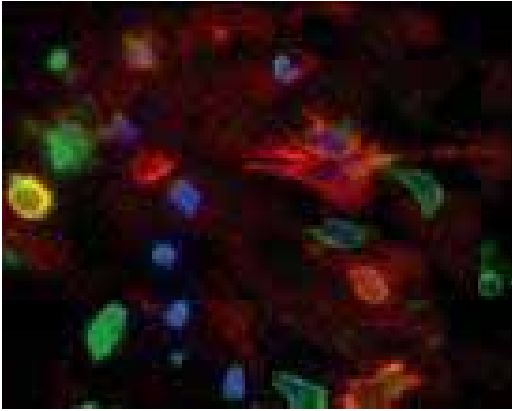




Immunophénotype des lymphomes

**CYTOMETRIE EN FLUX SUR BIOPSIES ET
PONCTION-ASPIRATION GANGLIONNAIRES :**

**INTERETS DIAGNOSTIQUES ET
PRONOSTIQUES**

SAHTS Alger, mai 2007

Diagnostic des lymphomes

Classification OMS 2001

- **Equivalent normal de la prolifération lymphomateuse**
 - Lymphomes B : 85%
 - Lymphomes T/NK : 15%
 - Tous les stades de maturation
 - Activation et aspects fonctionnels
- **Dérégulation de l'homéostasie cellulaire**
 - Apoptose, cycle cellulaire**
 - Anomalies génétiques ou virus
 - Transformation
- **Importance des marqueurs : immunophénotype**

Place de la cytométrie en flux dans une approche ' multi-techniques ' du diagnostic des lymphomes

Morphologie conventionnelle

cytologie

histologie

Immunophénotype :

Cytométrie en flux

Immunocytologie, Immunohistologie, TMA *tissue-micro-array*

Cytogénétique

Conventionnelle : caryotype,

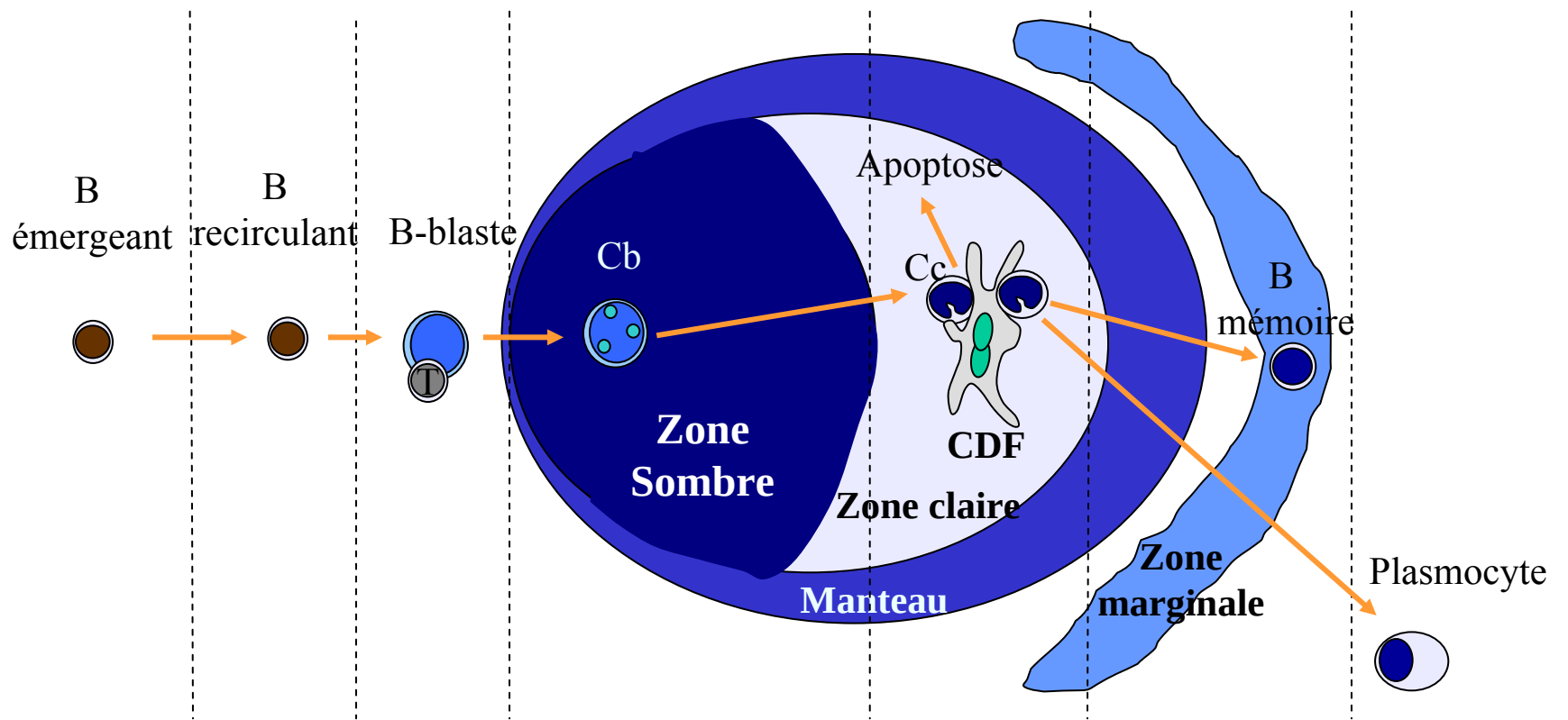
moléculaire : FISH et techniques innovantes (CGH)

Biologie moléculaire

PCR, RT-PCR, Q-PCR

Expression génique

ARN : signature tumorale ou micro-environnement

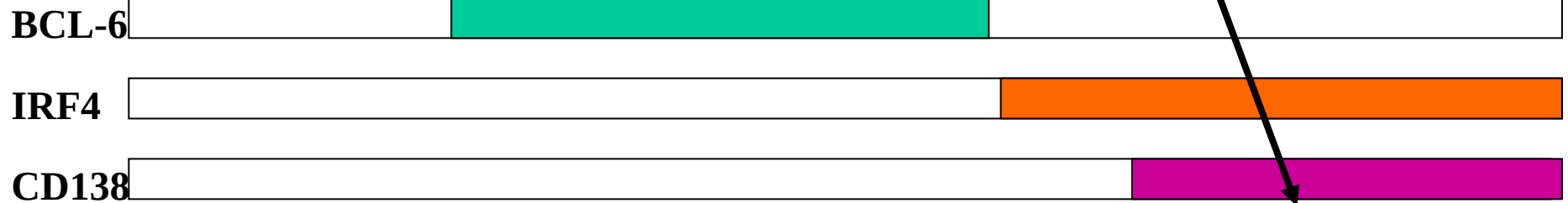
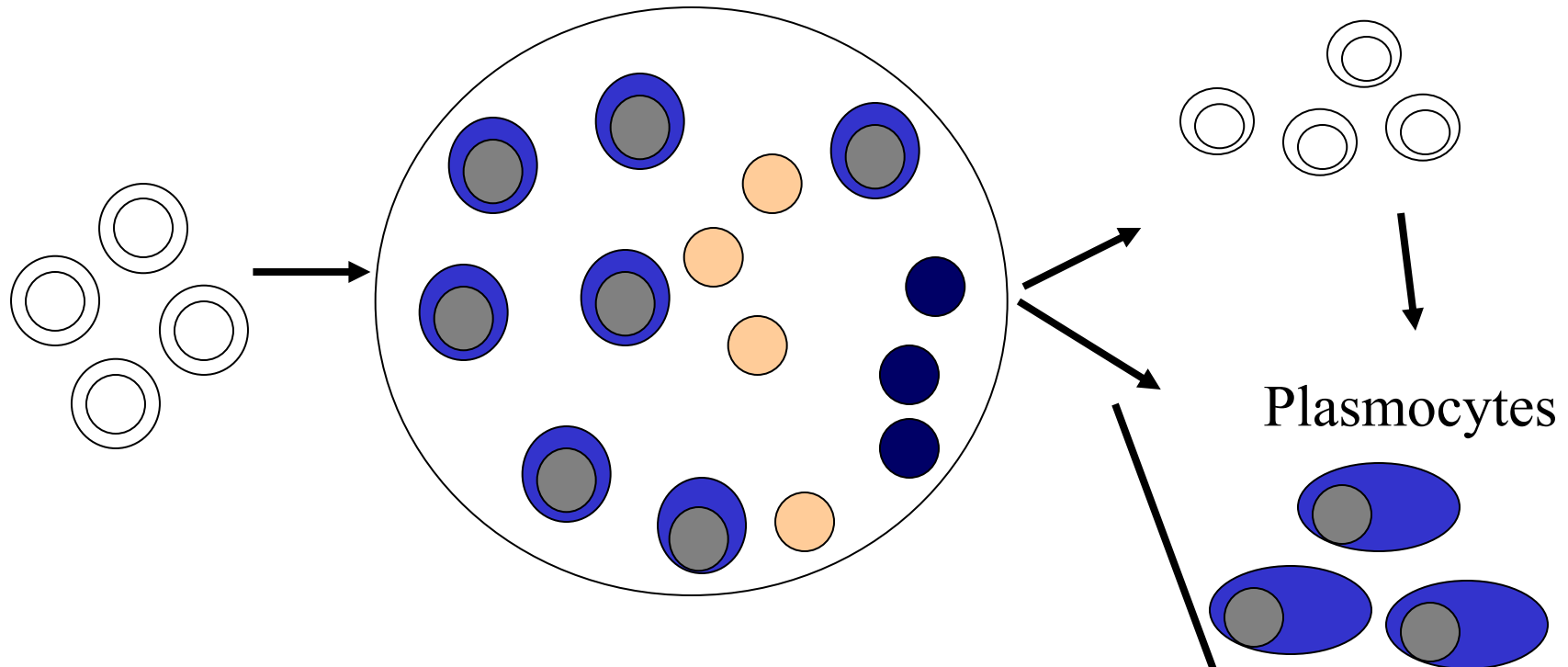


IgD	████████████████████	████████████████████	████████████████████	████████████████████
IgM	████████████████████	████████████████████	████████████████████	████████████████████
IgG/A/E		████████████████████	████████████████████	████████████████████
CD23		████████████████		
CD39	████████████████████		████████████████	
CD10		████████████████████		
CD38		████████████████████		████████████████
CD77		████████████████	████████████████	
Bcl2	████████████████████		████████████████	
Ki67		████████████████		
Bcl6		████████████████████		
Mutations somatiques		████████████████████	████████████████████	
Commutation isotypique		████████████████████		████████████████
CD138				

B vierge

Centre germinatif

B mémoire



Bcl-6+/IRF4-/CD138-

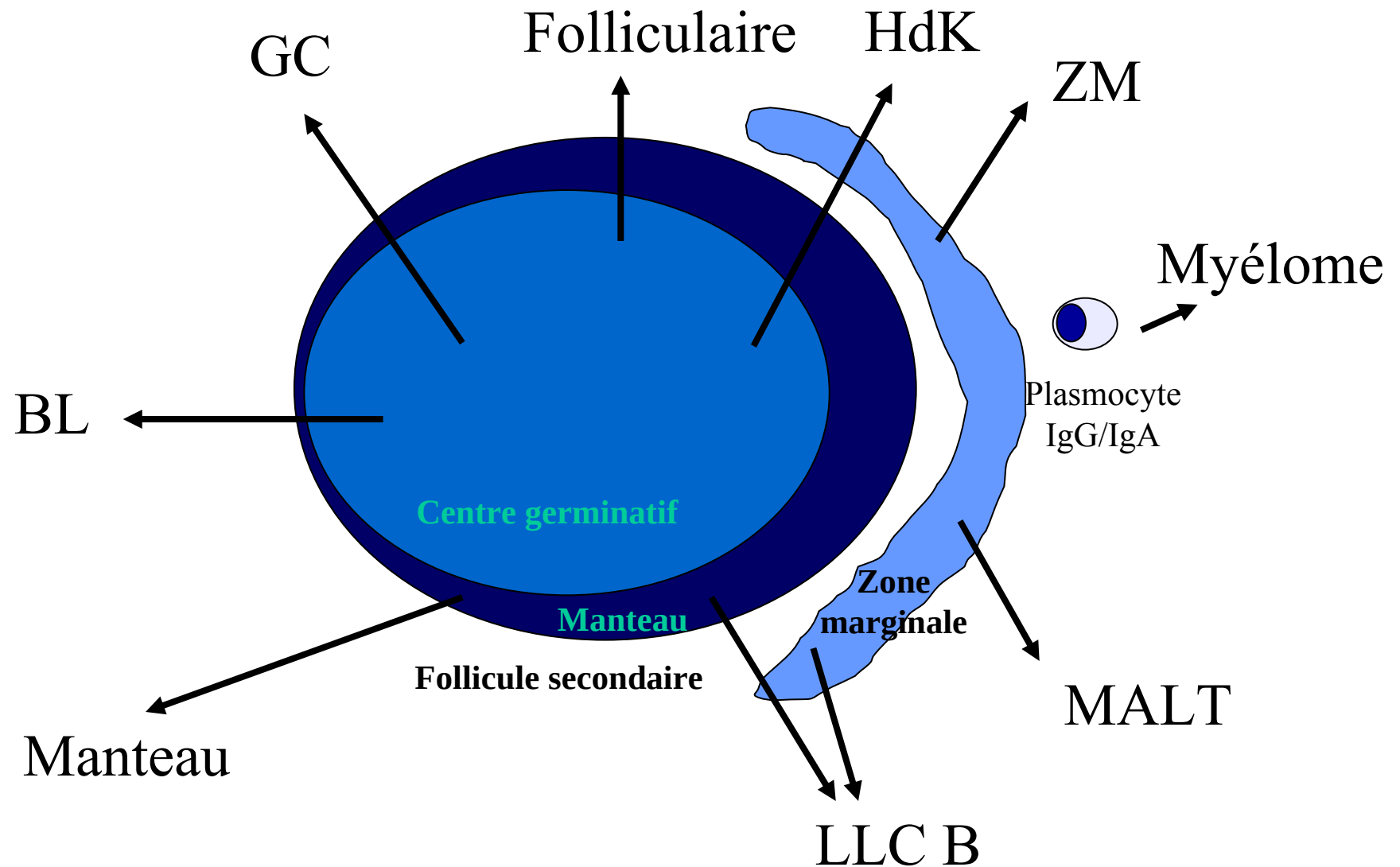
Bcl-6-/IRF4+/CD138-

Bcl-6-/IRF4+/CD138+

Blood, 2001, 97: 744-751

Origine des lymphomes B

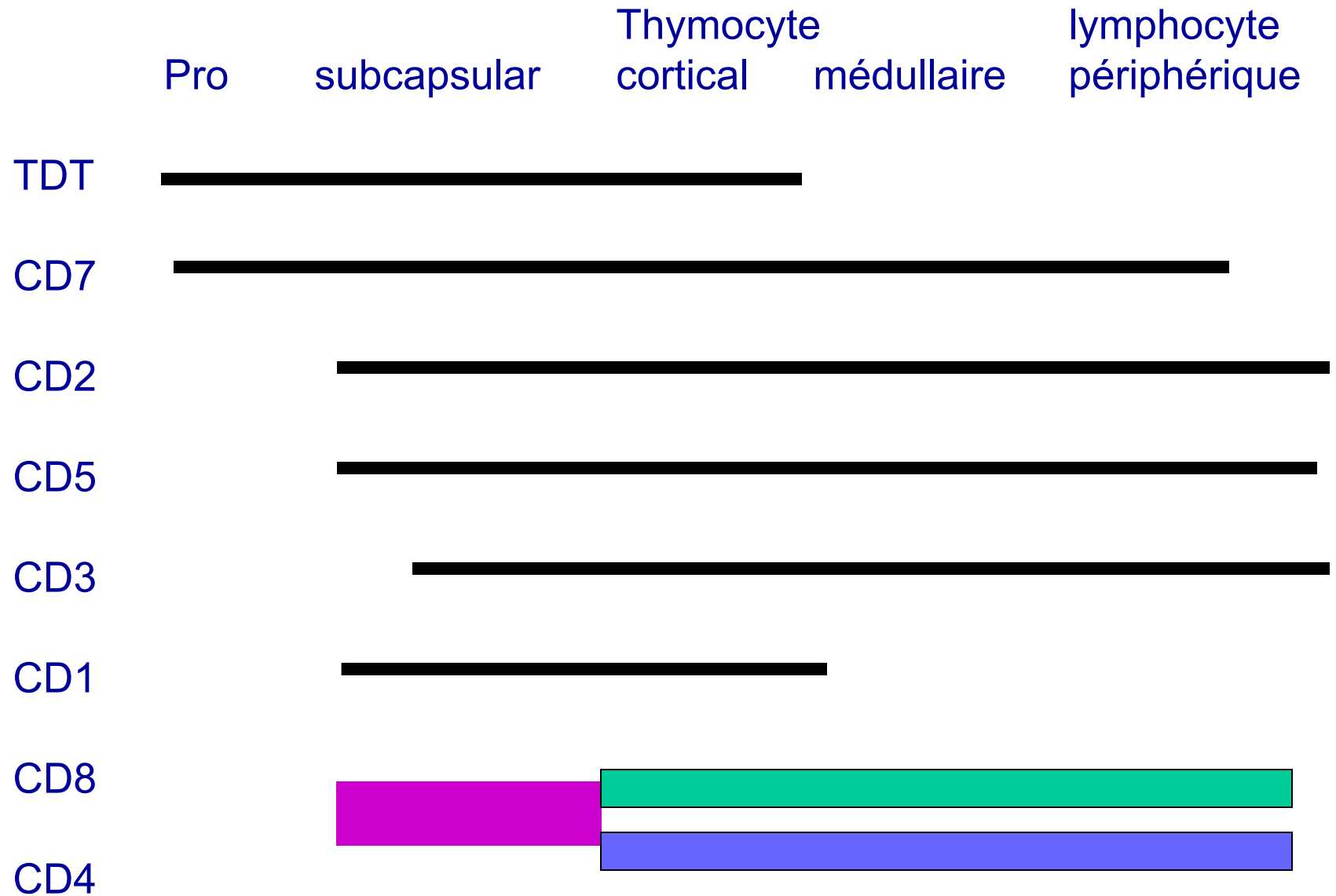
(R. Küppers et al. NEJM 1999, p1520)



Lymphomes T/NK matures

- **Cellules T post-thymiques**
- **Miment les aspects :
morphologiques, immunophénotypiques et fonctionnels
des populations des cellules T/NK matures**
- **Différents modes de présentation
leucémiques/disséminés
cutanés
autres localisations extra ganglionnaires
ganglionnaires**

Différenciation des cellules T



Avantages et intérêt de la cytométrie en flux

Rapide

Possibilité de tester plusieurs antigènes sur une même cellule

Résultats quantitatifs

Détection d'une population anormale minoritaire par la combinaison de plusieurs marqueurs

Intérêt diagnostique

ponction-aspiration ganglionnaire, dépistage et suivi
suspensions cellulaires issues de biopsie ganglionnaire,
diagnostic

Place de la cytométrie en flux dans la démarche diagnostique des lymphomes

- Etude coopérative avec le service d 'Anatomie pathologique, Hôpital Avicenne (2001) (ISAC, San Diego 2002)
- 95 biopsies ganglionnaires et tissulaires
ganglions (81), rate (5), amygdale (1), thyroïde(1), peau (1)
5 échecs (nombre de cellules insuffisant)
- Cytologie, histologie et immunohistochimie
 - 28 pathologies non tumorales
Hyperplasies non spécifiques (21), sarcoïdose (2), tuberculose (2), maladie de Whipple(1), maladie de Castleman (1), hyperplasie atypique EBV+ (1)
 - 51 LNH
45 NHL B : LLC/SLL 12, DLBCL 14, Folliculaire 11, Zone marginale 7, manteau 1
6 NHL T : PTCL (6)
 - 8 L Hodgkin : LH Classique (6), Nodulaire prédominance LC (2)
 - 3 métastases

Technique et panel de marquage

3 couleurs, Coulter EPICS XL-MCL, Cy5/PE/FITC

1	CD 3/4/8	8	CD 19/38/10
2	CD 3/7/4	9	CD 19/23/IgD
3	CD 2/(16+56)/3	10	CD 19/103/11c
4	CD 20/22/79b	11	CD 19/27/IgD
5	CD 19/23/5	12	CD 19/L/K
6	CD 19/IgM/FMC7	13	IgG-FITC
7	CD 19/25/43	14	IgA-FITC

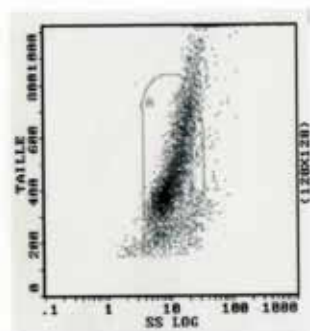
300 000 à 500000 cellules/marquage, 5000 évènements

incubation 15 minutes à la T° ambiante

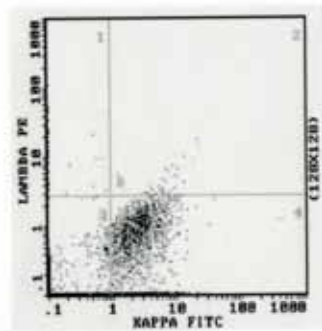
2 lavages et resuspension dans le PBS

Analyse sur cellules fraîches ou fixation PFA si nécessaire

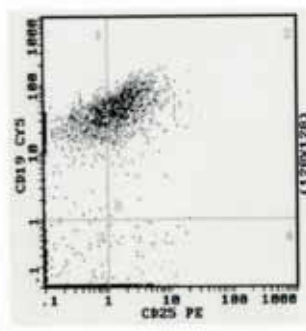
Analyse d'un lymphome B diffus à grandes cellules



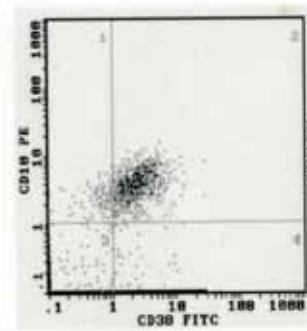
SS Log/FS



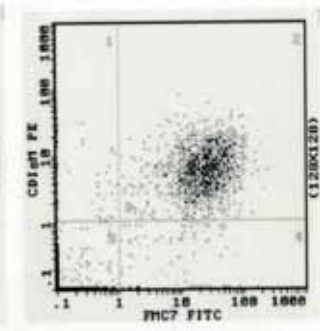
Kp/Ld



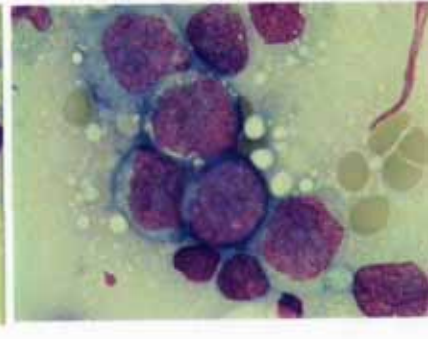
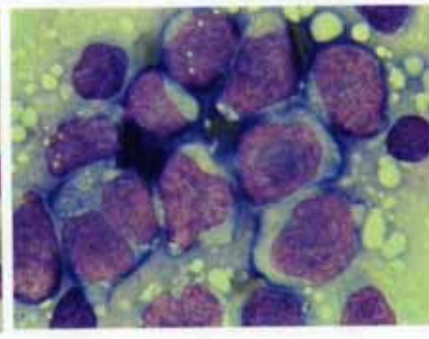
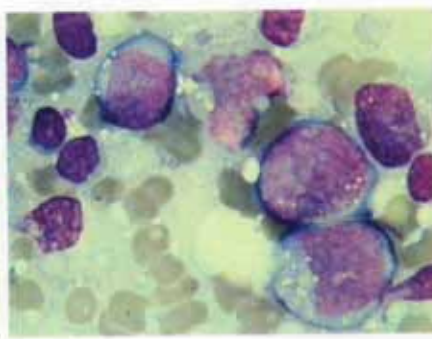
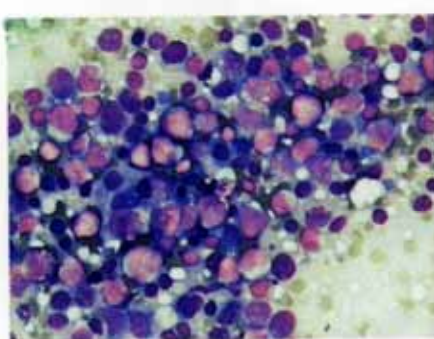
CD25/ CD19



CD38/CD10



FMC7/IgM



Hétérogénéité de taille

Monoclonalité IGM kappa, marqueurs d'activation

DIAGNOSTIC FINAL

CYTOMETRIE

	LNHB	LNH T	HODGKIN	METASTASE	NON MALIN
LNHB	41				
LNH T		4			
HODGKIN					
METASTASE				2	
NON MALIN	4	2	8	1 (CD45 non testé)	28

4 LNH B discordants

3 LNH B avec un important contingent de cellules T

1 LNH de MALT thyroïde avec une infiltration hétérogène

Les LH n'ont pas été détectés

Concordance 100% pour les pathologies non tumorales, 87% pour l'ensemble

Réponse rapide et fiable pour l'identification d'un LNH

Dépistage et suivi : intérêt de la cytométrie en flux sur aspiration ganglionnaire à l'aiguille (FNA)

Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2
Detection on fine needle aspirate in the diagnosis of
reactive lymphadenopathy and non Hodgkin lymphoma

E lane, E tani, E Björklund, G Elmberger, H Everus, L Skoog, A Porwit-MacDonald
Clinical cytometry 64B : 34-42, 2005

Karolinska Hospital, Stockholm

Dépistage et suivi : intérêt de la cytométrie en flux sur aspiration ganglionnaire à l'aiguille (FNA)

Stratégie utilisée par de nombreuses études (1992-2007)

Détection d'une prolifération lymphomateuse : 80-90% des cas

Etude prospective du Karolinska hospital

- 3038 patients suspects de Lymphome
- cytoponctions ganglionnaires
- cytométrie en flux 4 couleurs (424 échantillons analysables)
- immuno-histochimie sur cytospin (1088 échantillons analysables)
- cytologie
- critères d'exclusion pour l'analyse en cytométrie
- Concentration cellulaire $< 10^5/\text{mL}$
- Présence de cellules Sternbergoïdes
- Présence de cellules métastatiques
- Adénopathie $< 1\text{cm}$ chez l'enfant

Dépistage et suivi : intérêt de la cytométrie en flux sur aspiration ganglionnaire à l'aiguille (FNA)

- Etude prospective du Karolinska hospital

cytoponctions ganglionnaires analysées par cytométrie en flux 4 couleurs

Analyse de 6 marqueurs B

- CD19, CD20
- CD10, CD23
- Kappa, lambda

5 marqueurs T

- CD3, CD4, CD8
- CD5, CD7

Un marqueur intra-cellulaire (Bcl-2)

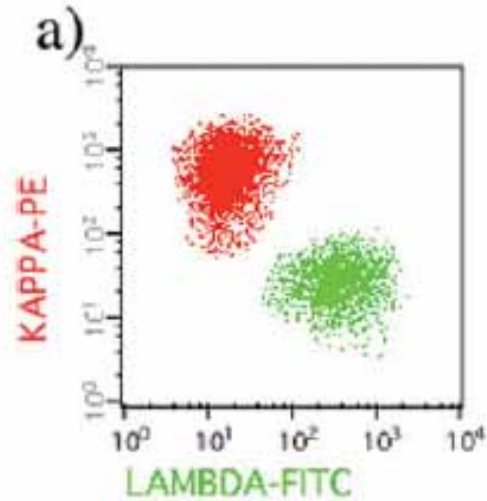
Table 1
*Panel of Monoclonal Antibodies**

FITC	PE	PerCP or PE-Cy5	APC
Lambda	Kappa	CD19	CD5
CD23	CD10	CD20	CD19
CD4	CD7	CD8	CD3
Bcl-2	CD10	CD19	CD3

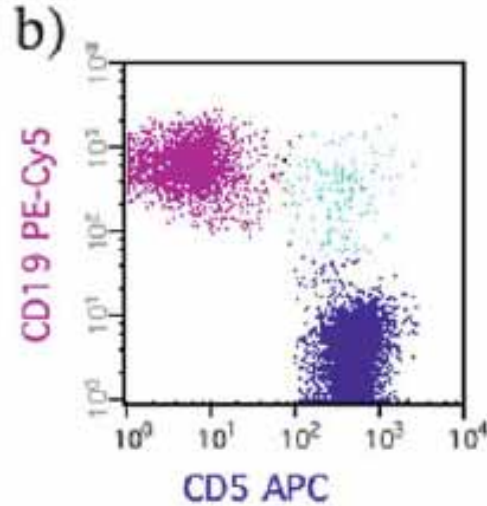
*Immunophenotypic Criteria for Classification of B-Cell NHL and RH**

Diagnosis	CD19	CD5	CD23	CD20	CD10	K/L
FL	+	—	—	+	+	Clonal
CLL	+	+	+	+ (weak)	—	Clonal
IC/LPL	+	—	—	+	—	Clonal
MALT/NMZL	+	—	—	+	—	Clonal
MCL	+	+	—	+	—	Clonal
HG-NHL	+	—	—/+	+/-	+/-	Clonal
RH	+	—	—/+	+/-	—/+	Polyclonal

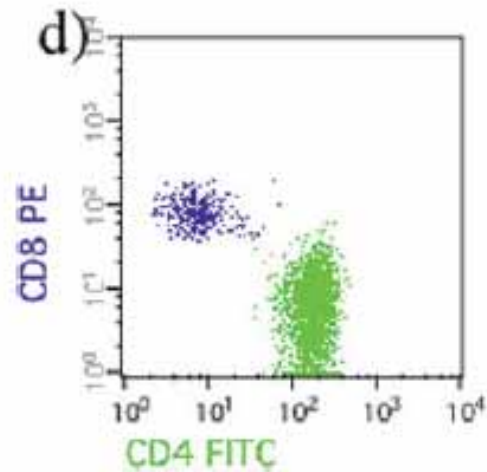
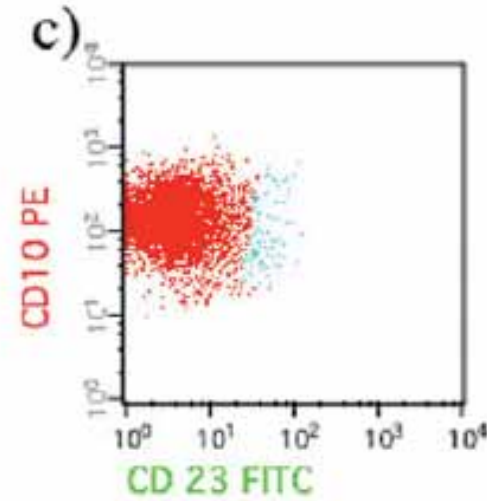
Clonalité des LC CD19+



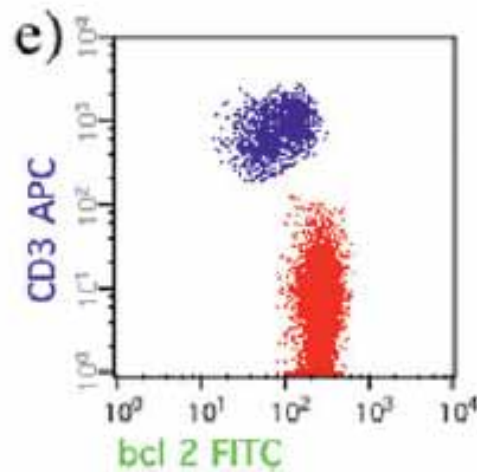
pop. CD19+CD5+



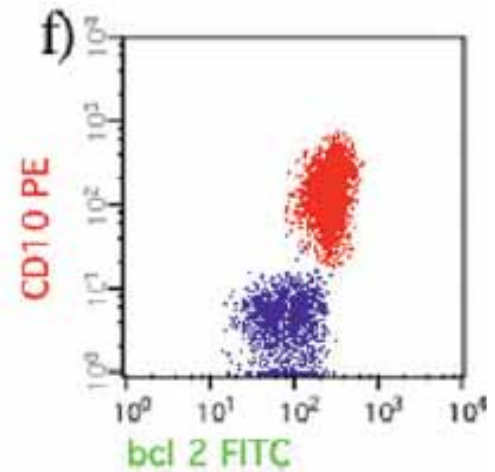
Détection CD10 et CD23
pop d'un LNH Folliculaire



CD4/CD8 ratio



Bcl-2 expression des T des B CD10+

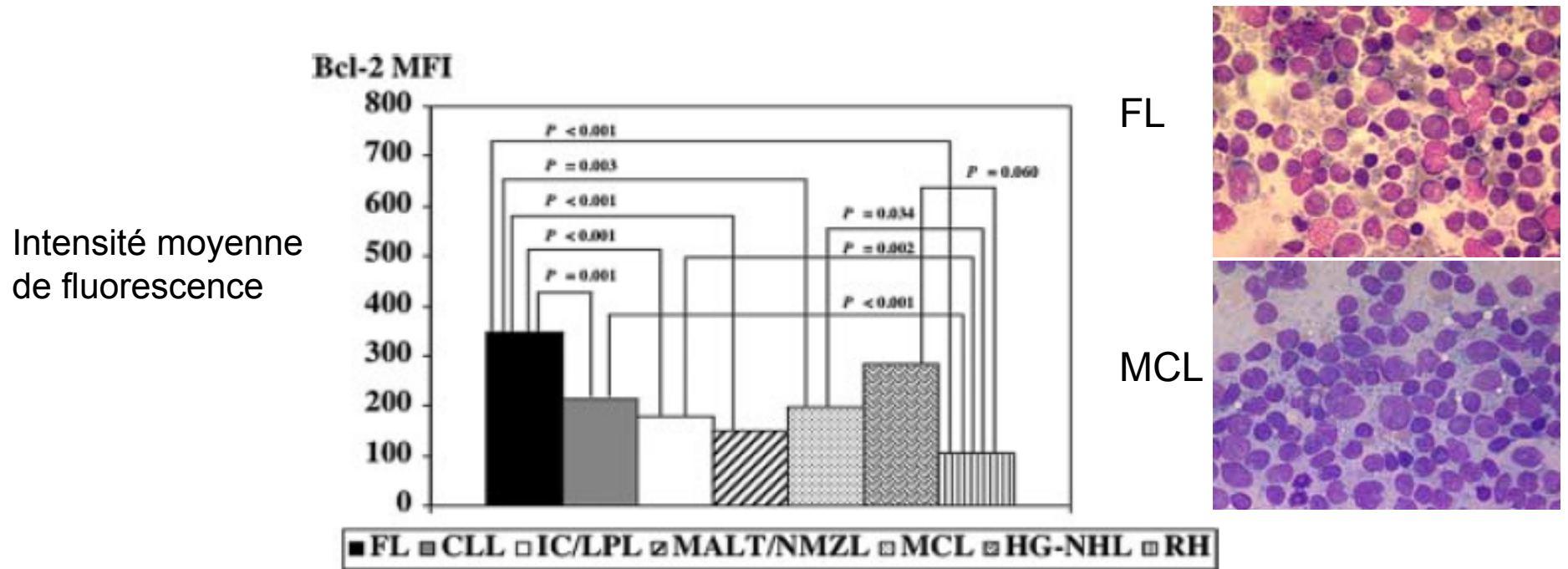


Concordance cytométrie en flux / diagnostic final = 87 %

Table 3
*Accuracy of Primary and Recurrent Lymphoma Diagnoses**

Cytopathologic diagnosis	Cases (n)	FCM concordance ^a	Histopathologic confirmation	FCM discordance ^b
Primary				
FL	47	45/47 (96%)	28/47	2/47 (4%)
CLL	26	26/26 (100%)	10/26	0/26 (0%)
IC/LPL	8	8/8 (100%)	2/8	0/8 (0%)
MALT/NMZL	15	15/15 (100%)	2/15	0/15 (0%)
→ MCL	6	4/6 (67%)	4/6	2/6 (33%)
→ HG-NHL	29	22/29 (76%)	10/29	7/29 (24%)
→ TCL	7	3/7 (43%)	5/7	4/7 (57%)
B-NHL-UN	4	0/4	0/4	4/4
→ Total	142	123/142 (87%)	61/142	19/142 (13%)
Recurrent				
FL	33	33/33 (100%)		0/33 (0%)
CLL	32	32/32 (100%)		0/32 (0%)
IC/LPL	2	2/2 (100%)		0/2 (0%)
MALT/NMZL	8	7/8 (88%)		1/8 (12%)
MCL	5	5/5 (100%)		0/5 (0%)
HG-NHL	7	6/7 (86%)		1/7 (14%)
TCL	10	6/10 (60%)		4/10 (40%)
Total	97	91/97 (94%)		6/97 (6%)

Dépistage et suivi : intérêt de la cytométrie en flux sur aspiration ganglionnaire à l'aiguille fine (FNA)



↑ Niveau Bcl-2 cellules réactionnelles

Les cellules B malignes expriment des niveaux de fluorescence de Bcl-2 significativement supérieurs à ceux des cellules B réactionnelles CD10- et des cellules CD10+ normales du centre germinatif

Dépistage et suivi : intérêt de la cytométrie en flux sur aspiration ganglionnaire à l'aiguille (FNA)

Expérience du Karolinska hospital 2004-2005

- Un panel 4 couleurs en cytométrie peut permettre un diagnostic rapide et précis de lymphome non Hodgkinien (LNH) près de 90% des cas
- Intérêt de l'étude du niveau d'expression de Bcl-2 pour distinguer les LNH des hyperplasies réactionnelles
- L'immunohistochimie garde cependant des avantages par rapport à la cytométrie : échantillons pauci-cellulaires, lyse des cellules néoplasiques fragiles en cytométrie, localisation architecturale des cellules tumorales, visualisation des aspects morphologiques

Expérience de l'Institut Curie, 2006

88 échantillons, 74 patients, morphologie, cytométrie, cytogénétique
concordance 90% LNH de bas grade, 83% LNH de haut grade
limites : L. de Hodgkin, LNH T, infiltration partielle
Equipe expérimentée et examens complémentaires

Cytométrie en Flux et pathologie ganglionnaire tumorale
Recherche de population minoritaire
Expérience de l'hôpital Jolimont, Haine St Paul, Belgique

2 exemples :

Recherche de métastases

Diagnostic de lymphome Hodgkinien

Détection multi-étapes

**CONTRIBUTION OF FLOW CYTOMETRY TO THE DIAGNOSIS OF
MALIGNANT AND NON MALIGNANT CONDITIONS IN LYMPH NODES
BIOPSIES**

Ravoet C, Demartin S, Gerard R, Dehon M, Peny M-O, Petit B, Delannoy A, Husson
B. Leuk Lymphoma 2004
Hôpital de Jolimont, Haine St Paul, Belgique

Cytométrie en Flux et pathologie ganglionnaire tumorale

Recherche de population minoritaire

- 118 biopsies ganglionnaires, 116 patients
- Etude histologique
- Etude en cytométrie en flux
- Concentration cellulaire minimale = $2,5 \cdot 10^5$ cellules /mL
- 8 tubes tests de 3 ou 4 anticorps = dépistage
 - Tube 1 = Lymphocytes B et T
 - Tubes 2,3,4 = cellules épithéliales et plasmocytes
 - Tube 5 = cellules de Reed-Sternberg
 - Tube 6, 7 = clonalité B
 - Tube 8 = sous populations T

Panel de marqueurs : détection initiale

	FITC	PE	PcP	APC
	CD3	CD19	CD45	TP3
→	Pan cytokeratin	Glycophorin A	CD45	TP3
→	Epithelial mbn antigen	Glycophorin A	CD45	TP3
→	Epithelial mbn antigen	CD138	CD45	TP3
→	CD15	CD30	CD45	TP3
	Lambda	CD19	CD20	CD45
	Kappa	CD19	CD20	CD45
	CD4	CD8	CD3	CD45

Si suspicion d'un LNH B; 5 tubes supplémentaires

FITC	PE	PcP	APC
Iso	Iso	CD19	Iso
CD103	CD25	CD19	CD11c
FMC7	CD38	CD19	CD22
CD20	CD23	CD19	CD5
CD79a	CD43	CD19	CD10

Si suspicion d'un LNH T

anti-CD1a, CD2, CD5, CD7, CD56, CD57, TCR $\alpha\beta$ et TCR $\gamma\delta$.

Biopsies ganglionnaires comparaison histologie/cytométrie en flux

Pathologie non tumorale

43 biopsies non malignes en histologie

27 hyperplasies non spécifiques, 16 granulomatoses

38 biopsies non malignes en cytométrie

5 discordances :

2 faux + FCM : Lymphome de Hodgkin suspecté dans 2 granulomatoses

3 faux négatifs en histologie :

micrométastases d'un cancer du sein non identifiée en histologie

LLC B diagnostiqué dans le sang

LNH T identifié sur une seconde biopsie

Lymphomes non hodgkinien

Histologie : 31 cas

Flux : 30 cas

Cytométrie en Flux et pathologie ganglionnaire tumorale

Recherche de population minoritaire

CARCINOMES

18 en histologie et en cytométrie

Ce panel à permis de quantifier l'envahissement
par les cellules métastatiques de 0,03 à 71 %

Incapacité du panel à spécifier l'origine du carcinome

Autres tumeurs

2 mélanomes passées inaperçus en cytométrie

Lymphome de Hodgkin :

Histologie : 15 cas

13 scléronodulaires, 1 cellularité mixte et 1 à prédominance lymphocytaire

Cytométrie : 10 cas, 3 faux négatifs

diagnostic très probable dans 6 cas

>1 cellule CD45- CD15+ CD30+/ 10 000 cellules)

diagnostic possible à probable dans 6 autres cas

>1 cellule CD45- CD15+ CD30+ / 100 000 cellules)

Cytométrie en Flux et pathologie ganglionnaire tumorale, Recherche de population minoritaire

- Bonne concordance entre les résultats d'histologies et de cytométrie en flux (87,9%; 95 %CI= 81-93)
- La cytométrie a correctement diagnostiqué 2 LNH et un envahissement par des micrométastases passés inaperçus en histologie, 2 mélanomes non détectés par le flux
- Difficulté, malgré le grand nombre de cellules analysées à établir un diagnostic de Lymphome de Hodgkin en cytométrie

Facteurs pronostiques et en cytométrie en flux

Les cellules tumorales

- Leucémie Lymphoïde Chronique
ZAP70 + CD38 LLC
- Lymphome B diffus à grandes cellules
signature : centre germinatif et non centre germinatif
post centre germinatif

Le micro-environnement tumoral

- Les lymphomes folliculaires

Facteurs pronostiques du micro-environnement tumoral

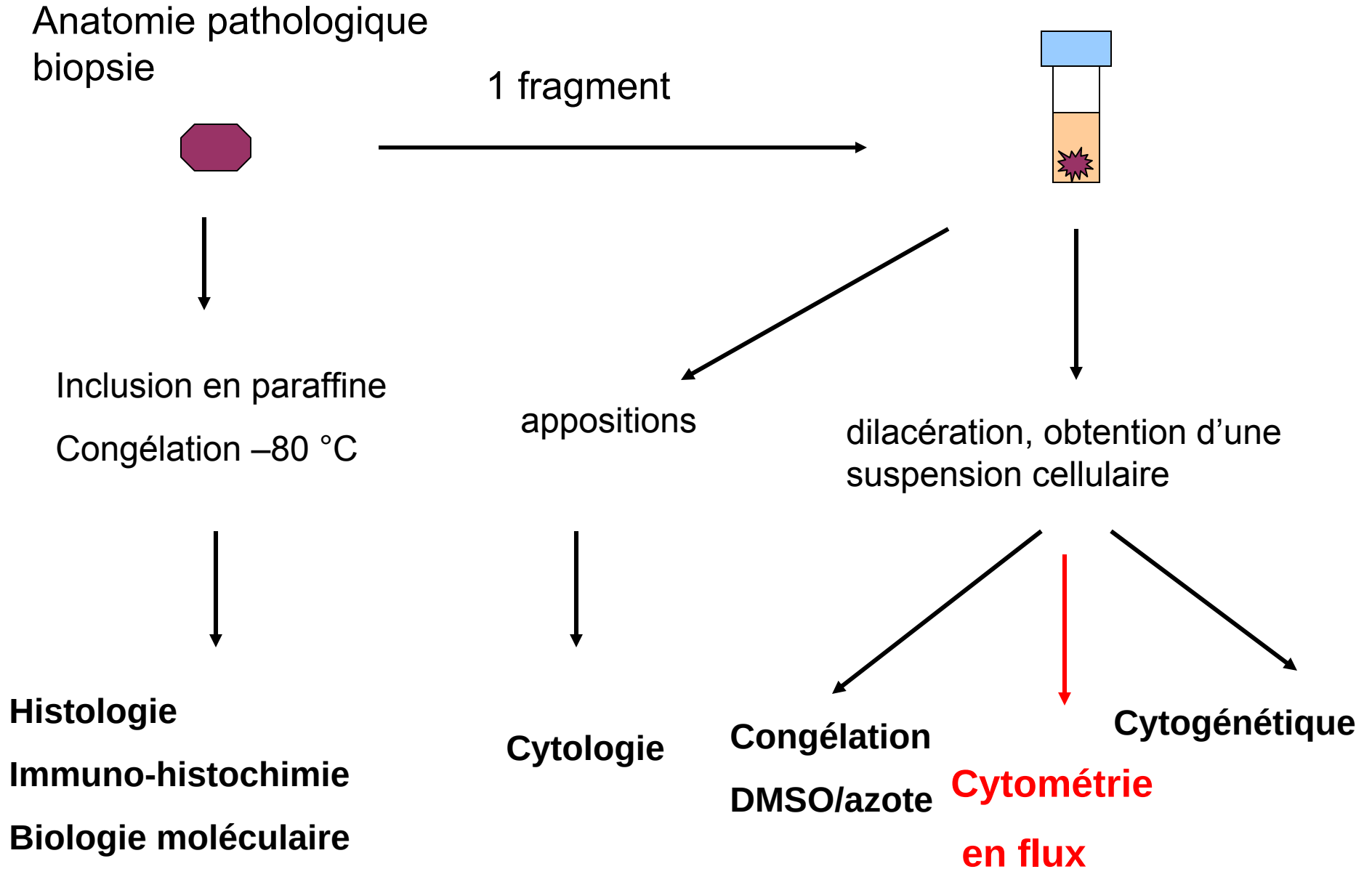
cytométrie en flux

Karolinska hospital

- 139 biopsies ganglionnaires au diagnostic de lymphome folliculaire
- Etude par cytométrie en flux de l'environnement tumoral
- Un niveau élevé de Lymphocytes T CD8+ est corrélé avec une survie globale une survie sans événement plus longue, indépendamment du score de l'index pronostic international des lymphomes folliculaires
- Probable intérêt comme facteur pronostique au diagnostic

Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E
Clin Cancer Res, 2007

Aspects organisationnels : traitement du tissu biopsié



Cytométrie en flux : dissociation cellulaire et suspension

- Perfusion : B Drenou
- Dilacération mécanique
 - Dans une boîte de Petri stérile
 - Dilacération soigneuse : ciseaux et pinces stériles
 - Récupération du maximum de cellules libérées avec une pipette à pointe fine
 - Bien éviter les « petits fragments »
 - Possibilité de filtrer dans une membrane de nylon (50 μ) (C Ravoet)
 - Mettre en suspension dans du RPMI ou du cellwash
 - Centrifuger 8000 tours à 1600 tours/minute
 - Récupérer dans PBS/SVF (0.05)
 - Ajuster le nombre de cellules à moins de 10 000 cellules/ μ l
- Technique de suspension cellulaire identique pour la cytogénétique et la cytométrie en flux

Dépistage et diagnostic des lymphoproliférations

Sang et moelle

Expérience, CHU Bicêtre

- Sang total ou moelle ou liquides biologiques
- Lyse et lavages
- Acquisition = 20000 évènements BD Facs Calibur
- 3 ou 4 couleurs
- Plusieurs étapes
 - Numération les Lymphocytes T, B, NK
 - Panel de dépistage
 - Panel Diagnostique
 - Lymphoproliférations T
 - Lymphoproliférations B
 - Plasmocytes

Dépistage et diagnostic des lymphoproliférations

Sang et moelle

Expérience, CHU Bicêtre

- Sang total ou moelle ou liquides biologiques
- Lyse et lavages
- Acquisition = 20 000 évènements BD Facs Calibur, 3 ou 4 couleurs

- Plusieurs étapes

- Numération les Lymphocytes B,T, NK

- Panel de dépistage

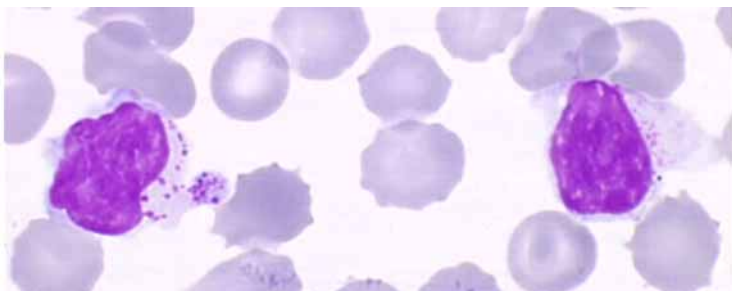
CD45	CD3	CD4	CD8
CD45	CD3	CD19	CD16+56
CD3	CD4	CD8	TCR $\alpha\beta$
CD19	CD5	<i>kappa</i>	<i>lambda</i>
CD3	CD2	CD16	CD56

- Panel Diagnostique

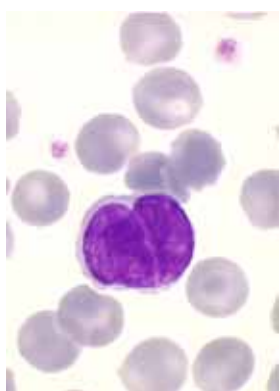
Lymphoproliférations T

Lymphoproliférations B

Plasmocytes



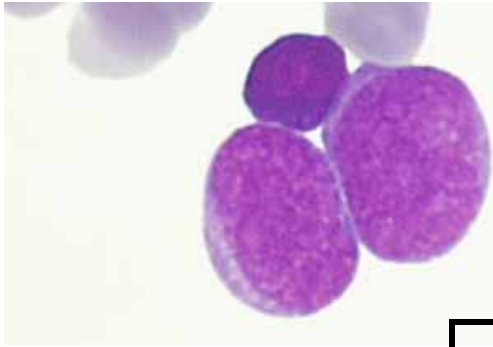
Diagnostic lymphoproliférations T



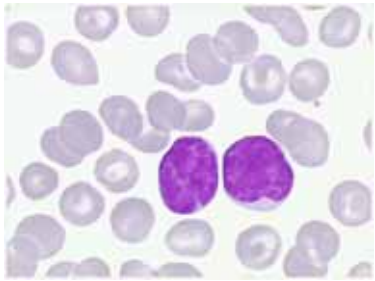
CD2	CD3	CD7	CD5	Pan T
CD3	CD4	CD8	CD57	LGL
CD4	CD8	CD38	CD45RA	Mémoire
CD4	CD8	CD45RO	CD62L	Naïf
CD3	CD4	HLADR	CD25	Activation et régulateurs

Analyse du répertoire V β = 24 V β correspondant à 70 % du répertoire, réalisé en cytométrie si suspicion de clonalité T

3 v β par tube, 8 tubes (réactif Beckman Coulter)



Diagnostic lymphoproliférations B



CD45	CD19	IgS	IgM
CD19	CD20	CD24	
CD19	CD22	CD11c	
CD19	CD23	FMC7	
CD19	CD10	CD103	
CD19	CD21	CD38	
CD19	CD25	CD21	

- Plasmocytes détectés sur un panel 4 couleurs CD138/CD38/CD19/CD56 associé à une détection intracellulaire des chaînes légères kappa et lambda.
- Lymphome du manteau : Détection de la Cycline D1 intracellulaire

Remerciements

Bicêtre

Fanny Menard

Karim Abbed

Yassine Taoufik

Lucie Salama

Avicenne

Guy Dhello

Philippe Bissières

Antoine Martin

Jean Feuillard