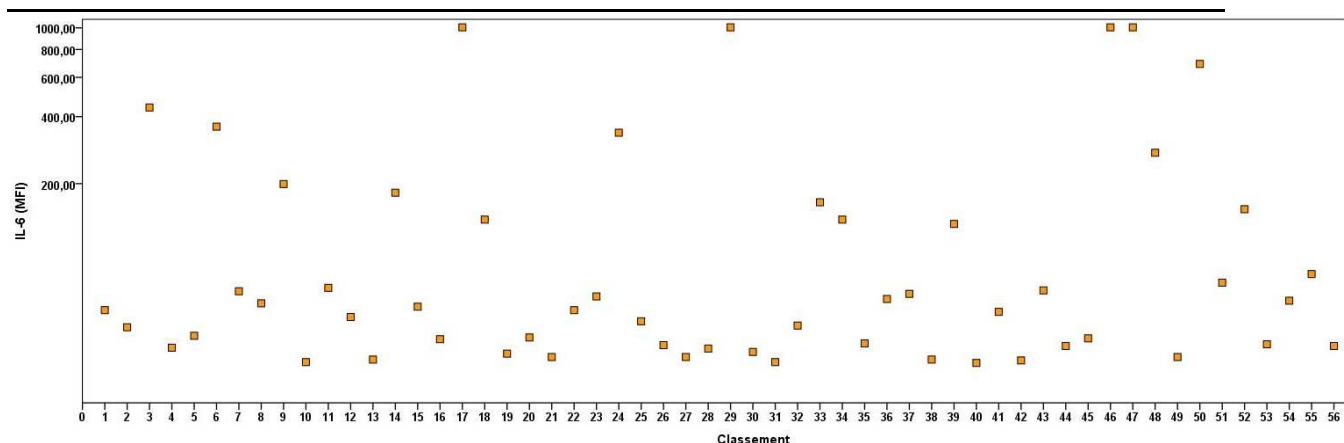


Figure 39 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-6 dans tous les prélèvements étudiés

4.2.6 Interleukine-10 (IL-10)

La MFI du bruit de fond méthodologique de l'IL-10 est de 41,32 et celle du seuil de quantification est de 56,57. La valeur minimale de la MFI en IL-10 est de 39,47 et la valeur maximale est de 1005,74. La médiane des valeurs de MFI de l'IL-10 est de 42,80. Nous avons défini pour cette cytokine un seuil de positivité à 50. En effet, tous les prélèvements de patients dépourvus de lymphome ont une MFI inférieure à 50, excepté pour le LCR P55bis dont la MFI en IL-10 est de 67,1. Le patient a une sclérose en plaques progressive primaire avec de multiples lésions cérébrales à l'IRM.

Au total, sur les 56 prélèvements étudiés, 13 ont une MFI supérieure à 50.

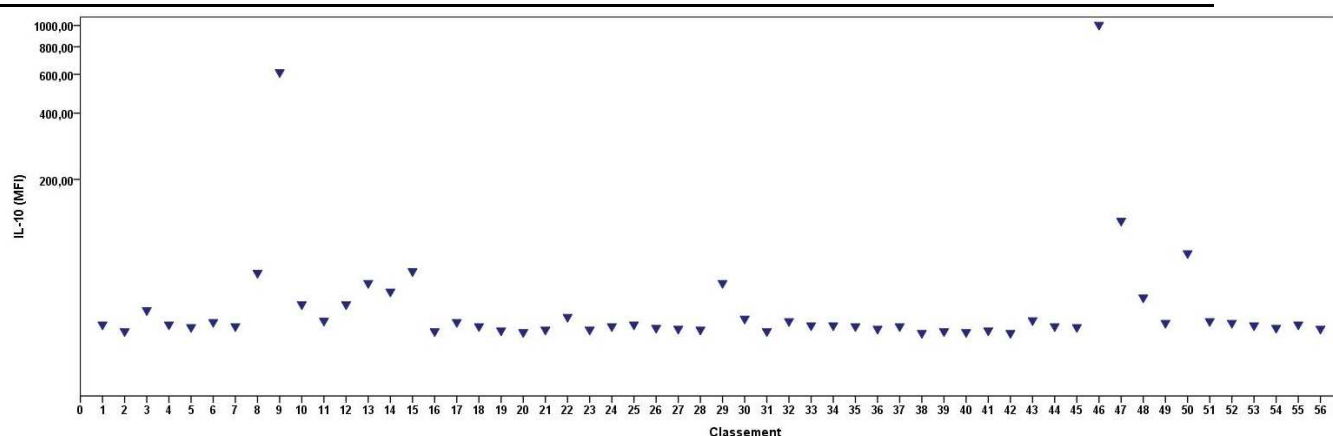


Figure 40 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-10 dans tous les prélèvements étudiés

4.3 Résultats de la mesure de l'IL-10 et de l'IL-6 selon les groupes pathologiques

4.3.1 IL-10

4.3.1.1 Mesure de l'IL-10 en fonction des groupes pathologiques et des résultats de la cytométrie en flux

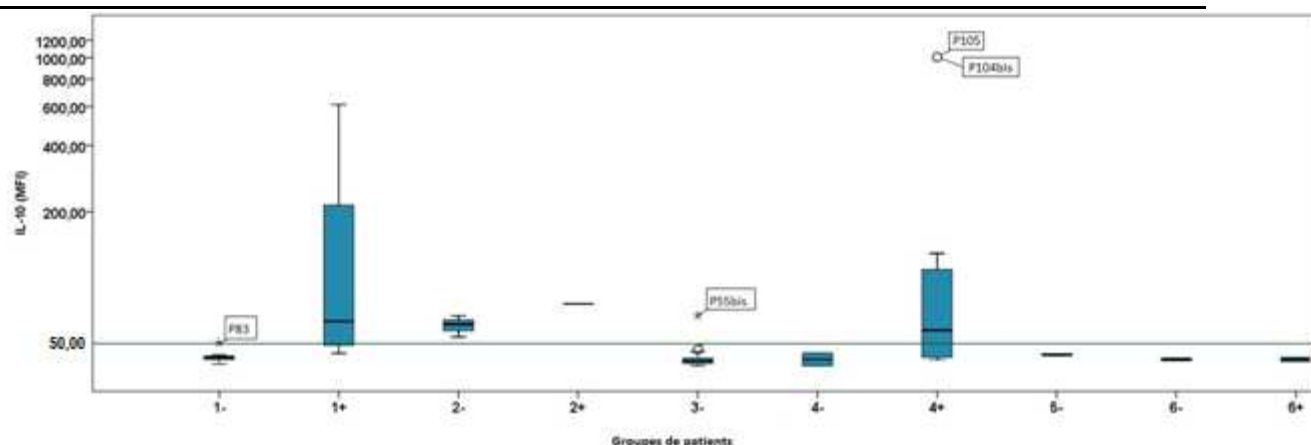


Figure 41 : Représentation en boîtes à moustaches des valeurs de MFI en IL-10 dans les groupes de patients selon le résultat du LCR en cytométrie en flux.

Groupes de patients : 1 : LNH ; 2 : LPSNC ; 3 : Neuro-inflammation et troubles neurologiques divers ; 4 : Maladie de Waldenström, 5 : Oncologie, 6 : Autres pathologies hématologiques.

(-) : Immunophénotypage cellulaire du LCR négatif ; (+) : Immunophénotypage cellulaire du LCR positif

Des taux d'IL-10 supérieurs au seuil de positivité ($MFI > 50$) sont essentiellement retrouvés dans les groupes dont la cytométrie est positive ainsi que dans le groupe 2-.

Les groupes 1-, 3-, 4-, 5- et 6(-/+) se caractérisent par un taux en interleukine-10 homogène et inférieur à 50. Le groupe 2- présente un taux d'IL-10 homogène et supérieur à 50. En revanche, nous remarquons l'importance de l'étendue des mesures dans les groupes :

- 1+ (minimum : 45 et maximum : 613,26) ;
- 4+ (minimum : 42,03 et maximum : 1005,74).

Cette étendue de la plage de mesure résulte de la présence de rares patients au sein du groupe ayant des taux très élevés d'IL-10. L'analyse de la composition des groupes est effectuée dans la figure ci-dessous.

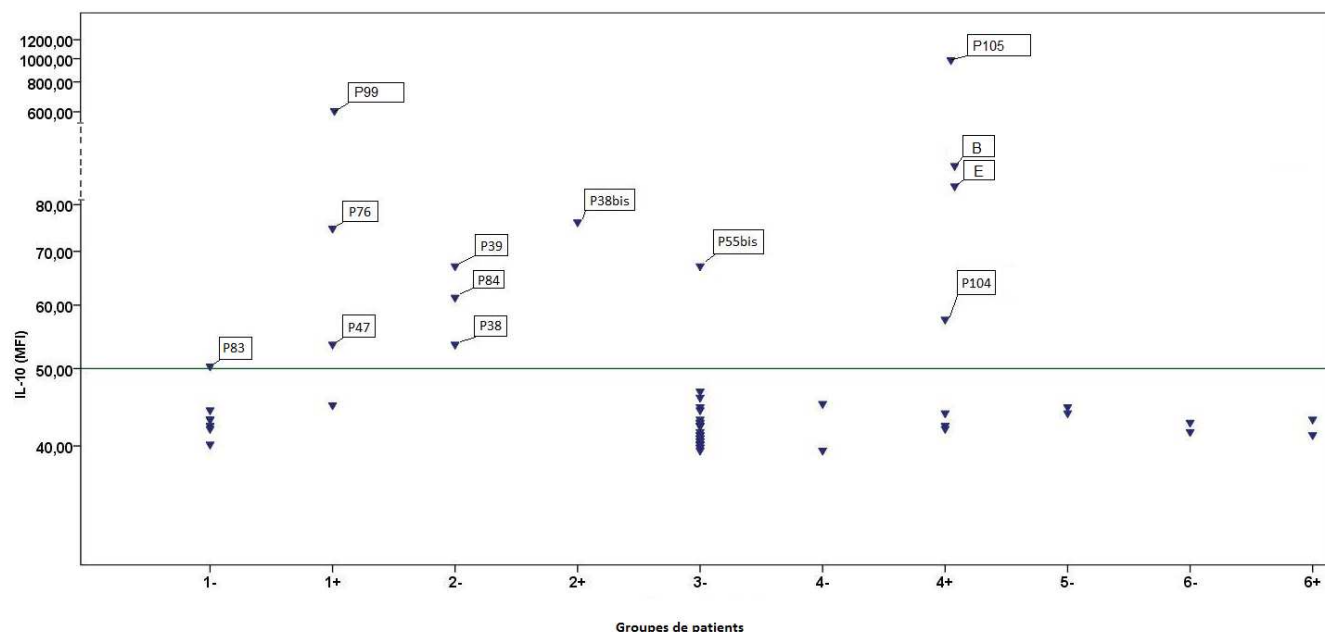


Figure 42 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-10 dans les groupes de patients selon le résultat du LCR en cytométrie en flux.

Groupes de patients : 1 : LNH ; 2 : LPSNC ; 3 : Neuro-inflammation et troubles neurologiques divers ; 4 : Maladie de Waldenström, 5 : Oncologie, 6 : Autres pathologies hématologiques.

(-) : Immunophénotypage cellulaire du LCR négatif ; (+) : Immunophénotypage cellulaire du LCR positif

Dans le groupe 1-, le prélèvement P83 présente une MFI en IL-10 à 50,32, soit une valeur légèrement supérieure au seuil de positivité ($MFI_{IL-10} > 50$). Cette patiente présente un lymphome de Burkitt pour lequel elle a reçu une première cure de chimiothérapie une semaine avant la ponction de LCR.

Dans le groupe 1+, trois prélèvements ont une MFI supérieure à 50 :

- Pour le LCR P47, la MFI en IL-10 est mesurée à 53,59. Le patient présente un lymphome folliculaire diagnostiqué en septembre 2013. La ponction lombaire a été réalisée en juillet 2016 devant une paralysie des nerfs crâniens.
- Pour le LCR P76, la MFI en IL-10 est mesurée à 74,74. La patiente a un lymphome B diffus à grandes cellules de phénotype centre germinatif (DLBCL GC) diagnostiqué en juillet 2016. Devant un tableau clinique de syndrome de la queue de cheval, une rechute neuro-méningée est suspectée et une ponction lombaire est réalisée en janvier 2017.
- Pour le LCR P99, la MFI en IL-10 est mesurée à 613,26. Ce patient est au stade diagnostic d'un DLBCL de phénotype non GC posé sur l'exploration d'une masse rétropéritonéale.

Dans le groupe 2, les quatres prélèvements ont une MFI supérieure au seuil de positivité :

- Pour le prélèvement P38, la MFI en IL-10 est de 53,59 et l'immunophénotypage cellulaire est négatif. Pour le LCR P38bis du même patient, la MFI en IL-10 est de 76,1 avec un immunophénotypage cellulaire positif. Les deux LCR ont été réalisés à 6 jours d'intervalle. Le diagnostic retenu est celui d'un lymphome primitif du système nerveux central devant les résultats de cytométrie en flux et la prise de contraste d'une lésion du vermis cérébelleux à l'IRM. Cette lésion n'étant pas biopsiable, le diagnostic ne peut pas être confirmé par l'anatomopathologie.
- Pour le prélèvement P84, la MFI en IL-10 est de 61,33 et l'immunophénotypage cellulaire est négatif. Chez cette patiente, un lymphome intra-oculaire primitif a été diagnostiqué et traité par une injection intravitréenne de méthotrexate dans chaque œil avant la réalisation de la ponction lombaire.
- Pour le prélèvement P39, la MFI en IL-10 est de 67,1 et l'immunophénotypage cellulaire est négatif. La ponction lombaire a été réalisée devant un déficit moteur complet du bras gauche et en l'absence de traitement (Pas de chimiothérapie, ni corticoïdes). Une lésion fronto-pariétale droite suspecte de lymphome cérébral est visualisée à l'IRM.

Dans le groupe 3, un seul patient a une MFI supérieure au seuil de positivité. Il s'agit du patient P55bis décrit dans le paragraphe 4.2.6.

Pour le groupe 4, les résultats des patients sont décrits dans le paragraphe 4.4.

Dans les groupes 5 et 6, nous notons l'absence de positivité du signal en IL-10.

4.3.1.2 Test statistique : IL-10 et groupe de patients

Nous avons réalisé un test exact de Fisher afin d'étudier le comportement des deux variables suivantes : la répartition du taux d'IL-10 en fonction du seuil de positivité de la MFI à 50 et la pathologie. L'hypothèse H_0 (ou nulle) stipule que les deux variables sont indépendantes, c'est-à-dire que la répartition du taux d'IL-10 ne dépend pas du type de pathologie dont le patient est atteint. Nous comparons les patients atteints de lymphomes (LNH, LPSNC) au reste de l'effectif. Les patients atteints de la maladie de Waldenström ont été exclus du test car cette pathologie présente un profil cytokinique particulier ($IL-6 > IL-10$).

Effectifs	Patients des groupes 1 (LNH) et 2 (LPSNC)	Autres	Total
IL-10 (<50)	7	31	38
IL-10 (>50)	8	1	9
	15	32	47

Tableau 10 : Tableau de contingence pour l'étude de la répartition du taux d'IL-10 en fonction de la pathologie : test exact de Fisher

La p -value ($1,55.10^{-4}$) est inférieure au seuil de significativité de 0,05. Ainsi, l'hypothèse nulle est rejetée. La répartition du taux d'IL-10 dépend significativement de la pathologie.

4.3.2 IL-6

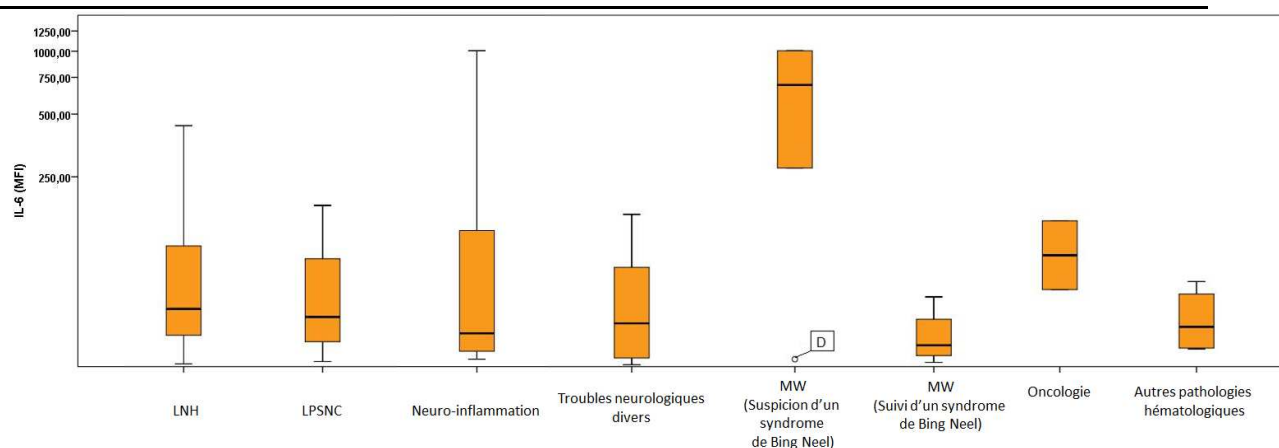


Figure 43 : Représentation en boîtes à moustaches des valeurs de MFI en IL-6 dans les groupes de patients selon le résultat du LCR en cytométrie en flux.

L'IL-6 est mesurée dans tous les groupes. Le groupe des patients atteints de la maladie de Waldenström, pour lesquels un syndrome de Bing Neel est suspecté, a la médiane de MFI en IL-6 la plus élevée. Celle-ci est de 689,33. En revanche, les patients suivis après leur traitement pour un syndrome de Bing Neel ont une médiane de MFI en IL-6 la plus basse et de 38,2750.

4.4 Résultats pour le groupe de patients atteints de la maladie de Waldenström

4.4.1 Profils d'expression simultanée de l'IL-6 et de l'IL-10 par prélèvement

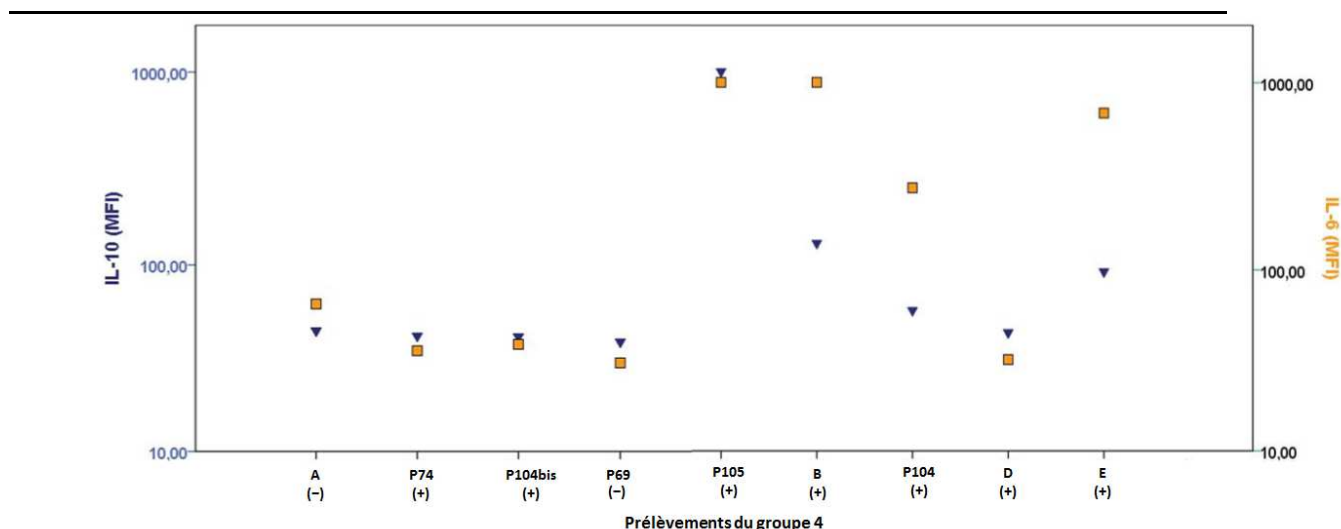


Figure 44 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-10 et l'IL-6 dans le groupe des patients atteints de la maladie de Waldenström

(-) : Immunophénotypage cellulaire du LCR négatif; (+) : Immunophénotypage cellulaire du LCR positif

Les données clinico-biologiques et les profils cytokiniques de l'ensemble des patients atteints de la maladie de Waldenström sont en [Annexe IV](#).

Les résultats des examens biologiques complémentaires (Protéinorachie, chaînes légères libres, immunofixation de l'immunoglobuline monoclonale) réalisés sur les LCR du groupe de patients atteints de la MW sont présentés en [Annexe V](#).

4.4.2 Résultats relatifs aux patients suivis pour un syndrome de Bing Neel

	A	P74	P104bis
MFI IL-6	65,9	36,73	39,82
MFI IL-10	45,17	42,41	42,03
Ratio MFI IL-10/IL-6	0,68	NA	NA
Interprétation du profil cytokinique	Positif	Négatif	Négatif
Résultat de l'immunophénotypage cellulaire	Négatif	Positif	Positif
Statut mutationnel du gène <i>MYD88</i> ^{L265P} dans le LCR	Positif	Négatif	Négatif
Date du diagnostic de la MW	2006	12/2010	2007
Statut de la maladie	Progression	Localisation neuro-méningée exclusive	Rémission depuis 2012
Date du diagnostic du Syndrome de Bing Neel	06/2013	12/2010	11/2015
Date du prélèvement de LCR	24/11/2014	16/01/2017	06/04/2017
Indication du LCR	Douleurs atypiques	Evaluation	Evaluation
Traitement actuel du SBN	4 cures de R-DHAC (Rituximab, Dexaméthasone, Cytarabine et Carboplatine) et chimiothérapie intrathécale	IBRUTINIB depuis oct-2015	IBRUTINIB depuis nov-2015
Conclusion	Réfractaire	Rémission clinique du Syndrome de Bing Neel	

Tableau 11 : Caractéristiques des patients suivis pour un syndrome de Bing Neel
NA : non applicable (MFI < au seuil de positivité)

Pour le LCR n°A, l'immunophénotypage cellulaire du LCR est considéré négatif avec moins de 200 lymphocytes analysables. Le profil cytokinique est, lui, positif avec une MFI en IL-6 à 65,9 et un ratio des MFI IL-10/IL-6 inférieur à 1. Les autres examens biologiques réalisés sur le LCR retrouvent une positivité du statut mutationnel du gène *MYD88*^{L265P} et la présence de chaînes légères libres Kappa. L'association aux signes cliniques fait conclure à la persistance du SBN chez cette patiente.

Pour les LCR n°74 et n°104bis, les profils cytokiniques ont des MFI en IL-6 et en IL-10 négatives. L'immunophénotypage cellulaire de ces LCR retrouve la persistance d'un clone de cellules B monotypiques mais dont la quantité est inférieure à celle du diagnostic. Ces patients sont en rémission clinique de leur syndrome de Bing Neel traité par Ibrutinib.

4.4.3 Résultats relatifs aux patients avec suspicion d'un syndrome de Bing Neel

	P69	P105	B	P104	D	E
MFI IL-6	31,52	1005,74	1005,74	275,41	32,67	689,33
MFI IL-10	39,47	1005,74	129,38	57,58	43,97	91,92
Ratio MFI IL-10/IL-6	NA	1,00	0,13	0,21	NA	0,13
Interprétation du profil cytokinique	Négatif	Positif	Positif	Positif	Négatif	Positif
Résultat de l'immunophénotypage cellulaire	Négatif	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
Statut mutationnel du gène <i>MYD88</i> ^{L265P} dans le LCR	Négatif	Donnée non disponible	Positif	Positif	Positif	Positif
Date du diagnostic de la MW	12/2016	11/2009	09/1999	2007	04/2011	04/2010
Statut de la MW	Actif	Rémission depuis 2013	Rémission depuis 2007	Rémission depuis 2012	Surveillance	Evolution
Date du prélèvement de LCR	06/01/2017	06/04/2017	10/12/2013	04/11/2015	02/12/2014	01/11/2016
Indication du LCR	Atteinte neurologique centrale	Myoclonies diffuses des quatre membres	Douleurs sacro-iliaques bilatérales avec irradiation aux membres inférieurs	Déficit neurologique prolongé, paresthésies chroniques des mains et des jambes avec prédominance aux extrémités	Neuropathie axonale sensitive et motrice	Persistance de douleurs et faiblesse des membres inférieurs
Conclusion	Manifestation neurologique de la vascularite de type Churg and Strauss	Localisation neuro-méningée de la MW : Syndrome de Bing Neel				

Tableau 12 : Caractéristiques des patients avec suspicion d'un syndrome de Bing Neel
NA : non applicable (MFI < au seuil de positivité)

Les résultats des profils cellulaire et cytokinique sont concordants avec le diagnostic retenu pour 5 patients sur les 6 testés pour suspicion de SBN.

Pour le LCR n°D, seul le profil cellulaire est concordant avec la présence d'un syndrome de Bing Neel (Tableau 9).

Le profil cytokinique n'est pas en faveur de ce diagnostic car les MFI en IL-6 et IL-10 sont négatives.

Au total, la présence d'un syndrome de Bing Neel a été objectivée pour les patients avec les prélèvements suivants : P105, B, P104, D, E et A. L'absence de SBN a été prouvée pour le prélèvement P69 et la rémission de ce syndrome a été conclue pour les prélèvements P74 et P104bis.

IV Discussion

Les lymphomes cérébraux constituent une urgence diagnostique et thérapeutique. L'enjeu est d'apporter des arguments biologiques et histologiques afin d'étayer le diagnostic et d'adapter la prise en charge du patient dans les meilleurs délais. La difficulté du diagnostic réside dans les polymorphismes de présentation neuroradiologique et clinique. Le diagnostic de certitude est histologique mais la biopsie cérébrale est hautement invasive et n'est pas toujours réalisable : petite taille, localisations profondes et inaccessibles des lésions, risque hémorragique, état général et comorbidités du patient (87). Les biopsies stéréotaxiques nécessitent du temps pour l'organisation et la réalisation du geste et la préparation du patient. Elles présentent un taux d'échec diagnostique de 10 à 35% avec un délai de rendu de résultat allant de 48 à 72 h en dehors de la méningite lymphomateuse (88). Au contraire, la ponction lombaire est réalisable dans un délai plus court au lit du patient, après avoir vérifié l'absence de contre-indication du geste. La cytométrie en flux, 12 paramètres, réalisée sur le liquide céphalo-rachidien permet de rendre un résultat d'immunophénotypage dans un délai presque aussi court que l'examen morphologique. En effet, la réalisation technique de l'immunomarquage des cellules du LCR nécessite moins de 2 heures. Le but de cet examen est de détecter et de caractériser la présence d'une infiltration lymphoïde maligne que celle-ci soit d'origine primitive ou secondaire.

Les situations suivantes permettent d'éviter la biopsie cérébrale en présence de signes radiologiques évocateurs :

- Si l'atteinte méningée est documentée en cytométrie en flux ou en cytologie sur le LCR ;
- Si l'atteinte oculaire est prouvée en cytométrie en flux ou en cytologie sur le liquide du vitré ou la biopsie du vitré.

La cytologie a été réalisée sur 45 des 56 prélèvements étudiés, soit pour environ 80% des prélèvements. L'approche cytologique a permis de conclure à un envahissement lymphomateux pour 3 prélèvements (6,7%), a rendu une forte suspicion de cellules tumorales pour 2 prélèvements (4,4%) et est négative pour 40 prélèvements (88,9%).

Dans notre étude, la cytométrie en flux détecte une population anormale pour 14 des 56 prélèvements (25%). L'amélioration de la détection des cellules lymphomateuses par la CMF est en accord avec les données de la littérature pour l'identification des envahissements leptoméningés. L'étude de Quijano et al. rapporte la positivité de 6% des LCR en cytologie et de 22% en cytométrie (89). Ces pourcentages sont en accord avec les résultats de notre série de prélèvements.

Sur les 45 prélèvements où une approche conjointe en cytologie et en cytométrie en flux a été réalisée, 8 prélèvements sont positifs en CMF (17,8%). Parmi eux, nous retrouvons les 2 prélèvements avec une forte suspicion de cellules tumorales en cytologie (P76 et P104) et le seul prélèvement pour lequel la cytologie et la cytométrie sont positives (P99).

Sur les 37 prélèvements négatifs en CMF, 2 sont positifs en cytologie. Il s'agit d'une patiente atteinte d'un lymphome de Burkitt (P83) et d'un autre patient atteint d'un adénocarcinome bronchique (P68). Les caractéristiques immunologiques des cellules cohésives métastatiques des tumeurs extra-hématopoïétiques ne sont pas explorées par notre panel lymphoïde B mature. En ce qui concerne les lymphoblastes du lymphome de Burkitt, il s'agit de cellules lymphoïdes moins différenciées n'exprimant pas systématiquement à leur surface les chaînes légères Kappa ou Lambda. Afin d'identifier ces chaînes légères, il faut adapter la méthodologie et réaliser une perméabilisation des cellules pour faire un marquage intra-cellulaire. La perméabilisation cellulaire est effectuée lorsqu'un lymphome de Burkitt est suspecté ou lorsque l'expression des chaînes légères est faible et ne permet pas de déterminer la nature de la monotypie. Les deux échecs de la cytométrie en flux sont donc liés à la non-adaptation des anticorps du panel. Celui-ci étant orienté pour l'identification des syndromes lymphoprolifératifs matures. La recherche de cellules métastatiques dans le LCR par une approche en CMF a été décrite. Elle nécessite un panel orienté en fonction des marqueurs exprimés par les cellules métastatiques : CD56, gangliosides GD2 et GD3, CD9, CD81 et CD90. Le marqueur CD45 n'est pas exprimé par les cellules métastatiques et permet de les distinguer des cellules leucocytaires exprimant le CD45. (90–93)

Au total, 18 patients de notre étude ont une localisation cérébrale documentée par la cytologie et/ou par la cytométrie en flux et/ou par l'histologie après biopsie. Parmi eux, 4 localisations n'ont pu être prouvées ni par la cytologie, ni par la cytométrie en flux.

Il s'agit :

(1) D'un cas de DLBCL lié à l'EBV diagnostiqué chez un patient séropositif ayant bénéficié d'une seule ponction lombaire. Une contamination sanguine du LCR est constatée en CMF (P102) ;

(2) D'un cas de lymphome primitif du SNC non objectivé sur la première ponction lombaire. L'immunophénotypage montre la présence de cellules B monotypiques Kappa mais en nombre insuffisant pour affirmer avec certitude une localisation neuro-méningée (P38). Une seconde PL réalisée 6 jours après s'est avérée positive en CMF (P38bis). La biopsie cérébrale n'est pas réalisable chez ce patient en raison de la localisation de la masse tumorale dans le vermis cérébelleux ;

(3) D'un cas de lymphome intra-oculaire primitif pour lequel la ponction lombaire est réalisée après une première prise en charge thérapeutique de la localisation oculaire par une injection intravitréenne de méthotrexate dans chaque oeil. Le classement en lymphome oculo-cérébral est effectué devant l'hyperprotéinorachie et l'élévation de la bêta-2-microglobuline dans le LCR (P84) ;

(4) D'un lymphome primitif du SNC pour lequel l'immunophénotypage du LCR présente un nombre insuffisant d'évènements. La biopsie a permis le diagnostic d'un lymphome DLBCL type ABC (P39).

Ces 4 observations constituent des « faux négatifs ». Pour 2 des 4 « faux négatifs » (P38 et P39), une quantité insuffisante de cellules analysables est à l'origine de la perte de sensibilité de la CMF. En effet, la sensibilité de la cytométrie en flux est conditionnée par le volume et la cellularité du LCR examiné. La fiabilité de l'examen du LCR est conditionnée par la quantité de LCR étudiée. Un volume de LCR de 2 à 3 mL est rapporté comme nécessaire à une bonne sensibilité de l'analyse (89). Dans les deux cas (P38 et P39), nous n'avons pu travailler que sur un millilitre de LCR.

La paucité cellulaire peut également être expliquée par le délai d'acheminement du prélèvement responsable de la lyse cellulaire. En effet, la fragilité des cellules et la faible viabilité des cellules tumorales en dehors de leur environnement ont été rapportées (94). Afin d'augmenter la sensibilité de l'examen, il a été montré l'intérêt de la réalisation d'une seconde ponction lombaire dans un délai rapproché (moins d'une semaine) en cas de négativité de la première PL et de signes cliniques évocateurs d'une localisation cérébrale. En effet, la sensibilité de l'analyse du LCR

passé de 45-70% pour la première ponction lombaire à une sensibilité de 77-90% pour la seconde ponction lombaire (95).

Aucun cas de « faux positif » n'a été détecté dans notre série traduisant la spécificité du panel d'anticorps utilisé et de la méthodologie.

Notre étude, comme d'autres études précédentes, confirme le gain important qu'amène la CMF dans la sensibilité de détection des cellules lymphomateuses dans le LCR par rapport à la cytologie (89,96–100). En revanche, l'orientation spécifique de la CMF amène le risque de ne pas détecter des cellules de tumeurs solides. Il apparaît ainsi que la cytologie et la cytométrie en flux sont deux méthodes complémentaires. La CMF étant plus sensible mais non exhaustive dans la détection des différents types de cellules tumorales.

Comme nous l'avons vu précédemment, la principale cause d'échec dans la mise en évidence de cellules lymphomateuses dans le LCR est consécutive à la faible cellularité des prélèvements. De ce fait, des méthodes d'identification indirecte de marqueurs tumoraux se sont développées. Parmi elles, les plus prometteuses sont les dosages de cytokines et d'ADN tumoraux libres.

Le dosage de cytokines est réalisable par plusieurs méthodes. La plus ancienne est l'ELISA et représente le « *gold standard* » du dosage de protéines. Une étude publiée au « *Journal of Biomolecular Screening* » en 2010 a comparé l'ELISA aux autres technologies récemment développées : *Cytometric Bead Array* (CBA) et les kits Luminex®. Des coefficients élevés de corrélation sont observés entre l'ELISA et chacune des autres méthodes (101).

Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode CBA pour réaliser les profils cytokiniques des LCR étudiés. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir doser jusqu'à 30 cytokines simultanément en utilisant 50 µL de LCR alors que l'ELISA nécessite 200 µL de prélèvement pour le dosage d'une cytokine. La méthode CBA multiplexe présente un nombre de manipulations réduit et un gain de temps significatif (102,103). Cette méthode a été initialement développée et adaptée pour doser des cytokines présentes dans le sérum, le plasma et les surnageants de cultures cellulaires. Les panels des kits de la marque BD® permettent d'explorer la synthèse des cytokines pour différentes réponses cellulaires. La réponse lymphocytaire T de type Th1/Th2 est explorée par le dosage de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-6,

l'IL-10, le TNF, l'IFN gamma. Une réponse de type inflammatoire est plus spécifiquement recherchée par le dosage de l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF et l'IL-12p70.

L'étude de Whitcup et al., publiée en 1997, montre pour la première fois une corrélation entre des taux élevés d'IL-10 mesurés par ELISA dans le LCR et la localisation d'un lymphome primitif du SNC. En effet, les auteurs montrent que la probabilité de détecter des cellules lymphomateuses dans le LCR est d'autant plus grande que le taux d'IL-10 mesuré dans le LCR est élevé. En revanche, l'IL-6 peut être mesurée à des taux significatifs pour des pathologies à composante inflammatoire. (104) Dans la maladie de Waldenström, les lymphoplasmodocytes sécrètent de l'IL-6 à un taux important ainsi que de l'IL-10 (105). Le kit retenu est donc celui explorant la réponse inflammatoire grâce à l'IL-1 β , l'IL-6, le TNF et l'IL-12p70 et dosant l'IL-10 comme marqueur de cellules tumorales. La synthèse d'IL-8 est également mesurée par ce kit.

Plusieurs études ont confirmé l'intérêt du dosage cytokinique comme marqueur de cellules tumorales. L'étude de Sasayama et al., réalisée en méthode ELISA, rapporte des valeurs médianes en IL-10 de 42 pg/mL et en IL-6 de 6,8 pg/mL pour le groupe des patients avec LPSNC (n=26). Le seuil de positivité est à 9,5 pg/mL. (106) L'étude de Nguyen-Them et al. détecte avec la méthode CBA des valeurs médianes en IL-10 de 130 pg/mL et en IL-6 de 9 pg/mL dans les cas de LPSNC avec infiltration du LCR par des cellules lymphomateuses (n=29). Le seuil de positivité est supérieur ou égal à 4 pg/mL (107). L'étude de Song et al. utilise la technique d'électrochimiluminescence (ECLIA) et trouve une valeur médiane en IL-10 de 74,7 pg/mL dans le LCR des patients avec un LPSNC (n=22). Le seuil de positivité est à 8,2 pg/mL (108).

Au total, ces études montrent qu'à l'état physiologique il n'y a pas ou peu de synthèse d'IL-10 au niveau du SNC et que le taux d'IL-10 est significativement plus élevé dans les cas de lymphomes primitifs du SNC comparativement aux pathologies neuro-inflammatoires, neuro-infectieuses, démyélinisantes et aux autres tumeurs cérébrales (106–108).

Un seuil de détection sensible, capable de mesurer les basses concentrations, est donc nécessaire pour le diagnostic des localisations cérébrales. Il doit être voisin de 5 pg/mL en regard des seuils de positivité des différentes études. Le kit que nous avons retenu a une gamme d'étalonnage allant de 0 à 5000 pg/mL et est adapté aux

cytomètres de la marque BD®. Nous avons dû adapter les voltages du cytomètre Navios™ à ce kit et définir des nouvelles concentrations pour les points de la gamme d'étalonnage afin de se situer dans l'intervalle de mesure des concentrations en IL-10 et en IL-6 retrouvées dans le LCR. Les nouvelles concentrations de la gamme d'étalonnage vont de 0 à 156,25 pg/mL. Un des buts des réglages du cytomètre est d'obtenir une bonne séparation des différents types de billes anti-cytokines dans le canal FL6. Les figures 15 et 16 montrent la résolution de séparation des différentes populations de billes. Ceci est un premier critère de validation pour l'utilisation d'une méthode multiplexe. Secondairement, nous avons vérifié que la valeur en MFI du signal de fluorescence mesuré dans le canal FL2 augmentait proportionnellement à la concentration des points de la gamme d'étalonnage. Le réglage du voltage du canal FL2 nous a permis d'avoir un signal spécifique et significativement différent du bruit de fond avec une amplitude dynamique du signal couvrant nos différents points de gamme. Les figures 16 et 17 montrent que le réglage retenu permet de mesurer des signaux correspondant aux points de gamme allant de 0 à 156 pg/mL. Les réglages des canaux FL2 et FL6 du cytomètre Navios™ attestent de la capacité à mesurer des MFI comme dans les études réalisées avec la méthode CBA (fournisseur BD®) sur des cytomètres BD®. De plus, la sensibilité de la méthode a été améliorée en adaptant les conditions opératoires. L'agitation a permis d'augmenter significativement la valeur de la MFI du signal en FL2, proportionnellement à la concentration en cytokines, en favorisant la rencontre des cytokines avec les billes de capture. L'agitation est préconisée à différents moments de la technique afin d'éviter que les billes de capture ne sédimentent. Elle est également primordiale au moment de l'acquisition. Celle-ci est décrite dans la notice du fournisseur pour la réalisation de la technique CBA en microplaques et nous l'avons transférée à la méthode en tubes. Une autre étude a également montré l'intérêt de l'agitation (103). Un autre paramètre améliore la spécificité de la réaction antigène-anticorps, il s'agit de l'incubation en deux temps (Figure 24). Elle est décrite avec l'utilisation de la méthode CBA et avec la possibilité de réaliser un lavage après la première période d'incubation (103).

Les courbes de calibration de chaque cytokine ont été réalisées sous ces deux conditions et ont montré la reproductibilité de la méthodologie (Figure 26). Celle-ci est essentielle à l'extrapolation correcte des résultats. Pour la validation de la quantification des cytokines en concentration (pg/mL), nous avons utilisé un standard

externe en IL-6. L'extrapolation du résultat des MFI vers un résultat en concentration n'a pas permis de retrouver la concentration théorique de 100 pg/mL mais une concentration mesurée de 68 pg/mL. Cette erreur systématique s'est reproduite de façon similaire pour une concentration théorique de 10 pg/mL mesurée à 6,8 pg/mL (Figure 30). La non-corrélation entre la concentration théorique et la concentration mesurée montre l'absence de récupération totale de la concentration du standard externe annoncée par le fournisseur. Ceci peut être lié au mode de production du standard externe dans un système cellulaire procaryote d'*Escherichia coli* qui peut être différent de celui des cytokines de la gamme de calibration (109). Les caractéristiques antigéniques des épitopes des protéines recombinantes pouvant être partiellement différentes. L'IL-6 humaine, produite dans un système cellulaire eucaryote, est cependant détectée par notre méthode dans le LCR des patients atteints d'un syndrome de Bing Neel (Figure 44). Ceci confirme que la spécificité de l'anticorps anti-IL-6 du kit est bonne. Cependant, la concentration exacte ne peut être rendue avec précision puisque nous ne disposons pas d'une solution standard d'origine humaine pour valider une récupération à 100%. Aussi, nous avons décidé, pour chacune de nos mesures, d'utiliser uniquement la valeur en MFI du signal pour l'interprétation des résultats.

Dans un contexte pathologique, la réponse immunitaire mise en place au niveau du SNC se reflète au niveau du profil cytokinique du LCR, celui-ci variant selon la répartition lymphocytaire visualisée sur l'immunophénotypage cellulaire. Les profils cytokinique et cellulaire du LCR doivent être interprétés parallèlement.

L'interleukine-12p70 n'est détectée dans aucun des LCR de notre étude et très peu d'études ont cherché à la doser dans ce milieu réactionnel. L'étude de Bielekova et al. s'est intéressée au dosage d'une combinaison de biomarqueurs de l'inflammation intrathécale dans le LCR par la méthode CBA et par ELISA. Parmi ces biomarqueurs, l'IL-12p70 a été mesurée par la méthode CBA et n'est détectée dans aucun des LCR. En revanche, une concentration significativement plus élevée en IL-12p40 a été mise en évidence par la méthode CBA dans le LCR des patients ayant une SEP de forme récurrente-rémittente, comparativement aux autres groupes. Les auteurs ont souhaité déterminer l'origine de l'IL-12p40, qui est une des deux sous-unités de l'IL-12p70, avec l'IL-12p30. Devant l'absence de détection de l'IL-12p70 et de l'IL-23, les auteurs ont conclu que l'IL-12p40 mesurée provenait soit du monomère, soit de l'homodimère : l'IL-12p80 (110). L'activité biologique propre de

l'IL-12p40 est évoquée par certaines études (111,112). Ces informations soulèvent la problématique de la stabilité de l'IL-12p70 sous forme d'hétérodimère dans le LCR et peut expliquer l'absence de détection d'IL-12p70 dans le LCR de nos patients ayant une pathologie neuro-inflammatoire.

Le *Tumor Necrosis Factor* est détecté dans un seul de nos LCR (P105). Le TNF est détecté dans le surnageant des lignées cellulaires de la maladie de Waldenström (113). En revanche, l'étude de Song et al. ne détecte pas de TNF à un taux significatif dans les LCR des patients atteints d'un lymphome primitif du SNC avec ou sans localisation lymphomateuse intraoculaire ni dans le groupe des patients atteints de neuro-inflammation (4,0 à 10,3 pg/mL, seuil de positivité à 9,2 pg/mL). La présence de TNF dans le LCR semble corrélée avec une pathologie neuro-infectieuse, les valeurs de TNF oscillant entre 4,3 et 50,1 pg/mL (108). Le seul patient de notre cohorte avec une pathologie neuro-infectieuse correspond au LCR P51. Une neuro-aspergillose a été diagnostiquée chez ce patient atteint d'une LLC. Le LCR présente cependant une MFI du TNF négative.

L'interleukine-1 β est une cytokine pro-inflammatoire détectée dans un seul LCR (P28) d'une patiente atteinte d'une SEP de forme récurrente-rémittente. Les trois autres patients ayant une SEP ont des taux d'IL-1 β indétectables. L'étude de Stoeck et al. s'est intéressée au dosage de cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le LCR de patients atteints de la maladie de Creutzfeldt-Jacob, de maladies neuro-inflammatoires (SEP, vascularite cérébrale, inflammation chronique du SNC...) et de patients contrôles. Le dosage d'IL-1 β par ELISA s'est révélé négatif dans tous les LCR de cette étude (114). Une étude a réussi à détecter de l'IL-1 β dans le LCR de patients atteints d'une encéphalite à herpèsvirus humain-6B à un taux moyen significativement plus élevé (0,2 pg/mL) que dans le groupe contrôle (0 pg/mL) (115). La technologie Luminex® utilisée présente une sensibilité importante nécessaire à la détection des faibles concentrations en IL-1 β . Cependant, elle nécessite de disposer d'un appareillage Luminex® spécifique.

Au total l'IL-12p70, le TNF et l'IL-1 β n'apparaissent pas comme des marqueurs optimaux que ce soit pour la mise en évidence de localisations neuromeningées de cellules lymphomateuses ou de pathologies neuro-dégénératives ou neuro-inflammatoires. La substitution de ces trois cytokines dans un kit multiplexe par d'autres marqueurs plus informatifs présenterait un intérêt.

L'interleukine-8 est détectée dans tous les LCR de notre étude avec des valeurs de MFI très variables allant de 55 à 1005,74. Dans l'étude de Song et al., l'étendue des valeurs en IL-8 est également importante et va de 17,0 à 7500 pg/mL tous groupes confondus. Cependant, leur étude a mis en évidence un taux d'IL-8 significativement plus élevé dans le groupe des neuro-infections par rapport aux groupes des maladies démyélinisantes et des LNH systémiques (108). Les propriétés inflammatoires de l'IL-8 ont été mises en évidence par plusieurs études (108,110,114). Notre étude n'a pas permis d'établir de corrélation entre les variations des taux d'IL-8 et un état pathologique. L'interleukine-8 est synthétisée et libérée par différents types cellulaires dont les principaux sont les macrophages, les monocytes, les lymphocytes, les polynucléaires neutrophiles, les cellules endothéliales et les astrocytes (79). Cette cytokine pléiotropique, retrouvée à un taux élevé dans le LCR, peut traduire un délai d'acheminement long. En effet, les polynucléaires neutrophiles se lysent rapidement et relarguent de l'IL-8 dans le LCR. L'étude de Stoeck et al. détecte des taux faibles d'IL-8 dans le groupe contrôle, l'explication pourrait être la condition d'acheminement du LCR dans de la glace et sa congélation immédiate à -80°C (114). Ceci n'était pas réalisable en routine afin de préserver les cellules pour l'immunomarquage.

L'interleukine-10 est rapportée dans de nombreuses études comme un biomarqueur fiable et robuste des cellules tumorales (104,106–108,116–118). L'étude de Rubenstein et al. démontre que la détection de l'IL-10 associée à la chimiokine CXCL13 sont des biomarqueurs utiles au diagnostic des lymphomes primitifs du SNC (117). Notre étude confirme l'intérêt du dosage de l'IL-10. En effet, dans le groupe des LPSNC et des LNH, le taux d'IL-10 est mesuré à un taux significativement supérieur à celui des autres groupes (Tableau 10). Le profil cytokinique constitue un apport diagnostique pour deux patients où la cytologie et la cytométrie sont négatives dans un contexte de LPSNC. Le patient avec le LCR P38 a un taux d'IL-10 supérieur au seuil de positivité (MFI en IL-10 de 53,59) sur la première ponction lombaire. Cette élévation du taux d'IL-10 montre l'intérêt de poursuivre les examens.

La seconde ponction lombaire, positive en CMF, montre un taux plus important en IL-10 (MFI en IL-10 de 76,1). Cette observation indique que le taux en IL-10 est corrélé à la quantité de cellules lymphomateuses dans le LCR comme le montre l'étude de Song et al. En effet, seulement deux des 22 patients du groupe des

LPSNC de cette étude ont une atteinte leptoméningée prouvée à la fois par la cytologie et la cytométrie en flux du LCR. La concentration en IL-10 est supérieure à 1000 pg/mL (108). La détermination de la fréquence de l'atteinte leptoméningée dans les LPSNC a fait l'objet de nombreuses études dont les résultats varient de 15 à 42% (60,119). L'incidence de la présence de cellules lymphomateuses dans le LCR semble liée à la localisation de la masse tumorale et à la détectabilité des cellules lymphomateuses par les méthodes diagnostiques utilisées (120). En effet, parmi les 20 cas sans atteinte leptoméningée prouvée, les patients ont des localisations diverses et profondes du LPSNC : ganglions de la base, corps calleux, ventricule latéral, lobe temporal, lobe pariétal et lobe frontal. Des taux d'IL-10 sont positifs dans 18 des 20 prélèvements (108). Un cas similaire est observé dans notre étude pour la patiente avec le LCR P39 présentant une lésion fronto-pariétale droite. La cytologie et la cytométrie en flux de ce LCR sont négatives et la MFI en IL-10 est positive (MFI en IL-10 de 67,1). Le taux d'IL-10 permet donc de rattraper des cas de « faux négatifs » en association avec l'imagerie cérébrale (116). La mesure de l'IL-10 présente un intérêt majeur en l'absence de cellules détectables en cytologie et en CMF (108).

Dans notre étude, un « faux-positif » en IL-10 est constaté. Il s'agit d'un patient à la phase aiguë d'une poussée de la SEP avec une MFI en IL-10 supérieur à la limite de positivité. Parallèlement, des taux élevés d'IL-6 et d'IL-8 sont mesurés dans son LCR (P55bis). L'interleukine-10 possède une activité anti-inflammatoire importante et peut être synthétisée en réponse à une production excessive d'IL-6 (83). Pour cette raison, le ratio IL-10/IL-6 est utilisé dans plusieurs études pour améliorer la sensibilité de l'analyse (108,121). Pour le LCR P55bis, la MFI en IL-6 (1005,74) est largement supérieure à la MFI en IL-10 (71,6) et le ratio des MFI IL-10/IL6 est inférieur à 1. Ainsi, le ratio IL-10/IL6 permet d'infirmer la présence de cellules lymphomateuses et l'étiologie inflammatoire est retenue. Lorsque ce ratio est supérieur à 1, il oriente vers une pathologie tumorale du SNC puisque le taux d'IL-10 est supérieur au taux d'IL-6. Dans l'étude de Song et al., un ratio supérieur à 1 est observé uniquement dans le groupe des LPSNC et cinq patients ont un taux d'IL-10 positifs en dehors d'un contexte de LPSNC mais avec un ratio IL-10/IL-6 inférieur à 1. Il s'agit de patients présentant une neuro-infection avec des taux élevés d'IL-6 (108).

L'interleukine-6 est une cytokine inflammatoire et est mesurée à un taux élevé dans les LCR de patients avec un diagnostic de syndrome de Bing Neel (Figure 43). La médiane des MFI en IL-6 dans ce groupe de patients est de 689,33.

En effet, la synthèse d'IL-6 par les cellules lymphoplasmocytaires a été montrée lors de l'étude du transcriptome dans la MW (24). Un seul LCR de ce groupe a une MFI en IL-6 négative. Il s'agit du LCR D pour lequel le diagnostic de SBN a été retenu devant la positivité de plusieurs examens réalisés sur le LCR : cytométrie en flux, statut mutationnel du gène *MYD88*^{L265P} et dosage des chaînes légères libres Kappa (Tableau 12, [Annexe IV](#), [Annexe V](#)). Cette mutation *MYD88*^{L265P} est positive dans les prélèvements où un syndrome de Bing Neel est diagnostiqué. Plusieurs études ont montré l'intérêt de rechercher le statut mutationnel du gène *MYD88*^{L265P} dans le LCR comme biomarqueur diagnostique d'un syndrome de Bing Neel (26,122). Notre étude montre que la positivité de cette mutation est corrélée à la synthèse d'IL-6 et d'IL-10, excepté dans le cas du prélèvement D. La négativité en cytokines de ce prélèvement peut être liée à un problème dans la prise en charge pré-analytique du prélèvement. L'hypothèse de l'absence de sécrétion d'IL-6 par les cellules lymphomateuses est peu probable en raison de la positivité de la mutation *MYD88*^{L265P}.

Deux des patients de notre étude traités par Ibrutinib (P74 et P104bis) ont des MFI en IL-6 et en IL-10 négatives et la recherche de la mutation *MYD88*^{L265P} est négative. Ces observations sont liées au mécanisme d'action de la molécule de l'Ibrutinib qui est un inhibiteur de la *Bruton tyrosine kinase* (BTK). La voie de signalisation NFκB est alors inactivée par cette thérapie ciblée (Figure 6). La première réponse au traitement est une réponse moléculaire et se traduit par l'arrêt de la sécrétion des cytokines. Nous observons une perte de fonctionnalité des cellules tumorales. La réponse pharmacologique à l'Ibrutinib est de type « cytostatique » puisque les cellules ne sont pas détruites rapidement ni éliminées totalement du LCR. Dans les deux prélèvements, un clone tumoral résiduel est détecté en cytométrie en flux (Tableau 9).

Les cytokines constituent un marqueur de suivi important et peuvent annoncer la rechute d'une localisation cérébrale. Pour la patiente avec le LCR A, nous constatons la réascension du taux d'IL-6 avant la positivité en CMF du LCR (Tableau 11, [Annexe IV](#)). L'interprétation de l'ensemble des données clinico-biologiques a conduit au diagnostic de rechute du syndrome de Bing Neel.

La particularité du profil cytokinique de la maladie de Waldenström permet de distinguer un syndrome de Bing Neel par rapport à une localisation cérébrale de type DLBCL. En effet, pour la patiente B aux antécédents de lymphome B diffus à grandes cellules et de maladie de Waldenström, les signes neurologiques pouvaient annoncer la rechute de l'une ou l'autre de ses pathologies. La synthèse d'IL-6 étant supérieure à celle en IL-10, le diagnostic s'oriente vers le diagnostic d'un syndrome de Bing Neel. Dans les localisations neuro-méningées secondaires des DLBCL (P99, P76), la synthèse d'IL-10 est supérieure à celle de l'IL-6. La MFI en IL-10 la plus élevée est d'ailleurs mesurée pour le patient P99 dont la biopsie de la masse rétropéritonéale est celle d'un DLBCL de type ABC. La synthèse d'IL-10 provient des cellules tumorales comme pour les LPSNC, qui sont des DLBCL pour plus de 95% d'entre eux (56). L'étude de Sasagawa et al. a également observé une élévation du taux d'IL-10 à la fois dans les localisations cérébrales primitives de type LPSNC mais également dans les localisations cérébrales secondaires des lymphomes diffus à grandes cellules B (118).

V Conclusion

Notre étude a confirmé l'apport d'une approche en cytométrie en flux dans le diagnostic des localisations cérébrales primitives et secondaires des lymphomes. L'immunophénotypage cellulaire s'adapte à la détection des localisations cérébrales leptoméningées qui sont plus fréquentes en cas de localisations secondaires. Dans notre étude, 78% des patients avec atteinte lymphomateuse neuroméningée ont un immunophénotypage cellulaire positif. Toutefois la sensibilité dans la détection des cellules lymphomateuses dépend étroitement du respect des conditions pré-analytiques : volume de prélèvement, délai d'acheminement. Dans les cas où la mise en évidence de cellules lymphomateuses en cytométrie en flux et en cytologie est en défaut, le dosage des cytokines a montré un intérêt complémentaire pour orienter le diagnostic de plusieurs patients. Il s'agit de patients présentant un lymphome primitif du SNC pour lesquels l'atteinte leptoméningée est difficile à objectiver et dont l'incidence est variable. Ce travail montre la possibilité de réaliser cette technique robuste en routine de laboratoire. Notre étude montre que la mesure multiplexe par méthode CBA de l'IL-8, de l'IL-10 et de l'IL-6 permet de déterminer un profil cytokinique évocateur d'un syndrome de Bing Neel ou d'un lymphome primitif du SNC même en l'absence d'immunophénotypage cellulaire positif. Cette technique doit être faite en deuxième intention après l'immunophénotypage cellulaire et s'apparente à la fois à une méthode de confirmation de l'immunophénotypage cellulaire mais aussi à une méthode diagnostique quand celui-ci est en défaut. La méthode CBA présente l'avantage, par rapport à l'ELISA, d'être multiplexe mais notre étude a montré que dans le panel cytokinique commercialisé, les trois cytokines IL-12p70, IL-1 β et TNF présentent peu d'intérêt diagnostique. Afin d'augmenter la spécificité de ce profil, ces cytokines pourraient être remplacées par d'autres cytokines ou chimiokines : CXCL13, la forme soluble du récepteur à l'interleukine 2.

Cette approche associant une exploration cellulaire au dosage de biomarqueurs solubles permet d'améliorer la sensibilité dans la détection des localisations neuroméningées des lymphomes qu'ils soient primitifs ou secondaires.

Chacune des deux approches renforce les arguments en faveur d'un diagnostic positif dans les formes où chaque technique prise isolément n'aurait pas permis d'affirmer le diagnostic.

Le dosage des cytokines apparait aussi relevant dans l'évaluation et le suivi des traitements des localisations cérébrales des lymphomes. En effet, plusieurs études ont montré que l'élévation du taux d'IL-10 au cours du suivi de patients avec un LPSNC a précédé la rechute du lymphome. Pour les patients sous Ibrutinib, la négativité des taux d'IL-6 et d'IL-10 montre l'action ciblée de l'Ibrutinib empêchant la sécrétion de cytokines et la prolifération des cellules lymphomateuses.

VI Bibliographie

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2375-90.
2. Bruneau J, Canioni D, Molina TJ. Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures: ce qui va changer dans la pratique quotidienne. *Rev Francoph Lab*. 2017;2017(488):39-48.
3. Gottenberg J, Mariette X. L'immunopathologie pour le praticien, chapitre 3 : le lymphocyte B de la théorie à la pratique.
4. Disponible sur: <http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/les-cellules-immunitaires-et-les-organes-lymphoïdes.html>
5. Feuillard J, Raphaël M. Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie*. 2000;6(5):345-59.
6. Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*. oct 2003;3(10):801-12.
7. Plonquet A. Différenciation lymphocytaire B normale. *Rev Francoph Lab*. 2013;2013(452):27-35.
8. Shaffer AL, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of Human B Cell Lymphomas. *Annu Rev Immunol*. 23 avr 2012;30(1):565-610.
9. Rabkin CS, Hirt C, Janz S, Dolken G. t(14;18) Translocations and Risk of Follicular Lymphoma. *JNCI Monogr*. 1 juill 2008;2008(39):48-51.
10. Galteland E, Sivertsen EA, Svendsrud DH, Smedshammer L, Kresse SH, Meza-Zepeda LA, et al. Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia*. déc 2005;19(12):2313-23.
11. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, et al. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1 avr 1994;83(7):1757-9.
12. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1982;79(24):7824-7.
13. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. avr 2005;5(4):251-62.
14. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1 juin 1997;89(11):3909-18.

15. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503–511.
16. Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 1 janv 2004;103(1):275-82.
17. Allman D, Jain A, Dent A, Maile RR, Selvaggi T, Kehry MR, et al. BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood*. 1996;87(12):5257–5268.
18. Jardin F. Intronic BCL-6 mutations are preferentially targeted to the translocated allele in t(3;14)(q27;q32) non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Blood*. 1 sept 2003;102(5):1872-6.
19. Tsuboi K, Iida S, Inagaki H, Kato M, Hayami Y, Hanamura I, et al. MUM1/IRF4 expression as a frequent event in mature lymphoid malignancies. *Leukemia*. mars 2000;14(3):449-56.
20. Gualco G, Weiss LM, Bacchi CE. MUM1/IRF4: A Review. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. juill 2010;18(4):301-10.
21. Geneviève F, Delisle V, Gardembas M, Foussard C, Gardais J, Zandecki M. Les hémopathies lymphoïdes chroniques de l'adulte: la leucémie lymphoïde chronique et la phase de dissémination des lymphomes à petites cellules. In: *Annales de Biologie Clinique* 2001; p. 403–15.
22. Kahl BS, Yang DT. Follicular lymphoma: evolving therapeutic strategies. *Blood*. 2016;127(17):2055–2063.
23. El-Ayoubi A, Wang JQ, Hein N, Talaulikar D. Role of plasma cells in Waldenström macroglobulinaemia. *Pathology (Phila)*. juin 2017;49(4):337-45.
24. ElSawa SF, Novak AJ, Ziesmer SC, Almada LL, Hodge LS, Grote DM, et al. Comprehensive analysis of tumor microenvironment cytokines in Waldenstrom macroglobulinemia identifies CCL5 as a novel modulator of IL-6 activity. *Blood*. 17 nov 2011;118(20):5540-9.
25. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 30 août 2012;367(9):826-33.
26. Poulain S, Boyle EM, Roumier C, Demarquette H, Wemeau M, Geffroy S, et al. *MYD88* L265P mutation contributes to the diagnosis of Bing Neel syndrome. *Br J Haematol*. nov 2014;167(4):506-13.
27. Hunter ZR, Yang G, Xu L, Liu X, Castillo JJ, Treon SP. Genomics, Signaling, and Treatment of Waldenström Macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 20 mars 2017;35(9):994-1001.

28. Jiang Y, Redmond D, Nie K, Eng KW, Clozel T, Martin P, et al. Deep sequencing reveals clonal evolution patterns and mutation events associated with relapse in B-cell lymphomas. *Genome Biol.* août 2014;15(8).
29. Melchardt T, Hufnagl C, Weinstock DM, Kopp N, Neureiter D, Tränkensschuh W, et al. Clonal evolution in relapsed and refractory diffuse large B-cell lymphoma is characterized by high dynamics of subclones. *Oncotarget.* 9 août 2016;7(32):51494-502.
30. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AFM, Esfahani MS, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med.* 9 nov 2016;8(364):364ra155-364ra155.
31. Citterio G, Reni M, Gatta G, Ferreri AJM. Primary central nervous system lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* mai 2017;113:97-110.
32. Sanson M. Les tumeurs cérébrales [Internet]. Disponible sur: <http://icm-institute.org/fr/tumeurs-cerebrales/>
33. Collège des Enseignants de Neurologie. Méningites, méningo-encéphalites chez l'adulte et l'enfant [Internet]. Disponible sur: <https://www.cen-neurologie.fr/deuxieme-cycle%20meningites-meningo-encephalites-ladulte-lenfant>
34. Galicia N, Díez P, Dégano RM, Guest PC, Ibarrola N, Fuentes M. Proteomic Biomarker Identification in Cerebrospinal Fluid for Leptomeningeal Metastases with Neurological Complications. Editeur. *Proteomic Methods in Neuropsychiatric Research*
35. Palmer AM. The role of the blood–CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis.* janv 2010;37(1):3-12.
36. Abbott NJ, Hughes CC, Revest PA, Greenwood J. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J Cell Sci.* 1992;103(1):23–37.
37. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. *Nat Rev Immunol.* 5 déc 2016;17(1):49-59.
38. Fletcher CD, Kahl BS. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of risks and prevention strategies in the post-rituximab era. *Leuk Lymphoma.* oct 2014;55(10):2228-40.
39. Ferreri AJM, Assanelli A, Crocchiolo R, Ciceri F. Central nervous system dissemination in immunocompetent patients with aggressive lymphomas: incidence, risk factors and therapeutic options. *Hematol Oncol.* juin 2009;27(2):61-70.
40. Murthy H, Anasetti C, Ayala E. Diagnosis and Management of Leukemic and Lymphomatous Meningitis. *Cancer Control.* 2017;24(1):33–42.

41. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, Kansara R, Villa D, Sehn LH, et al. CNS International Prognostic Index: A Risk Model for CNS Relapse in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol*. 10 sept 2016;34(26):3150-6.
42. Peñalver F-J, Sancho J-M, de la Fuente A, Olave M-T, Martín A, Panizo C, et al. Guidelines for diagnosis, prevention and management of central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma patients by the Spanish Lymphoma Group (GELTAMO). *Haematologica*. févr 2017;102(2):235-45.
43. Scott BJ, Douglas VC, Tihan T, Rubenstein JL, Josephson SA. A Systematic Approach to the Diagnosis of Suspected Central Nervous System Lymphoma. *JAMA Neurol*. 1 mars 2013;70(3):311.
44. Malkani RG, Tallman M, Gottardi-Littell N, Karpus W, Marszalek L, Variakojis D, et al. Bing–Neel syndrome: an illustrative case and a comprehensive review of the published literature. *J Neurooncol*. févr 2010;96(3):301-12.
45. Bing J, V.Neel A. Two Cases of Hyperglobulinaemia with Affection of the Central Nervous System on a Toxi-Infectious Basis. *Acta Medica Scandinavica*; 1936.
46. Simon L, Fitsiori A, Lemal R, Dupuis J, Carpentier B, Boudin L, et al. Bing-Neel syndrome, a rare complication of Waldenstrom macroglobulinemia: analysis of 44 cases and review of the literature. A study on behalf of the French Innovative Leukemia Organization (FILO). *Haematologica*. 1 déc 2015;100(12):1587-94.
47. Castillo JJ, D'Sa S, Lunn MP, Minnema MC, Tedeschi A, Lansigan F, et al. Central nervous system involvement by Waldenström macroglobulinaemia (Bing-Neel syndrome): a multi-institutional retrospective study. *Br J Haematol*. mars 2016;172(5):709-15.
48. Minnema MC, Kimby E, D'Sa S, Fornecker L-M, Poulain S, Snijders TJ, et al. Guideline for the diagnosis, treatment and response criteria for Bing-Neel syndrome. *Haematologica*. janv 2017;102(1):43-51.
49. Zetterberg H. Pathognomonic cerebrospinal fluid findings in Bing–Neel syndrome. *J Neurooncol*. sept 2011;104(2):615-615.
50. Dalakas MC, Papadopoulos NM. Paraproteins in the spinal fluid of patients with paraproteinemic polyneuropathies. *Ann Neurol*. 1984;15(6):590–593.
51. Hoffman S. Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999. *Neuro-Oncol*. 1 janv 2006;8(1):27-37.
52. Bauchet L, Rigau V, Mathieu-Daudé H, Figarella-Branger D, Hugues D, Palusseau L, et al. French brain tumor data bank: Methodology and first results on 10,000 cases. *J Neurooncol*. 23 juill 2007;84(2):189-99.
53. Villano JL, Koshy M, Shaikh H, Dolecek TA, McCarthy BJ. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. *Br J Cancer*. 25 oct 2011;105(9):1414-8.

54. Réseau Expert National pour les Lymphomes Oculo-Cérébraux. Lymphome cérébral primitif. 2015. Disponible sur: <https://www.reseauloc.org/lymphome-cerebral-primitif>
55. Camilleri-Broet S. A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood*. 1 janv 2006;107(1):190-6.
56. Patrick LB, Mohile NA. Advances in Primary Central Nervous System Lymphoma. *Curr Oncol Rep*. déc 2015;17(12).
57. Bataille B, Delwail V, Menet E, Vandermarcq P, Ingrand P, Wager M, et al. Primary intracerebral malignant lymphoma: report of 248 cases. *J Neurosurg*. févr 2000;92(2):261-6.
58. Haldorsen IS, Espeland A, Larsson E-M. Central nervous system lymphoma: characteristic findings on traditional and advanced imaging. *AJNR Am J Neuroradiol*. juill 2011;32(6):984-92.
59. Zimmerman HM. Malignant lymphomas of the nervous system. *Acta Neuropathol Suppl*. 1975;Suppl 6:69-74.
60. Balmaceda C, Gaynor JJ, Sun M, Gluck JT, DeAngelis LM. Leptomeningeal tumor in primary central nervous system lymphoma: Recognition, significance, and implications. *Ann Neurol*. 1995;38(2):202-209.
61. Réseau Expert National pour les Lymphomes Oculo-Cérébraux. Lymphome intra-oculaire primitif. 2015. Disponible sur: <https://www.reseauloc.org/lymphome-intra-oculaire-primitif>
62. Carpentier A., Dhermain F., Le Rhun E. Référentiel ANOCEF métastases cérébrales de l'adulte. 2014.
63. Perske C, Nagel I, Nagel H, Strik H. CSF cytology-the ongoing dilemma to distinguish neoplastic and inflammatory lymphocytes. Michael CW, éditeur. *Diagn Cytopathol*. août 2011;39(8):621-6.
64. Baraniskin A, Schroers R. Modern cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma of the CNS. *CNS Oncol*. janv 2014;3(1):77-85.
65. Van Krieken JHJM, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, et al. Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: — Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia*. févr 2007;21(2):201-6.
66. Adam C, Mokhtari K. Tumeurs du système nerveux central. Classifications histologiques et topographiques, épidémiologie. *EMC - Neurol*. janv 2011;8(1):1-9.
67. Godeau B. Méningoencéphalites — Atteintes neurologiques graves au cours des maladies systémiques. *Réanimation*. janv 2011;20(S2):430-6.

68. Pr J.Honorat. Syndromes neurologiques paranéoplasiques et hématologie. Journées annuelles de l'AIH; 2016; Nice.
69. Tamara L. Wagner, Cory L. Ahonen, Aimee M. Couture. Modulation of TH1 and TH2 Cytokine Production with the Immune Response Modifiers, R-848 and Imiquimod. 1999;(191):10-9.
70. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol. juill 2000;85(1):9-21.
71. Tim R. Mosmann, Subash Sad. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. 138. 1996;17(3).
72. Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. Cancers. 13 oct 2011;3(4):3856-93.
73. UniProt. Interleukine-1bêta humaine [Internet]. Disponible sur: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01584>
74. Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A. From The Cover: Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 secretion: Implications for inflammatory processes. Proc Natl Acad Sci. 29 juin 2004;101(26):9745-50.
75. Van Damme J, De Ley M, Opdenakker G, Billiau A, De Somer P, Beeumen JV. Homogeneous interferon-inducing 22K factor is related to endogenous pyrogen and interleukin-1. Nature. mars 1985;314(6008):266-8.
76. UniProt. Facteur de nécrose tumorale humain [Internet]. Disponible sur: <http://www.uniprot.org/uniprot/P01375>
77. Ichinose Y, Tsao JY, Fidler IJ. Destruction of tumor cells by monokines released from activated human blood monocytes: evidence for parallel and additive effects of IL-1 and TNF. Cancer Immunol Immunother Cll. 1988;27(1):7-12.
78. Hamaï A, Muret J, Cavalcanti A, Bonvalot S, Chouaïb S. Le facteur de nécrose tumorale: de la biologie à la thérapie oncologique. Hématologie. juill 2009;(4):291-304.
79. Kubly J, Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Sautès-Fridman C. Immunologie [le cours de Janis Kubly. 7e édition. Paris: Dunod; 2014. (Sciences sup. Sciences de la vie Sciences Sup).
80. Trinchieri G. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. Annu Rev Immunol. avr 1995;13(1):251-76.
81. UniProt. Interleukine-8 humaine [Internet]. Disponible sur: <http://www.uniprot.org/uniprot/P10145>

82. UniProt. Interleukine-6 humaine [Internet]. Disponible sur: <http://www.uniprot.org/uniprot/P05231>
83. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* oct 2010;21(5):331-44.
84. UniProt. Interleukine-10 humaine [Internet]. Disponible sur: <http://www.uniprot.org/uniprot/P22301>
85. El Hentati F-Z, Iobagiu C, Lambert C. Cytométrie et ses applications en immunologie clinique. *Rev Francoph Lab.* 2009;2009(410):23-32.
86. Depince-Berger A-E, Aanei C, Iobagiu C, Jeraiby M, Lambert C. New tools in cytometry. *Morphologie.* déc 2016;100(331):199-209.
87. Hall WA. The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer.* 1 mai 1998;82(9):1749-55.
88. Josephson SA, Papanastassiou AM, Berger MS, Barbaro NM, McDermott MW, Hilton JF, et al. The diagnostic utility of brain biopsy procedures in patients with rapidly deteriorating neurological conditions or dementia. *J Neurosurg.* janv 2007;106(1):72-5.
89. Quijano S, López A, Manuel Sancho J, Panizo C, Debén G, Castilla C, et al. Identification of Leptomeningeal Disease in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma: Improved Sensitivity of Flow Cytometry. *J Clin Oncol.* 20 mars 2009;27(9):1462-9.
90. Manenq, Christine. Evaluation de la détection des cellules métastatiques médullaires de neuroblastome par cytométrie en flux multiparamétrique. Université de Lorraine; 2016.
91. Komada Y, Zhang XL, Zhou YW, Inaba H, Deguchi T, Azuma E, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and bone marrow for tumor cells in patients with neuroblastoma. *Cancer.* 1 févr 1998;82(3):591-9.
92. Ladisch S, Chang F, Li R, Cogen P, Johnson D. Detection of medulloblastoma and astrocytoma-associated ganglioside GD3 in cerebrospinal fluid. *Cancer Lett.* 25 nov 1997;120(1):71-8.
93. Ferreira-Facio CS, Milito C, Botafogo V, Fontana M, Thiago LS, Oliveira E, et al. Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. Aziz SA, éditeur. *PLoS ONE.* 5 mars 2013;8(3):e55534.
94. Glantz MJ, Cole BF, Glantz LK, Cobb J, Mills P, Lekos A, et al. Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results. *Cancer.* 15 févr 1998;82(4):733-9.
95. Benouaich Amiel Alexandra, Delannes Martine, Espagno Christian. *Oncomip-Référentiel Régional de Prise en Charge-Neurologie.* 2011.

96. Finn WG, Peterson LC, James C, Goolsby CL. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol.* sept 1998;110(3):341-6.
97. Bromberg JEC, Breems DA, Kraan J, Bikker G, van der Holt B, Smitt PS, et al. CSF flow cytometry greatly improves diagnostic accuracy in CNS hematologic malignancies. *Neurology.* 15 mai 2007;68(20):1674-9.
98. Ahluwalia MS, Wallace PK, Peereboom DM. Flow cytometry as a diagnostic tool in lymphomatous or leukemic meningitis: Ready for prime time? *Cancer.* 1 avr 2012;118(7):1747-53.
99. Benevolo G, Stacchini A, Spina M, Ferreri AJM, Arras M, Bellio L, et al. Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. *Blood.* 18 oct 2012;120(16):3222-8.
100. Alvarez R, Dupuis J, Plonquet A, Christov C, Copie-Bergman C, Hemery F, et al. Clinical relevance of flow cytometric immunophenotyping of the cerebrospinal fluid in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol.* mai 2012;23(5):1274-9.
101. Richens JL, Urbanowicz RA, Metcalf R, Corne J, O'Shea P, Fairclough L. Quantitative Validation and Comparison of Multiplex Cytokine Kits. *J Biomol Screen.* juin 2010;15(5):562-8.
102. Castillo L, MacCallum DM. Cytokine Measurement Using Cytometric Bead Arrays. In: Brand AC, MacCallum DM, éditeurs. *Host-Fungus Interactions.* Totowa, NJ: Humana Press; 2012; p. 425-34.
103. Moncunill G, Campo JJ, Dobaño C. Quantification of multiple cytokines and chemokines using cytometric bead arrays. *Cytokine Bioassays Methods Protoc.* 2014;65-86.
104. Whitcup SM, Stark-Vancs V, Wittes RE, Solomon D, Podgor MJ, Nussenblatt RB, et al. Association of interleukin 10 in the vitreous and cerebrospinal fluid and primary central nervous system lymphoma. *Arch Ophthalmol.* 1997;115(9):1157-1160.
105. Kim R, Costopoulos M, Choquet S, Maloum K, Algrin C, Hoang-Xuan K, et al. To Dose or Not to Dose: Are IL-10 and IL-6 Accurate Biomarkers to Detect Leptomeningeal Involvement in Small B-Cell Lymphoproliferation? *Blood.* 3 déc 2015;126(23):3878.
106. Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M, Kawamura A, Tanaka H, Mizukawa K, et al. Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Neuro-Oncol.* 1 mars 2012;14(3):368-80.
107. Nguyen-Them L, Costopoulos M, Tanguy M-L, Houillier C, Choquet S, Benanni H, et al. The CSF IL-10 concentration is an effective diagnostic marker in

- immunocompetent primary CNS lymphoma and a potential prognostic biomarker in treatment-responsive patients. *Eur J Cancer*. juill 2016;61:69-76.
108. Song Y, Zhang W, Zhang L, Wu W, Zhang Y, Han X, et al. Cerebrospinal Fluid IL-10 and IL-10/IL-6 as Accurate Diagnostic Biomarkers for Primary Central Nervous System Large B-cell Lymphoma. *Sci Rep*. 7 déc 2016;6:38671.
 109. Stemcell Technologies. Cytokines Human Recombinant Interleukin 6 [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://www.stemcell.com/human-recombinant-il-6.html>
 110. Bielekova B, Komori M, Xu Q, Reich DS, Wu T. Cerebrospinal Fluid IL-12p40, CXCL13 and IL-8 as a Combinatorial Biomarker of Active Intrathecal Inflammation. Forsthuber T, éditeur. *PLoS ONE*. 30 nov 2012;7(11):e48370.
 111. Abdi K. IL-12: the role of p40 versus p75. *Scand J Immunol*. juill 2002;56(1):1-11.
 112. Klinke DJ. The ratio of P40 monomer to dimer is an important determinant of IL-12 bioactivity. *J Theor Biol*. mai 2006;240(2):323-35.
 113. Elsawa SF. B-lymphocyte stimulator (BLyS) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 1 avr 2006;107(7):2882-8.
 114. Stoeck K, Bodemer M, Zerr I. Pro- and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Creutzfeldt–Jakob disease. *J Neuroimmunol*. mars 2006;172(1-2):175-81.
 115. Tamai M, Kobayashi N, Shimada K, Oka N, Takahashi M, Tanuma A, et al. Increased interleukin-1 β and basic fibroblast growth factor levels in the cerebrospinal fluid during human herpesvirus-6B (HHV-6B) encephalitis. *Biochem Biophys Res Commun*. mai 2017;486(3):706-11.
 116. Ahle G, Harzallah I, Le Garff-Tavernier M, Costopoulos M, Hurstel R, Drénou B, et al. Plus que jamais ! L'importance du LCR pour le diagnostic de lymphome oculocérébral. *Rev Neurol (Paris)*. mars 2017;173:S81-2.
 117. Rubenstein JL, Wong VS, Kadoch C, Gao H-X, Barajas R, Chen L, et al. CXCL13 plus interleukin 10 is highly specific for the diagnosis of CNS lymphoma. *Blood*. 6 juin 2013;121(23):4740-8.
 118. Sasagawa Y, Akai T, Tachibana O, Iizuka H. Diagnostic value of interleukin-10 in cerebrospinal fluid for diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *J Neurooncol*. janv 2015;121(1):177-83.
 119. Fischer L, Martus P, Weller M, Klasen HA, Rohden B, Röth A, et al. Meningeal dissemination in primary CNS lymphoma Prospective evaluation of 282 patients. *Neurology*. 2008;71(14):1102–1108.

120. Taylor JW, Flanagan EP, O'Neill BP, Siegel T, Omuro A, DeAngelis L, et al. Primary leptomeningeal lymphoma International Primary CNS Lymphoma Collaborative Group report. *Neurology*. 2013;81(19):1690–1696.
121. Nguyen L, Costopoulos M, Tanguy M-L, Houillier C, Choquet S, Bennani H, et al. IL10 and IL10:IL6 Ratio in CSF Is Useful at Diagnosis but Also in the Assessment of Therapeutic Response in Patients with Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL). *Blood*. 4 déc 2014;124(21):1619.
122. Frustaci AM, Rusconi C, Picardi P, Veronese S, Montillo M, Cairoli R, et al. Bing Neel Syndrome in a Previously Untreated Patient With Waldenström's Macroglobulinemia: Contribution of MYD88 L265P Mutation on Cerebrospinal Fluid. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. janv 2016;16(1):e7–9.

VII Table des illustrations

Figure 1 : Schéma de la différenciation lymphocytaire B avec les principaux marqueurs membranaires (3).	7
Figure 2 : Organisation structurale d'un ganglion lymphatique (4)	8
Figure 3 : Différenciation lymphocytaire B au sein des organes lymphoïdes périphériques (6)	9
Figure 4 : Origine cellulaire des néoplasies lymphoïdes B (13)	11
Figure 5 : Algorithme de Hans (16)	13
Figure 6 : Voie de signalisation impliquant la molécule adaptatrice MYD88 et la sécrétion cytokinique associée (27)	15
Figure 7 : Voies de signalisation à l'origine de la survie de la cellule lymphomateuse (8)	16
Figure 8 : Représentation anatomique du système nerveux central par Terese Winslow pour l'Institut National du Cancer (INCA), 2010.	17
Figure 9 : Disposition générale des enveloppes protectrices du cerveau	18
Figure 10 : Neuro-inflammation (37)	20
Figure 11 : Recommandations pratiques pour la réalisation d'une PL et pour la prise en charge prophylactique ou thérapeutique chez les patients atteints d'un DLBCL selon les résultats de la cytologie (CC) et de la cytométrie en flux (FCM) du LCR.	24
Figure 12 : Cytologie à partir de la cytocentrifugation du LCR d'une patiente avec suspicion de lymphome cérébral, après coloration au MGG.	28
Figure 13 : Principes de fonctionnement d'un cytomètre en flux (86)	34
Figure 14 : Principe de dosage des cytokines par la méthode Cytometric Bead Array.	35
Figure 15 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P91	43
Figure 16 : Histogramme biparamétrique représentant la structure versus la taille des billes de standardisation	49
Figure 17 : Visualisation de la séparation des six populations de billes dans le canal FL6	50
Figure 18 : Histogramme biparamétrique FL2 versus FL6 pour le point de gamme à 156,25 pg/mL	51

Figure 19 : Histogramme biparamétrique FL2 versus FL6 pour le point de gamme à 5 pg/mL.....	51
Figure 20 : Détection en FL2 des billes de standardisation marquées par la phycoérythrine et utilisées comme contrôle positif.	52
Figure 21 : Gains et voltages du protocole utilisé pour la méthode Cytometric Bead Array (CBA)	53
Figure 22 : Courbe de calibration de l'IL-8 obtenue selon les préconisations du fournisseur du kit (Modèle mathématique « Quadratic », à partir du logiciel FCAP Array™)	54
Figure 23 : Courbe de calibration de l'IL-8 selon les modifications apportées aux voltages des canaux (Modèle mathématique « Quadratic», à partir du logiciel FCAP Array™)	55
Figure 24 : Comparaison des moyennes de fluorescence (MFI) obtenues pour le standard 8 à la concentration de 156,25 pg/mL en fonction du mode d'incubation et de l'agitation	56
Figure 25 : Courbes de calibration de la nouvelle gamme d'étalonnage obtenues avec l'incubation en deux temps avec agitation. Equation de la courbe :.....	58
Figure 26 : Représentation des moyennes de l'intensité de fluorescence (MFI) obtenues pour l'IL-8 pour les deux gammes d'étalonnage de chaque kit	59
Figure 27 : Répétabilité des MFI mesurées pour l'IL-10 pour trois échantillons de patients testés en double, à partir du logiciel FCAP Array™	60
Figure 28 : Reproductibilité des MFI mesurées pour les six cytokines dans le LCR P70 dans deux expériences différentes, à partir du logiciel FCAP Array™	60
Figure 29 : Représentation des MFI obtenues pour des concentrations théoriques en IL-6 de 100 pg/mL et de 10 pg/mL.....	61
Figure 30 : Correspondance entre la moyenne de fluorescence (MFI) mesurée en IL-6 et la concentration en pg/mL après extrapolation sur la gamme d'étalonnage..	62
Figure 31 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P76.....	65
Figure 32 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P47	67
Figure 33 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P38bis	68

Figure 34 : Histogrammes biparamétriques issus de l'analyse en cytométrie en flux du LCR P74.....	70
Figure 35 : Représentation des moyennes de fluorescence (MFI) obtenues pour l'IL-1 β dans tous les prélèvements étudiés.....	72
Figure 36 : Représentation des MFI obtenues pour le TNF dans tous les prélèvements étudiés	73
Figure 37 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-12p70 dans tous les prélèvements étudiés	73
Figure 38 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-8 dans tous les prélèvements étudiés	74
Figure 39 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-6 dans tous les prélèvements étudiés	74
Figure 40 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-10 dans tous les prélèvements étudiés	75
Figure 41 : Représentation en boîtes à moustaches des valeurs de MFI en IL-10 dans les groupes de patients selon le résultat du LCR en cytométrie en flux.....	76
Figure 42 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-10 dans les groupes de patients selon le résultat du LCR en cytométrie en flux.....	77
Figure 43 : Représentation en boîtes à moustaches des valeurs de MFI en IL-6 dans les groupes de patients selon le résultat du LCR en cytométrie en flux.....	79
Figure 44 : Représentation des MFI obtenues pour l'IL-10 et l'IL-6 dans le groupe des patients atteints de la maladie de Waldenström	80

Tableau 1 : Classification des tumeurs du tissu lymphoïde B selon l'OMS 2016 (1).	6
Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés pour l'immunomarquage des cellules du LCR	40
Tableau 3 : Composition des tubes utilisés pour l'immunophénotypage des LCR	41
Tableau 4 : Les différentes concentrations de la gamme d'étalonnage selon les préconisations fournisseur.	45
Tableau 5 : Correspondance entre numéro du standard (Std) et concentration de la gamme d'étalonnage.	46
Tableau 6 : Nouvelle gamme d'étalonnage	47
Tableau 7 : Evaluation du gain obtenu sur la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI) dans le cas d'une incubation en deux temps avec agitation	56
Tableau 8 : Comparaison des MFI obtenues pour le standard 1 en fonction du mode d'incubation et de l'agitation	57
Tableau 9 : Résultats des immunophénotypages cellulaires positifs avec les pourcentages des différentes populations cellulaires identifiées dans le LCR.	64
Tableau 10 : Tableau de contingence pour l'étude de la répartition du taux d'IL-10 en fonction de la pathologie : test exact de Fisher.	79
Tableau 11 : Caractéristiques des patients suivis pour un syndrome de Bing Neel	81
Tableau 12 : Caractéristiques des patients avec suspicion d'un syndrome de Bing Neel	83

VIII Annexes

1 Annexe I : Valeurs des MFI de chaque point de la gamme d'étalonnage obtenues pour chacun des kits.

Expérience 14								
Concentrations (pg/mL)	0	2,5	5	10	19,53	39,06	78,125	156,25
Cytokines								
IL-1β	31,52	39,82	47,25	60,78	85,54	131,73	214,1	427,95
TNF	28,04	31,52	33,57	41,28	53,59	74,74	115,1	223,95
IL-12p70	31,8	36,4	39,11	50,32	67,1	98,78	166,43	298,64
IL-8	33,27	40,91	47,25	62,44	84,78	130,55	221,94	409,13
IL-6	28,81	36,07	41,28	54,56	78,18	121,48	210,28	384,17
IL-10	43,18	51,69	58,1	74,08	101,48	156,28	272,95	503,16

Expérience 18								
Concentrations (pg/mL)	0	2,5	5	10	19,53	39,06	78,125	156,25
Cytokines								
IL-1β	29,07	36,73	43,97	56,05	79,6	127,07	210,28	416,56
TNF	25,63	29,33	33,27	40,55	52,16	78,89	125,93	230,07
IL-12p70	27,29	32,09	37,73	46,82	63,57	98,78	153,49	285,5
IL-8	30,68	38,07	44,36	57,58	79,6	129,38	214,1	404,84
IL-6	26,09	32,97	39,82	53,11	74,74	124,81	208,4	380,73
IL-10	39,47	47,67	55,05	71,46	101,48	163,47	268,06	503,16

2 Annexe II : Répétabilité et reproductibilité des moyennes de l'intensité de fluorescence (MFI) mesurées dans les échantillons patients

2.1 Répétabilité des MFI mesurées pour les six cytokines dans les trois échantillons de patients testés en double, à partir du logiciel FCAP ArrayTM

Cytokines	Prélèvements	P18	P18'	P23	P23'	P57	P57'
IL-1 β		30.96	30.68	38.07	32.67	31.24	33.87
TNF		27.29	26.57	29.86	25.86	27.29	28.29
IL-12p70		29.6	28.81	33.27	29.07	30.13	31.8
IL-8		295.96	282.95	164.94	157.69	635.72	630.03
IL-6		137.79	127.07	45.58	40.55	137.79	142.83
IL-10		42.41	42.03	44.76	41.66	42.8	44.76

2.2 Reproductibilité des MFI mesurées pour les six cytokines dans le LCR P70 dans deux expériences différentes, à partir du logiciel FCAP Array™

Prélèvement Cytokines	P70	P70'
IL-1 β	31.8	32.09
TNF	27.29	27.05
IL-12p70	30.68	30.68
IL-8	796.02	670.97
IL-6	67.7	64.73
IL-10	46.4	43.97

3 Annexe III : Reconstitution IL-6 (20 μ g)

Stockage : congélation à -80°C

Reconstitution : centrifuger le flacon avant de l'ouvrir (500 tours/min pendant 5 minutes). Dissoudre le produit dans une solution d'acide chlorhydrique 10 mM contenant 0,1% de sérum albumine bovine (BSA) à au moins 0,1 mg/mL en faisant glisser la solution le long des parois du flacon. Ne pas vortexer. Conserver à 2-8°C pendant un mois ou de -20 à -80°C jusqu'à trois mois. Eviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

1) Etape préliminaire : préparation de la solution HCl 10mM :

200 μ L HCl 1M + 19,780 mL H₂O + 20 μ L BSA (Solution 1)

2) Solubilisation des 20 μ g d'IL-6 dans 200 μ L de la solution 1 (Solution 2 à 0,1 μ g/ μ L ou 100 μ g/mL)

Aliquots congelés : 160 μ L de la solution 2 (2x50 μ L, 1x60 μ L)

Dilutions de l'IL-6 reconstituée (Stemcell 20 μ g)

Prendre 50 μ L d'un aliquot congelé de la solution mère à 0,1 μ g/ μ L et réaliser l'homogénéisation de la solution. Veillez à attendre quelques minutes entre chaque dilution et à bien homogénéiser les solutions.

1) Mettre les 50 μ L de solution mère dans 450 μ L d'*Assay Diluent G* (Solution A à 10 μ g/mL)

2) Mettre 20 μ L de solution A dans 180 μ L d'*Assay Diluent G* (Solution B à 1 μ g/mL)

3) Mettre 20 μ L de solution B dans 180 μ L d'*Assay Diluent G* (Solution C à 0,1 μ g/mL = 100ng/mL)

- 4) Mettre 20 μ L de solution C dans 180 μ L d'Assay *Diluent G* (Solution D à 10ng/mL)
- 5) Mettre 20 μ L de solution D dans 180 μ L d'Assay *Diluent G* (Solution E à 1ng/mL)
- 6) Mettre 20 μ L de solution E dans 180 μ L d'Assay *Diluent G* (Solution F à 0,1ng/mL = 100pg/mL)
- 7) Mettre 20 μ L de solution F dans 180 μ L d'Assay *Diluent G* (Solution G à 10pg/mL)

4 Annexe IV : Données clinico-biologiques relatives aux patients atteints de la maladie de Waldenström

Prélèvement	Date du prélèvement du LCR	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Résultat de la CMF du LCR	Résultat de la CMF du sang	Cytologie du LCR	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)
P69	06/01/2017	12/04/1946	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en décembre 2016 sur BOM. Suivi depuis 2012 pour une MGUS avec un pic monoclonal IgM Kappa	Suspicion d'un syndrome de Churg-Strauss ou de Bing Neel associé à une macroglobulinémie de Waldenström devant une atteinte neurologique centrale	CMF NEGATIVE : lymphocytes en quantité insuffisante	CMF POSITIVE : présence de 4,8% de lymphocytes B CD5-, monotypiques Kappa.	Non réalisée	5	21	39.47	31.52	162.00	29.86	27.29	25.40
P105	06/04/2017	14/11/1937	F	Maladie de Waldenström diagnostiquée le 18/11/2009 sur biopsie ganglionnaire et début du traitement le 15/12/2010	Présence de myoclonies diffuses atypiques des 4 membres. Suspicion de syndrome de Bing Neel.	CMF POSITIVE : présence dans le LCR de 60% de cellules lymphomateuses B matures CD5- CD10-, monotypiques Kappa.	CMF NEGATIVE : lymphopénie B profonde	Le liquide cytocentrifugé et coloré par le MGG comporte de nombreux leucocytes : polynucléaires neutrophiles (81%), des lymphocytes ou plasmocytes (13%) et macrophages (6%). Inflammation marquée. Absence de cellule carcinomateuse. (H : 3, L : 470)	5	20	1005.74	1005.74	1005.74	37.06	32.09	40.91
B	10/12/2013	18/10/1936	F	Maladie de Waldenström diagnostiquée en septembre 1999. En 2001, transformation histologique en lymphome B diffus à grandes cellules traitée par 4 cures de R-CHOP avec obtention d'une réponse complète.	Exploration de troubles de l'équilibre et douleurs sacro-iliaques irradiant dans les membres inférieurs	CMF POSITIVE : présence de 20% de lymphocytes B CD5-, CD38-, CD138 faible, monotypiques Kappa.	CMF POSITIVE : présence de 10% de lymphocytes B monotypiques kappa faible intensité, CD19 forte intensité, au sein d'une population lymphoïde B majoritairement normale.	70 éléments avec 96% de lymphocytes et 2% de plasmocytes.	5	21	129.38	1005.74	1005.74	30.68	28.81	26.57
P104	04/11/2015	08/09/1945	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en 2007 (MGUS IgM connue depuis 1996) sans atteinte neurologique centrale au diagnostic	Déficit neurologique de plus de 4h30. Paresthésies chroniques depuis 3 mois. Anomalies de la démarche et de la motilité.	CMF POSITIVE : présence de 35% de lymphocytes B monotypiques Kappa	CMF POSITIVE : lymphopénie globale, prédominant sur les lymphocytes B. Néanmoins, présence de 2% de lymphocytes B monotypiques kappa	Le liquide cytocentrifugé et coloré par le MGG comporte des lymphocytes et cellules lymphoplasmocytaires (73%), des macrophages (13%) et des cellules lymphoïdes d'un peu plus grande taille, à noyau dense et plus irrégulier, difficile à classer. (H : 0,2, L : 24,8) Conclusion : Présence, sur un fond lymphoplasmocyttaire, de quelques cellules lymphoïdes de taille moyenne à grande, peu atypiques mais de classement difficile.	5	21	57.58	275.41	377.32	30.68	29.86	26.57
D	02/12/2014	07/07/1938	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en avril 2011 sous surveillance simple avec un taux d'IgM à 57.8g/L.	Neuropathie axonale sensitivomotrice	CMF POSITIVE : présence de 10% de lymphocytes B monotypiques Kappa	CMF NEGATIVE : absence d'anomalie de répartition des populations lymphocytaires. Absence de monotypie des lymphocytes B.	Non réalisée	5	21	43.97	32.67	174.09	31.24	29.60	26.33
E	01/11/2016	29/04/1940	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée fin avril 2010.	Persistance des douleurs et de la faiblesse des membres inférieurs apparues en juillet 2015, augmentation progressive du pic IgM kappa à l'EPS.	CMF POSITIVE : présence de 40% de lymphocytes B CD5-, CD10-, monotypiques Kappa	Examen non réalisé	Hématies 14/mm ³ et leucocytes 230/mm ³ : 92% de lymphocytes et 8% de cellules mononucléés	5	21	91.92	689.33	894.76	30.41	29.86	27.05
A	24/11/2014	24/05/1950	F	Maladie de Waldenström diagnostiquée en 2006.	Suspicion de rechute du syndrome de Bing Neel diagnostiqué en juillet 2013	CMF NEGATIVE : lymphocytes en quantité insuffisante	Examen non réalisé	Non réalisée	5	21	45.17	65.90	306.81	30.41	29.60	27.05
P74	16/01/2017	09/05/1975	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en décembre 2010 avec localisation neuro-méningée présente au diagnostic	Suivi d'un syndrome de Bing Neel traité par ibrutinib (3 gélules par jour) depuis octobre 2015.	CMF POSITIVE : présence de 70% de lymphocytes B monotypiques Kappa	CMF NEGATIVE : absence d'anomalie de répartition des populations lymphocytaires. Absence de monotypie des lymphocytes B.	Hématologie : absence de blastes sur 8 cellules observées. Anatomopathologie : non réalisée	4	15	42.41	36.73	55.05	30.68	30.41	28.04
P104bis	06/04/2017	08/09/1945	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en 2007 (MGUS IgM connue depuis 1996) sans atteinte neurologique centrale au diagnostic	Contrôle du syndrome de Bing Neel sous ibrutinib depuis novembre 2015.	CMF POSITIVE : présence d'environ 8% de lymphocytes B CD5-, CD10-, monotypiques Kappa	CMF NEGATIVE : lymphopénie B profonde	Non réalisée	5	20	42.03	39.82	170.98	31.52	28.81	26.57

5 Annexe V : Examens complémentaires réalisés sur le LCR des patients atteints de la maladie de Waldenström

Prélèvement	Protéïnorachie (g/L)	Dosage des chaînes légères libres kappa (CLL) dans le LCR	Dosage des chaînes légères libres lambda (CLL) dans le LCR	Rapport kappa/lambda CLL LCR	Immunofixation de l'IgM monoclonale dans le LCR
P69	0,27	0,6	/	/	Négative
P105	5,43	46,7	2,56	18,2	Positive
B	3	207,5	9,59	21,6	Positive
P104	2,2	37,3	1,1	33,9	Positive
D	0,8	21,4	<0,5	>42,8	Positive
E	4,96	163,27	2,68	60,9	Positive
A	1,63	5,2	<4,7	>1,11	Non réalisée
P74	0,21	<0,37	<0,43	/	Négative
P104bis	0,55	2,83	4,13	0,68	Négative

6 Annexe VI : Données cliniques et résultats biologiques de l'ensemble des patients de l'étude

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
1	P62	LNH	29/11/2016	29/06/1959	M	Lymphome B diffus à grandes cellules intra-vasculaire (Première cure R-CHOP le 25 et 26/11/2016 et corticothérapie 1mg/kg depuis le 18/11/2016)	Bilan d'extension du lymphome, absence d'envahissement médullaire, diagnostic posé sur des biopsies cutanées devant des tégangiectasies.	CMF NEGATIVE	Négative	4	15	43.18	53.59	894.8	33.6	29.07	27.3	0.81	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères	Présence de quelques hématies et de rares cellules lymphoïdes de petite taille, dépourvues d'atypie et très rares macrophages. Absence de cellule suspecte de malignité. (H : 9, L : 2,8)
2	P80	LNH	27/01/2017	07/07/1954	M	Lymphome diffus à grandes cellules B non GC testiculaire (diagnostiqué en 01/2017 sur pièce d'orchidectomie droite)	Première cure de chimiothérapie R-CHOP administrée en urgence le 26/01/2017	CMF NEGATIVE	Négative	4	15	40.18	44.76	435.7	32.1	28.55	25.9	0.90	Lymphocytes en quantité insuffisante pour établir l'immunophénotype	Laboratoire Hématologie : absence de blastes sur deux cellules observées Anatomopathologie : non réalisé.
3	P83	LNH	02/02/2017	13/12/1957	F	Lymphome B à grandes cellules t(8;14)(01/2017) Prise en charge telle qu'un lymphome de Burkitt devant la t(8 ;14). ATCD carcinome canalaire infiltrant du sein gauche en 2007.	Bilan d'extension du lymphome, première cure de chimiothérapie COP le 27/01/2017, première injection intrathécale de MTX le 03/02	CMF NEGATIVE	Positive	4	17	50.32	439.66	1006	31.5	29.07	27.1	0.11	Nombre d'événements insuffisant. Immunophénotypage non interprétable	Laboratoire Hématologie : 2% de cellules difficiles à classer : grandes cellules à cytoplasme basophile et à chromatine assez mature
4	P85	LNH	07/02/2017	22/09/1950	M	Lymphome diffus à grandes cellules B de type non GC (07/2015)	Suspicion de rechute intra-oculaire. Uvéite et sclérite à l'examen ophtalmologique fortement suspects de localisation lymphomateuse intraoculaire.	CMF NEGATIVE	Négative	4	16	43.18	36.07	153.5	36.1	30.96	27.5	1.20	Nombre d'événement insuffisant. Immunophénotypage des lymphocytes du LCR non interprétable.	Absence de cellule atypique. (H : 0,2, L : 0,4)
5	P93	LNH	13/03/2017	15/07/1976	M	Lymphome diffus à grandes cellules B de type non GC (03/2016 diagnostic devant des troubles urinaires à type de dysurie, pollakiurie et douleurs hypogastriques, associés à une polyadénopathie sus et sous-diaphragmatique.) en réponse complète, suivi.	09/03/2017 venu aux urgences céphalées depuis une semaine paralysie faciale (4 mars prednisolone 20 mg prescrite). Suspicion d'une localisation neuroméningée.	CMF NEGATIVE	Négative	5	19	42.03	40.91	135.3	32.4	30.41	28	1.03	Lymphocytes B en quantité insuffisante pour détecter une éventuelle monotypie. Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T sans particularité	Absence de cellule atypique. (H : 2,8, L : 0,8)
6	P102	LNH	31/03/2017	31/08/1967	M	Découverte récente (sur état de mal épileptique) d'un syndrome immunodéficitaire acquis.	Etat de mal épileptique. Syndrome cérébelleux avec lésions en cocarde faisant évoquer un lymphome ou toxoplasmose cérébrale.	CMF NEGATIVE	Négative	5	21	44.36	360.72	560.5	32.4	31.52	28.8	0.12	Contamination sanguine importante. L'immunophénotypage des lymphocytes du LCR n'est pas interprétable.	Absence de cellule atypique. (H : 61,2, L : 4)
7	P22	LNH	07/03/2016	28/12/1945	M	Lymphome du manteau diagnostiqué en juin 2012. En novembre 2015, la pathologie est considérée en rémission complète.	Troubles de l'équilibre d'installation sub-aiguë après sevrage alcoolique brutal (1bouteille de vin/jour). Origine alcoolocarentielle et vasculaire	CMF NEGATIVE	Négative	4	17	42.41	65.31	212.2	32.1	30.41	27.8	0.65	Nombre d'événements insuffisants. Immunophénotypage des éléments du LCR non interprétable.	Absence de cellule anormale.
8	P76	LNH	18/01/2017	21/04/1968	F	Lymphome diffus à grandes cellules B de phénotype GC, stade IV Aa (péritonéal, rénal, hépatique, osseux), IPlaa à 3, diagnostic en juillet 2016. La patiente n'a pas reçu de prophylaxie neuroméningée.	Deficit sensitif du membre inférieur droit et du pied gauche depuis 1 semaine et lombalgies. Syndrome de la queue de cheval.	CMF POSITIVE	Forte suspicion	4	17	74.74	57.58	318	31.2	29.07	26.1	1.30	Présence d'une population lymphoïde B monotypique Lambda CD20+ CD5- CD10+ Aspect compatible avec un syndrome lymphoprolifératif B au niveau du LCR. Le volume et la cellularité du prélèvement étant faible, l'étude des marqueurs complémentaires pour le calcul du score de matures n'est pas réalisable.	Présence de petits lymphocytes matures, quelques macrophages et deux cellules lymphoïdes de taille intermédiaire, à noyau volumineux et basophile nucléolé et dont le cytoplasme, peu étendu, apparaît bleuté et microvacuolaire. Présence de deux cellules lymphoïdes inclassées (à confronter au résultat de l'analyse en cytométrie). (H : 0, L : 26,4)

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
9	P99	LNH	28/03/2017	07/11/1944	M	29/03/2017 : Lymphome diffus à grandes cellules B de type non-GC sur anatomopathologie d'une masse rétro-péritonéale	Bilan de troubles phasiques, d'une diplopie par atteinte du III gauche (paralysie des nerfs crâniens), d'un ptosis et de troubles de déglutition depuis quelques jours chez un patient hospitalisé pour suspicion de lymphome	CMF POSITIVE	Positive	5	19	613,26	199,23	1006	31,2	29,07	27,1	3,08	Présence d'une population lymphoïde B monotypique lambda représentant 70% des lymphocytes du LCR.	Présence de quelques lymphocytes matures, polynucléaires neutrophiles et macrophages ainsi que des cellules de taille moyenne au rapport nucléocytoplasmique élevé, au cytoplasme basophile et au noyau rond ou polylobé, irrégulier à la chromatine hétérogène, suspectes de correspondre à des cellules lymphomateuses. Présence de cellules atypiques.
10	P47	LNH	12/07/2016	17/12/1952	M	CH Boulogne : lymphome folliculaire diagnostiqué en septembre 2013 devant des polyadénopathies hyperfixantes au TEP. Suspicion d'envahissement neuroméningé.	Suspicion de localisation neuro-méningée devant une polyradiculite avec atteintes multiples des nerfs crâniens (paralysie du VII droit, IV gauche et VI droit).	CMF POSITIVE	Négative	4	16	53,59	30,96	169,5	33,6	29,6	27,1	1,73	Présence dans le LCR d'une très faible population de lymphocytes B CD19+ (0.7% des lymphocytes du LCR). Ceux-ci sont monotypiques Kappa. Aspect compatible avec des cellules lymphomateuses Un phénotype sur le sang est souhaitable pour écarter une origine sanguine de ces cellules	Matériel cytologique discrètement inflammatoire lymphocytaire, sans éléments cellulaires atypiques.
11	P70	LNH	10/01/2017	12/03/1938	M	CH TOURCOING : maladie d'Alzheimer diagnostiquée en janvier 2015 à part vasculaire associée	Recherche argument lymphome cérébral	CMF POSITIVE	/	4	15	45	67,7	796	31,8	30,68	27,3	0,66	Persistance d'une population lymphoïde B monotypique kappa CD5-, CD10+ représentant environ 10% des lymphocytes du LCR. En raison d'une quantité de LCR insuffisante, un complément de phénotype n'a pu être réalisé.	Non réalisé
12	P38	LPSNC	15/04/2016	03/05/1950	M	Suspicion de lymphome cérébral : découverte à l'IRM d'une lésion d'allure granulomateuse ou lymphomateuse du vermis cérébelleux.	Motif d'entrée aux urgences le 14/04/2016 : Syndrome vertigineux avec nausées et vomissements, instabilité à la marche, troubles de l'équilibre et diplopie.	CMF NEGATIVE	Forte suspicion	4	17	53,59	49,87	416,6	32,7	29,86	26,8	1,07	Les lymphocytes du LCR sont majoritairement des lymphocytes T. Présence de quelques lymphocytes B monotypiques. Un prélèvement de contrôle est souhaitable.	Absence de cellule atypique. (H : 570, L : 1,6)
13	P39	LPSNC	19/04/2016	17/02/1936	F	Suspicion de lymphome cérébral	Déficit moteur complet du bras gauche depuis février 2016. A l'IRM, lésion sous corticale suspecte de lymphome cérébral.	CMF NEGATIVE	Négative	4	17	67,1	31,8	193,9	30,7	29,07	25,4	2,11	Nombre d'éléments trop rares. Immunophénotypage non interprétable.	Absence de cellule atypique.
14	P84	LPSNC	03/02/2017	17/04/1959	F	Lymphome diffus à grandes cellules orbitaires (LIOP)	Recherche d'une localisation cérébrale	CMF NEGATIVE	Négative	4	16	61,33	182,1	293,3	29,9	29,33	26,6	0,34	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Lymphopénie B profonde, étude des chaînes légères non réalisable.	Laboratoire Hématologie : éléments altérés / Anatomopathologie : le liquide cytocentrifugé et coloré par le MGG ne comporte aucune cellule. Absence de cellule suspecte de malignité.
15	P38bis	LPSNC	21/04/2016	03/05/1950	M	(cf.P38)	(cf.P38)	CMF POSITIVE	Négative	4	15	76,1	55,55	560,5	33,6	30,13	26,8	1,37	Présence dans le LCR de 6 % de lymphocytes B CD19+, 65 % d'entre eux sont monotypiques Kappa CD10+, CD5-. Aspect compatible avec des cellules lymphomateuses.	Liquide hématique. Absence de cellule atypique. (H : 1500, L : 0,4)

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-1β (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
16	P3	Neuro-Inflammation	20/01/2016	16/07/1952	M	CH Valenciennes SEP progressive primaire évoluant depuis 1997 (troubles de la marche)	IRM (01/10/2015 disparition après corticoïdes et réapparition le 20/01/2016) : lésion profonde en regard de la corne pariétale gauche avec prise de contraste annulaire (évoquant une lésion gliale de haut grade)	CMF NEGATIVE	/	5	18	40.18	39.47	202.9	29.1	27.54	26.1	1.02	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR, absence de monotypie des LB	Non réalisé
17	P5	Neuro-Inflammation	28/01/2016	20/01/1973	M	/	CH Tourcoing Suspicion de sarcoïdose.	CMF NEGATIVE	/	5	19	44.36	1005.7	494.2	32.4	29.6	30.1	0.04	Absence de monotypie des LB.	Non réalisé
18	P18	Neuro-Inflammation	02/03/2016	20/04/1957	F	Myélite. Déficit moteur puis sensitif du membre inférieur gauche puis déficit sensitif des deux membres inférieurs depuis 5 jours.	Syndrome du cône terminal évoluant depuis le 27 février 2016. Recherche d'argument pour une pathologie inflammatoire	CMF NEGATIVE	Négative	4	14	42.41	137.79	296	31	29.6	27.3	0.31	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères.	Absence de cellule atypique.
19	P19	Neuro-Inflammation	03/03/2016	26/07/1994	F	CH Valenciennes Neuro-sarcoïdose avec atteinte oculaire, ganglionnaire, parotidienne, pulmonaire et neurologique (hypophysaire). Masse hypophysaire refulant le chiasma optique.	Asthénie avec des céphalées invalidantes en casque avec photophobie sans signe d'hypertension intracrânienne associée	CMF NEGATIVE	Négative	5	19	40.55	33.87	192.2	29.9	29.86	26.6	1.20	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR, les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères.	Le matériel apparaît paucicellulaire avec de très rares cellules cytotypiques. Absence de cellule maligne.
20	P20	Neuro-Inflammation	03/03/2016	19/12/1965	F	SEP rémittente récurrente depuis 1991, traitement par TYSABRI depuis 2011 (arrêt depuis 02/2016 devant troubles cognitifs à type de ralentissement et déficit sensitivo-moteur jambe droite)	Suspicion d'une leuco-encéphalite multifocale progressive	CMF NEGATIVE	Négative	5	18	39.82	40.18	238.5	30.4	28.55	26.1	0.99	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR, absence de monotypie des LB	Le liquide cytocentrifugé et coloré par le MGG comporte de très rares hémales et quelques lymphocytes et macrophages. Absence de cellule atypique.
21	P28	Neuro-Inflammation	30/03/2016	03/04/1973	F	CH Valenciennes : Sclérose en plaques rémittente récurrente évoluant depuis octobre 1998	Dysarthrie, troubles de l'équilibre, hypoesthésie de l'hémiface gauche et des membres supérieur et inférieur gauches.	CMF NEGATIVE	/	4	17	40.91	32.67	182.1	87.9	29.33	26.6	1.25	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes T, B et NK du LCR, les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères	Non réalisé
22	P33	Neuro-Inflammation	12/04/2016	13/06/1942	M	Pseudopolyarthrite rhizomélque cortico-dépendante sans signe de maladie de Horton et MGUS type IgG lambda (diagnostiquée en 2004). Céphalées chroniques quotidiennes.	PL au diagnostic devant troubles de la marche, douleurs des membres inférieurs et une dysarthrie évoluant depuis fin mars. Syndrome cérébelleux statique et cinétique avec ataxie majeure.	CMF NEGATIVE	Négative	4	17	46.82	53.59	602.3	29.6	28.04	25.6	0.87	Lymphocytose globale Absence d'anomalie franche de répartition des populations lymphocytaires Absence de monotypie des lymphocytes B.	Présence de nombreux lymphocytes. (H : 11,2, L : 80,8)
23	P49	Neuro-Inflammation	20/07/2016	05/09/1955	M	Périartérite noueuse atypique diag en 2010 (complications cérébrales à type d'infarctus ou d'hémorragie, de pachyméningite, de PRES : Syndrome d'Encéphalopathie Postérieure Réversible, d'encéphalopathie aiguë dans cette pathologie par exemple : présentation atypique de lésion infiltrante).	Diagnostic de lymphome cérébral à écarter : masse cérébrale évoluant depuis 2014.	CMF NEGATIVE	Négative	4	15	40.91	61.88	258.6	34.2	28.04	25	0.66	Les lymphocytes du LCR sont majoritairement des lymphocytes T sans anomalies notables. Absence de monotypie des lymphocytes B.	Sédiment acellulaire.

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-1β (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
24	P55	Neuro-Inflammation	27/09/2016	27/07/1955	M	Suspicion AVC à l'arrivée aux urgences le 25.09.2016 : Alerte thrombolyse chez un patient ayant présenté des troubles du langage, manque du mot et un déficit facial droit	Plage d'hypersignal Flair temporale supérieure droite. Prise de contraste multifocale nodulaire à prédominance corticale pouvant faire évoquer en première hypothèse des lésions d'origines inflammatoires ou infectieuses. Cependant l'hypothèse de lésions secondaires ne peut être écartée.	CMF NEGATIVE	Négative	5	20	42.41	338.71	320.9	33.3	29.33	26.3	0.13	Lymphocytes en quantité insuffisante pour établir l'immunophénotype.	Absence de cellule atypique. (H : 1,2, L : 12,8)
25	P56	Neuro-Inflammation	02/11/2016	10/09/1961	F	CH VALENCIENNES : motif de venue aux urgences : engourdissement progressif des membres inférieurs avec ascension au niveau abdomen et thorax. Tableau de myélite.	Manque du mot et déficit facial droit	CMF NEGATIVE	Négative	4	15	43.18	47.67	148.1	32.7	31.24	28	0.91	Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T, ratio CD4/CD8 : 2.9	A l'examen microscopique, le prélèvement est acellulaire. Il comporte de rares hématies. Absence de cellule suspecte de malignité.
26	P72	Neuro-Inflammation	12/01/2017	19/09/1961	F	Cure d'immunoglobuline IV sur une suspicion de méningoradiculite	Déficit moteur au premier plan mais également sensitif des 4 membres, prédominant très nettement aux membres inférieurs et avec atteinte axiale.	CMF NEGATIVE	Négative	5	20	41.66	37.06	180.5	30.4	28.81	26.1	1.12	Lymphocytes en quantité insuffisante pour établir l'immunophénotype	Absence de cellule atypique. (H : 0,4, L : 1)
27	P75	Neuro-Inflammation	16/01/2017	26/09/1952	F	Hospitalisation du 3 décembre au 16 décembre 2016 pour méningite probablement d'origine listérienne. Au final, méningo-encéphalite chronique d'étiologie indéterminée et régression spontanée des symptômes.	Complication épileptique post méningite	CMF NEGATIVE	Négative	5	18	41.28	32.67	190.5	33.6	27.29	25.4	1.26	Les lymphocytes du LCR sont majoritairement constitués de lymphocytes T CD4. Déséquilibre non significatif du ratio kappa/lambda.	Présence de cellules de morphologie lymphocytaire. (H : 4,8, L : 47,2)
28	P90	Neuro-Inflammation	27/02/2017	30/03/1974	M	Neurologie : polyradiculonévrite d'évolution atypique. Eliminer une cause secondaire type sarcoidose ou lymphome.	Recherche d'une étiologie à la polyradiculonévrite	CMF NEGATIVE	Négative	5	20	40.91	35.75	177.3	29.9	28.04	25.4	1.14	Nombre d'événement insuffisant Immunophénotypage non interprétable	Absence de cellule atypique. (H : 1,8, L : 1,2)
29	P55bis	Neuro-Inflammation	07/04/2017	27/07/1955	M	SEP progressive primaire avec multiples lésions cérébrales	Patient suivi depuis septembre 2016 pour lésions cérébrales en hypersignal FLAIR avec prise de gadolinium, d'allure initiale inflammatoire. Devant l'évolution des lésions, l'hypothèse d'un lymphome est posée.	CMF NEGATIVE	Négative	5	20	67.1	1005.7	1006	41.7	28.55	26.8	0.07	La population lymphocytaire du LCR est essentiellement constituée de lymphocytes T CD4+.	Liquide inflammatoire à prédominance de polynucléaires neutrophiles. Absence de cellule atypique. (H : 0,8, L : 820)
30	P7	Troubles neurologiques divers	29/01/2016	09/03/1999	F	DICV. Syndrome cérébelleux depuis 2 semaines céphalées et vertiges.	Déficit immunitaire associé à une granulomatose cérébrale. IRM : pathologie inflammatoire démyélinisante de type pseudo tumoral avec lésion hémisphère cérébelleux gauche	CMF NEGATIVE	Négative	4	16	45.99	34.49	175.7	32.7	29.86	26.6	1.33	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR, absence de monotypie des LB	Absence de cellule atypique.

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
31	P10	Troubles neurologiques divers	08/02/2016	29/08/1974	M	Syndrome parkinsonien dopamino-sensible	Ralentissement idéo-moteur, tremblements, tb du langage, hypertension bilan étiologique d'un syndrome parkinsonien létrapyramidal rapidement progressif. Suspicion de syndrome (parkinsonien) paraneoplasique.	CMF NEGATIVE	Négative	5	19	40.18	30.96	152.1	30.4	29.6	26.6	1.30	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR, les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères	Sédiment acellulaire.
32	P23	Troubles neurologiques divers	09/03/2016	15/10/1975	M	Vertiges venu aux urgences le 04/03/2016. Ataxie spinocérébelleuse.	Troubles de l'équilibre et de la marche depuis 15 jours environ (frère ataxie spinocerebelleuse, père et tante parkinson)	CMF NEGATIVE	Négative	4	14	44.76	45.58	164.9	38.1	33.27	29.9	0.98	Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T sans particularités notables.	Absence de cellule atypique.
33	P36	Troubles neurologiques divers	13/04/2016	08/11/1953	F	Crises épileptiques atypiques avec déficits post-critiques prolongés évoluant depuis 2012 (lésions IRM progressives)	Hémi-parésie droite avec hémiparésie	CMF NEGATIVE	Négative	5	20	42.8	164.94	293.3	31.5	29.07	26.8	0.26	Lymphocytes en nombre insuffisant pour une étude phénotypique	Absence de cellule atypique.
34	P57	Troubles neurologiques divers	03/11/2016	24/08/1968	M	Algie vasculaire de la face traitée par Imiject (disparue à l'arrêt du tabac)	Paralysie faciale périphérique droite	CMF NEGATIVE	Négative	4	14	42.8	137.79	635.7	31.2	30.13	27.3	0.31	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères	Absence de cellule suspecte de malignité. (H : 0,4, L : 40,4)
35	P59	Troubles neurologiques divers	08/11/2016	26/05/1939	F	CH VALENCIENNES : depuis 09/2015, 4 épisodes de rupture de contact (regard figé, troubles du langage). Tableau d'épilepsie partielle temporale?	IRM sans injection : hypersignal flair bitemporal prédominant à droite. Encéphalite ou post-critique?	CMF NEGATIVE	Négative	4	15	42.41	37.73	182.1	30.7	29.07	26.6	1.12	Les lymphocytes du LCR sont essentiellement des lymphocytes T CD4. Lymphocytes B en nombre trop faible pour une étude des chaînes légères	Il n'est pas visualisé de cellules de morphologie maligne. Discrète lymphocytose.
36	P66	Troubles neurologiques divers	02/01/2017	15/03/1948	M	Bilan étiologique d'un AVC. Recherche de maladie de système ou néoplasie dans le cadre d'une hémichorée gauche	Mouvements choréiques de l'hémicorps gauche ; lésions à l'IRM (noyaux gris centraux).	CMF NEGATIVE	Négative	5	18	41.28	60.23	195.7	31.8	29.86	26.8	0.69	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères.	Absence de cellule atypique. (H : 0,4, L : 0,2)
37	P67	Troubles neurologiques divers	02/01/2017	06/11/1998	M	Aucun ATCD médical ni chirurgical	Bilan étiologique de douleurs et paraplégie évoluant depuis le 19/12/2016	CMF NEGATIVE	Négative	5	20	42.41	63.57	443.6	29.9	29.07	26.8	0.67	Nombre d'événements insuffisant, immunophénotypage non interprétable.	Absence de cellule atypique. (H : 26, L : 0,4)

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
38	P91	Troubles neurologiques divers	03/03/2017	22/08/1955	M	Dystrophie myotonique de type II (maladie de Promm) depuis 15 ans, présence d'un nodule pulmonaire S3, un syndrome néoplasique était évoqué	Bilan d'un syndrome cérébelleux statique et cinétique bilatéral. Troubles de la marche. Suspicion de syndrome paranéoplasique.	CMF NEGATIVE	Négative	5	18	39.47	31.8	159.1	30.1	28.55	25.2	1.24	Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T sans particularités. Ratio CD4/CD8=4	Absence de cellule atypique. (H : 0,2, L : 2)
39	P96	Troubles neurologiques divers	24/03/2017	19/02/1967	F	Fibromyalgie	Migraine depuis 5 jours. Recherche d'une cause inflammatoire (sarcoïdose) ou infectieuse à une pachyméningite	CMF NEGATIVE	Négative	5	19	40.18	131.73	320.9	31.2	29.07	25.6	0.31	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères.	Le liquide cytocentrifugé et coloré par le MGG ne comporte aucune cellule. (H : 3,2, L : 0,6)
40	P100	Troubles neurologiques divers	29/03/2017	31/10/1954	F	CH Valenciennes : ATCD : endométriose	Evaluation d'une lésion du pédoncule cérébelleux moyen gauche avec une discrète prise de contraste.	CMF NEGATIVE	/	5	19	39.82	30.68	97.02	29.9	28.04	25.6	1.30	Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T essentiellement ratio CD4/CD8= 5,3.	L'examen des cellules lymphoïdes sur frottis est ininterprétable (étalement pour lecture microscope réalisée à J+1).
41	P111	Troubles neurologiques divers	21/04/2017	04/11/1974	F	Antécédent : rares céphalées ne remplissant pas les critères de migraines.	Bilan étiologique d'une asthénie associée à des vertiges et des maux de tête chez une patiente de 42 ans. L'IRM objective une prise de contraste leptoméningée du lobe occipital pouvant s'intégrer dans une pathologie métabolique inflammatoire.	CMF NEGATIVE	Négative	5	21	40.55	52.63	481	29.1	28.04	26.1	0.77	Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T sans particularités, ratio CD4/CD8 voisin de 7	Absence de cellule atypique. (H : 8,4, L : 4)
42	P69	Maladie de Waldenström	06/01/2017	12/04/1946	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en décembre 2016 sur BOM. Suivi depuis 2012 pour une MGUS avec un pic monoclonal IgM Kappa.	Suspicion d'un syndrome de Churg-Strauss ou Bing Neel associé à une macroglobulinémie de Waldenström. Atteinte neurologique centrale.	CMF NEGATIVE	/	5	21	39.47	31.52	162	29.9	27.29	25.4	1.25	Lymphocytes en quantité insuffisante pour établir l'immunophénotypage	Non réalisé
43	A	Maladie de Waldenström	24/11/2014	24/05/1950	F	Maladie de Waldenström diagnostiquée en 2006.	Suspicion de rechute du syndrome de Bing Neel diagnostiqué en juillet 2013	CMF NEGATIVE	/	5	21	45.17	65.9	306.8	30.4	29.6	27.1	0.69	Nombre d'événements insuffisant. Immunophénotypage des lymphocytes du LCR non interprétable.	Non réalisé
44	P74	Maladie de Waldenström	16/01/2017	09/05/1975	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en décembre 2010 avec localisation neuro-méningée présente au diagnostic	Suivi d'un syndrome de Bing Neel traité par ibrutinib (3 gélules par jour) depuis octobre 2015.	CMF POSITIVE	Négative	4	15	42.41	36.73	55.05	30.7	30.41	28	1.15	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa représentant 70% des lymphocytes du LCR.	Hématologie : absence de blastes sur 8 cellules observées. Anatomopathologie : non réalisé.

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
45	P104bis	Maladie de Waldenström	06/04/2017	08/09/1945	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en 2007 (MGUS IgM connue depuis 1996) sans atteinte neurologique centrale au diagnostic	Contrôle du syndrome de Bing Neel sous ibrutinib depuis novembre 2015.	CMF POSITIVE	/	5	20	42.03	39.82	171	31.5	28.81	26.6	1.06	Présence d'une population lymphoïde B CD5- CD10- monotypique Kappa représentant environ 8% des lymphocytes du LCR. Aspect compatible avec des cellules lymphomateuses.	Non réalisé
46	P105	Maladie de Waldenström	06/04/2017	14/11/1937	F	Maladie de Waldenström diagnostiquée le 18/11/2009 sur biopsie ganglionnaire et début du traitement le 15/12/2010	Présence de myoclonies diffuses atypiques des 4 membres. Suspicion de syndrome de Bing Neel.	CMF POSITIVE	Négative	5	20	1005.7	1005.7	1006	37.1	32.09	40.9	1.00	Présence dans le LCR d'une population lymphoïde B mature CD5- CD10- monotypique Kappa. Aspect compatible avec des cellules lymphomateuses.	Absence de cellule carcinomateuse. (H : 3, L : 470)
47	B	Maladie de Waldenström	10/12/2013	18/10/1936	F	Maladie de Waldenström diagnostiquée en septembre 1999. En 2001, transformation histologique en lymphome B diffus à grandes cellules traitée par 4 cures de R-CHOP avec obtention d'une réponse complète.	Exploration de troubles de l'équilibre et douleurs sacro-iliaques irradiant dans les membres inférieurs	CMF POSITIVE	Négative	5	21	129.38	1005.7	1006	30.7	28.81	26.6	0.13	Présence de 20% de lymphocytes B monotypiques kappa, CD5 -, CD38 -, CD138 faible Aspect compatible avec des cellules lymphomateuses	70 éléments avec 96% de lymphocytes et 2% de plasmocytes.
48	P104	Maladie de Waldenström	04/11/2015	08/09/1945	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en 2007 (MGUS IgM connue depuis 1996) sans atteinte neurologique centrale au diagnostic	Déficit neurologique de plus de 4h30. Paresthésies chroniques depuis 3 mois. Anomalies de la démarche et de la motilité.	CMF POSITIVE	Forte suspicion	5	21	57.58	275.41	377.3	30.7	29.86	26.6	0.21	Présence d'une population lymphoïde B monotypique kappa, représentant 35% des lymphocytes du LCR.	Présence de lymphocytes et cellules lymphoplasmocytaires (73%), des macrophages (13%) et des cellules lymphoïdes d'un peu plus grande taille, à noyau dense et plus irrégulier, difficiles à classer. (H : 0,2, L : 24,8)
49	D	Maladie de Waldenström	02/12/2014	07/07/1938	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée en avril 2011 sous surveillance simple avec un taux d'IgM à 57.8g/L.	Neuropathie axonale sensitivomotrice	CMF POSITIVE	/	5	21	43.97	32.67	174.1	31.2	29.6	26.3	1.35	Présence d'une population lymphocytaire B monotypique Kappa (98% des lymphocytes B) minoritaire dans le LCR (10% des lymphocytes totaux). Possible contamination sanguine du prélèvement. Un contrôle commun LCR et sang est nécessaire.	Non réalisé
50	E	Maladie de Waldenström	01/11/2016	29/04/1940	M	Maladie de Waldenström diagnostiquée fin avril 2010.	Persistance des douleurs et de la faiblesse des membres inférieurs apparues en juillet 2015, augmentation progressive du pic IgM kappa à l'EPS.	CMF POSITIVE	/	5	21	91.92	689.33	894.8	30.4	29.86	27.1	0.13	Présence d'une population lymphocytaire B CD5- CD10- et monotypique Kappa (88% des lymphocytes B) représentant environ 45 % des lymphocytes totaux.	Non réalisé
51	P61	oncologie	17/11/2016	09/01/1924	F	Néoplasie mammaire gauche et adénopathie axillaire	Hémiplégie gauche	CMF NEGATIVE	Négative	5	18	44.76	71.46	1006	37.7	29.6	26.3	0.63	Les lymphocytes du LCR sont des lymphocytes T sans particularités, ratio CD4/CD8 = 7 (absence de contamination sanguine)	Absence de cellule suspecte de malignité. Liquide inflammatoire à prédominance lympho-plasmocytaire. (H : 190,4, L : 148)

Classement	Prélèvement	Groupes	Date du prélèvement	DDN	Sexe	Pathologie	Indication du LCR	Interprétation du résultat de la CMF	Interprétation du résultat de la cytologie	N° du kit utilisé	N° de l'expérience	IL-10 (MFI)	IL-6 (MFI)	IL-8 (MFI)	IL-18 (MFI)	IL-12p70 (MFI)	TNF (MFI)	Ratio IL-10/IL-6	Résultat CMF LCR	Cytologie du LCR (Anatomopathologie)
52	P68	oncologie	03/01/2017	14/03/1957	M	Adénocarcinome bronchique stade IV à point de départ lobaire supérieur droit (diagnostic 06/2015)	Confusion depuis 15 jours, troubles cognitifs non régressifs	CMF NEGATIVE	Positive	5	19	43.97	153.49	701.8	30.4	28.55	26.1	0.29	Absence d'anomalie de répartition des lymphocytes du LCR. Les lymphocytes B sont en nombre insuffisant pour permettre l'étude des chaînes légères.	Présence de quelques lymphocytes, macrophages et deux cellules cohésives basophiles de taille moyenne à noyau rond et hyperchromatique, nucléolé. Présence de très rares cellules suspectes de malignité (aspect concordant avec les antécédents d'adénocarcinome). (H : 8, L : 7)
53	P6	Autres pathologies hématologiques	28/01/2016	29/01/1957	F	CH VALENCIENNES : myélome multiple (plasmocytes très dystrophiques classés en autres cellules)	Hypoesthésie de la houpe du menton, AEG, sueurs nocturnes	CMF NEGATIVE	Négative	4	16	42.8	37.39	180.5	32.1	29.86	27.3	1.14	Les lymphocytes du LCR sont des Ly T sans particularités ratio CD4/CD8 : 2,6	Liquide quasiment acellulaire. Absence de cellules suspectes de malignité.
54	P9	Autres pathologies hématologiques	04/02/2016	09/03/1971	F	Maladie de Hodgkin classique de sous-type à cellularité mixte	Troubles de la marche, ataxie cérébelleuse statique et locomotrice	CMF NEGATIVE	Négative	4	17	41.66	59.16	183.7	34.5	30.68	27.5	0.70	Éléments lymphocytaires très peu nombreux. Absence d'anomalies observées sur 124 lymphocytes analysés.	Absence de cellule atypique.
55	P24	Autres pathologies hématologiques	10/03/2016 (reçu le 11.pvt le 10)	05/05/1939	M	CH Arras : LAM secondaire à un SMD (caryotype +13)	Recherche d'un envahissement neuroméningé par la leucémie aiguë	CMF POSITIVE	/	4	16	43.18	78.18	447.6	38.4	30.96	27.5	0.55	Les blasts présentent un immunophénotype myéloïde : CD34+, CD117+, CD13+, CD33+ partiel et MPO+, avec expression de marqueurs monocytaires CD36+, CD4+ faible. Aspect compatible avec des blasts myéloïdes.	Non réalisé
56	P51	Autres pathologies hématologiques	22/07/2016	13/05/1950	M	CH ARRAS : LLC en troisième ligne (diagnostiquée en 2011) »-carcinome épidermoïde de la pommette droite (exérèse chir 10/15)	Lésion cérébrale en cocarde responsable d'un état de mal épileptique Apparition de multiples nodules et masses pulmonaires disséminés bilatéraux, nécrosés, de distribution aléatoire (Evocateur d'une localisation secondaire tumorale)(08/2016 Aspergillose pulmonaire confirmée) Neuro-aspergillose	CMF POSITIVE	/	4	16	41.28	36.73	182.1	33.6	29.86	27.3	1.12	93% des lymphocytes du LCR sont CD19+ monotypiques Kappa. Cependant le prélèvement semble contenir une part d'hémomodulation ne permettant pas d'exclure une origine sanguines à ces cellules	Non réalisé

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2016/2017

Nom : MAGIEROWICZ

Prénom : Marion

Titre du mémoire / thèse : Application de la cytométrie en flux multiparamétrique au diagnostic des localisations cérébrales primitives ou secondaires des néoplasies lymphoïdes B matures à partir des profils cellulaire et cytokinique du liquide céphalo-rachidien.

Mots-clés : Lymphomes non hodgkiniens, lymphome primitif du système nerveux central, maladie de Waldenström, syndrome de Bing Neel, diagnostic biologique, cytométrie en flux, immunophénotypage cellulaire, cytokines, liquide céphalo-rachidien.

Résumé :

Le diagnostic biologique des lymphomes cérébraux repose sur la mise en évidence de cellules lymphomateuses dans le liquide céphalo-rachidien par cytologie, cytométrie en flux et biologie moléculaire. A ces méthodes peut s'ajouter la détection de biomarqueurs dans le LCR. Dans notre étude, nous avons évalué l'apport de cette approche combinée de l'immunophénotypage cellulaire et du dosage de cytokines par la méthode *Cytometric Bead Array* dans 56 prélèvements de LCR. L'approche cellulaire par cytométrie en flux de notre étude confirme le gain de sensibilité dans la détection des cellules lymphomateuses par rapport à la cytologie. Le dosage des cytokines IL-6 et IL-10 apparaît comme un examen complémentaire d'intérêt, particulièrement dans les localisations primitives ou pour l'évaluation de la réponse à certaines thérapeutiques ciblées.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle Dupont, CHRU Lille

Assesseurs : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme, CHRU Lille

Monsieur le Docteur Charles Herbaux, CHRU Lille

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Christophe Roumier, CHRU Lille