

Résumé académique du 2^e Workshop international de Cytométrie en flux

**Coordination Pr S.E. Belakehal
Groupe Algérien de Cytométrie / SAHTS**

Préface

- Ce volume rassemble les communications du **2^e Workshop national de Cytométrie en flux**, tenu à Alger en avril **2009**, sous la coordination du **Groupe Algérien de Cytométrie**.
- Cette édition a constitué une étape majeure dans la structuration des pratiques nationales de cytométrie, en favorisant l'échange d'expériences entre les laboratoires hospitaliers, et universitaires.
- Les communications présentées ont mis en lumière la qualité du travail réalisé **en Algérie** dans les domaines **du diagnostic hématologique**, de **l'immunophénotypage**, de **la standardisation des panels**, et de la maîtrise des aspects techniques et analytiques.
- Cet atelier a aussi illustré la dynamique d'une **école algérienne de cytométrie**, rigoureuse, formatrice et ouverte à l'international.

— ***Pr Salah Eddine Belakehal***

Coordinateur national du Groupe Algérien de Cytométrie

Listes des membres du groupe et des invités

1. HAMALADJI ROSE MARIE
2. ABAD MOHANED TAYEB
3. GRIFFI FATIHA
4. IDIR HAMMOUR
5. AHMED NACER REDHOUAN
6. AIT ALI HOCINE
7. SIDI MENSOUR NOUREDINE
8. HAMDİ SELMA
9. OILIVIER HERAULT
10. C. PICARD
11. Delfine Aldebert
12. SAIDI MEHDIA
13. SAIDI DJAMEL
14. BRAHIMI MOHAMED
15. GUOIDER EMNA
16. ZOUAOUI ZAHIA
17. MESLI NAIMA
18. LAKHDARI
19. MARTINE RAPHAEL

1. HAIRECHE FARIDA
2. BENAKLI
3. ABDENEBI
4. BOUKHAMIA
5. MEHDID
6. BELHADJ
7. AIT AMEUR
8. SAI
9. BELHANI
10. MOUHSSIN DJAMEL
11. SI ALI NADJET
12. BENHALILOU MERIEM
13. HAMOUDA HAKIM
14. YACHKOUR
15. TOUATI
16. RAMAOUN
17. NEKAL
18. KACI
19. LOUANCHI

1. ARDJOUN 2
2. DJOUADI 2
3. BOUTELDJA 1
4. SABERCHERIF 2
5. TAHARBOUCHT 1
6. RAHALI 2
7. TALBI 1
8. OUELDKABLIA 1
9. LAOUAR 1
10. BENAMARA F 2
11. LAMRA 1
12. MILOUDI 1
13. KELOUCHE 1
14. OUDAH1
15. BELKASMAOUI1
16. BAGDAD1
17. MANSOUR
18. ATARI
19. SAHRAOUI
20. LAZFENE ALIA , MAATALLAH A

Programme 14 avril, Alger, HCA

- Principe et indications de la CMF en immunologie :

Delfine Aldebert (CHU Grenoble)

- Déficits immunitaires acquis et congénitaux :

Capucine Picard (Hopital Necker, Paris)

- CMF et HPN :

Olivier Héraut (CHU Tours)

- Expérience tunisienne en CMF

E Gouider, B Maddeb (CHU AZIZA, Tunis)

- CMF et LA

D Saidi , H Touhami (CHU Oran)

- Apport de la cytoponction ganglionnaire dans le diagnostic des lymphomes

• A Belarbi, ZC Amir, F Aslah (CHU Mustapha)

- CMF et lymphomes

Olivier Héraut (CHU Tours)

- Apport de la CMF dans le diagnostic des lymphomes par cytoponctions à l'aiguille fine ou par trituration dilacération ganglionnaire

SE Belakehal, FZ Ardjoun (HCA),

- CMF et LLC

S Taoussi, S Oukid , MT Abad (CAC, BLIDA)

- CMF et contrôle de qualité des greffons de CSH

F Hariache , F. Zerhouni, RM Hamladji (CPMC)

- CMF et thrombopathies congénitales

M Brahimi, A Bekadja (EHS, Oran)

- Suivi des patients HIV, expérience du CTSA

Flici , M Ardjoun(CTSA, Alger)

Programme 15 avril, Alger, HCA : Ateliers

Apport de la cytoponction ganglionnaire dans le diagnostic des lymphomes

A Belarbi, ZC Amir, MG Mokhtech, F Asselah
Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique
CHU Mustapha Alger

Introduction

■ Large spectre de lésions

■ Dc difficile à établir / Lymphome → Type histologique

■ IHC et anomalies génétiques → Entités: L Manteau
DLCL, L Malt

■ Intérêt :
▪ Dc de première intention
▪ Surveillance :
 ➤ Ganglions résiduels
 ➤ Rechutes
→ Biopsie

- ➡ Analyse cytologique
- ➡ Avantages du May-Grunwald-Giemsa [MGG]
- ➡ Données histologiques et contexte clinique



Inconvénients

- ➡ Absence d'information / structure et topographie des lésions
- ➡ IHC sur matériel inclus en paraffine
 - ➔ Avantages majeurs de la cytologie ganglionnaire
celui de l'excellence de son analyse cellulaire

Outils diagnostiques

❖ Cytologie à l'aiguille fine

- ✓ Greig et Gray 1904 USA
- ✓ Simple et peu coûteuse
- ✓ Personnel médical entraîné
- ✓ Écho/Scannoguidée: ADP profondes



[23 / 25 gauges]

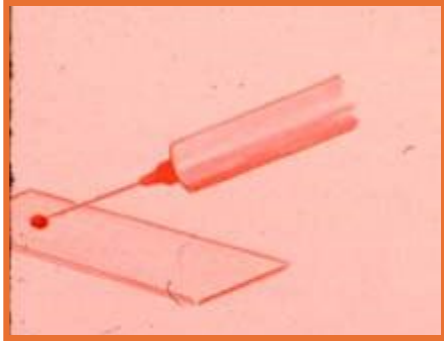
- 4 étapes

- . Prélèvements: Sélection des ganglions/ # secteurs
- . Étalement
- . Coloration
- . Lecture

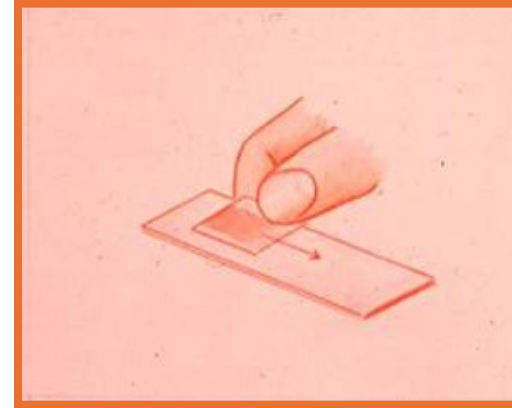


- Le ganglion est repéré puis,
- Immobilisé entre le pouce et l'index de la main gauche
- On ponctionne sans aspiration
- L'aiguille de 18 gauges est mobilisée en 2 ou 3 trajets courts dans le ganglion, en prêtant une grande attention à ne pas recueillir du sang

Cytologie à l'aiguille fine



Mettre une goutte sur une lame



Étaler comme un frottis sanguin

Fixation et coloration des lames:

- Séchage à l'air 12 à 24 H

*coloration : *MGG*



❖ Etalements cyto-centrifugés:

- Immunophénotype
- Cytogénétique / Bio.Mol.[CMF, PCR, FISH]
- Matériel représentatif

❖ Cytochimie : Pas de place

❖ Immunophénotypage

➤ Classer un lymphome

➤ Diagnostic #tiel

➤ Panel Ac: CD20, CD3 et CD5

Lymphome B ou T



CD20, CD3 et CD23

L à petites cellules

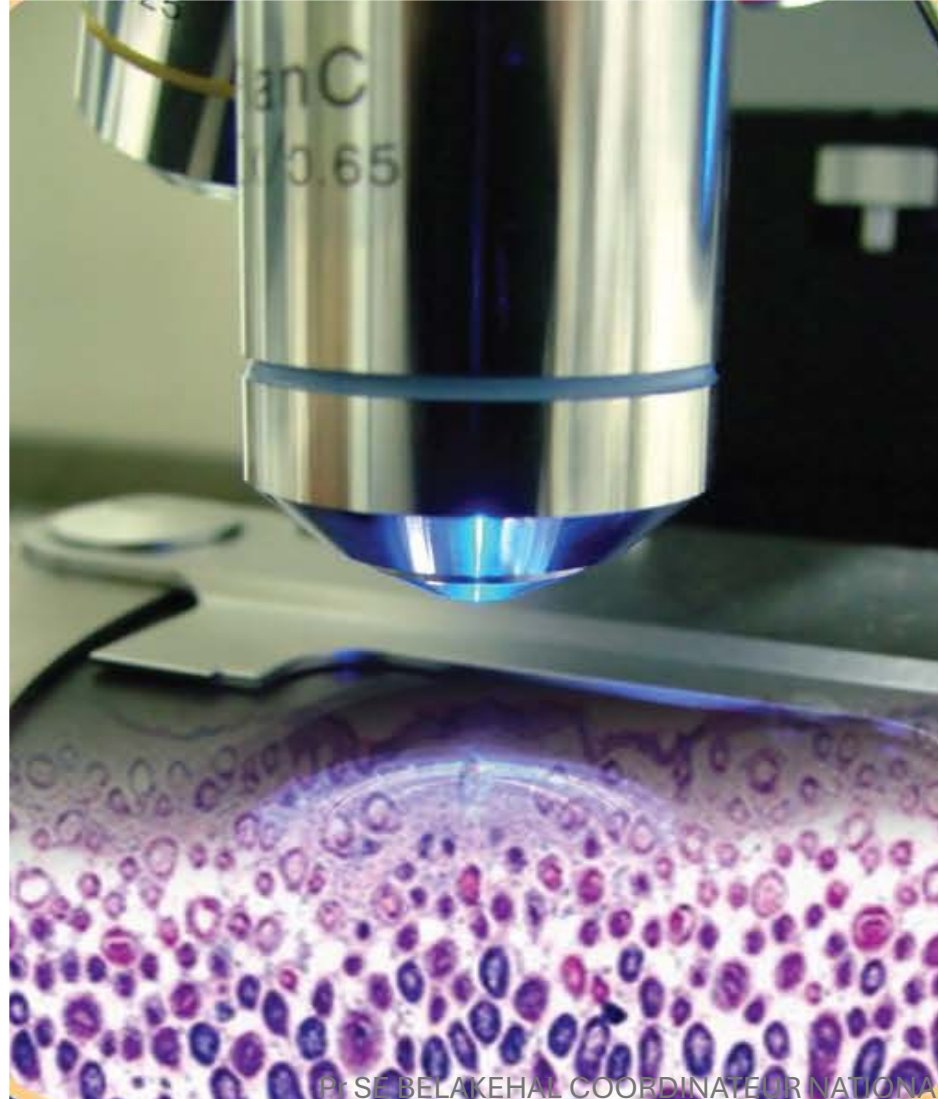


CD45, EMA et KL1

T peu #ciées



Lecture

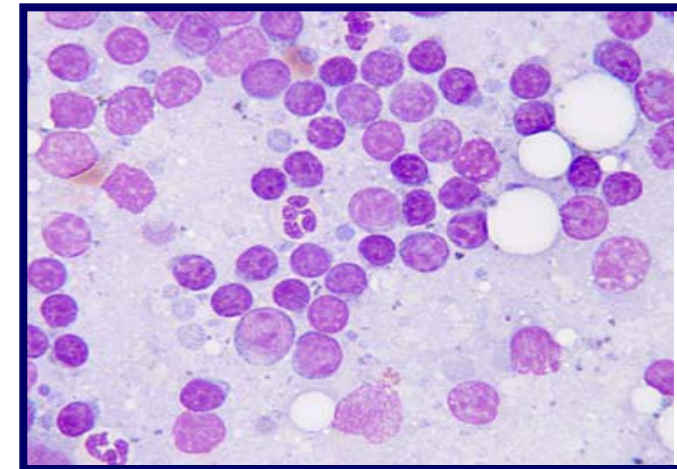


Analyse cytologique fine

Lecture

❖ Devant une lésion ganglionnaire, le pathologiste devra schématiquement répondre aux questions suivantes :

- Est-elle réactionnelle (si oui, y a t'il des éléments d'orientation étiologique ?
- Si elle est tumorale, s'agit-il d'une métastase ou d'un lymphome ?
- S'il s'agit d'un lymphome, quelle est sa classification précise selon le schéma OMS ?

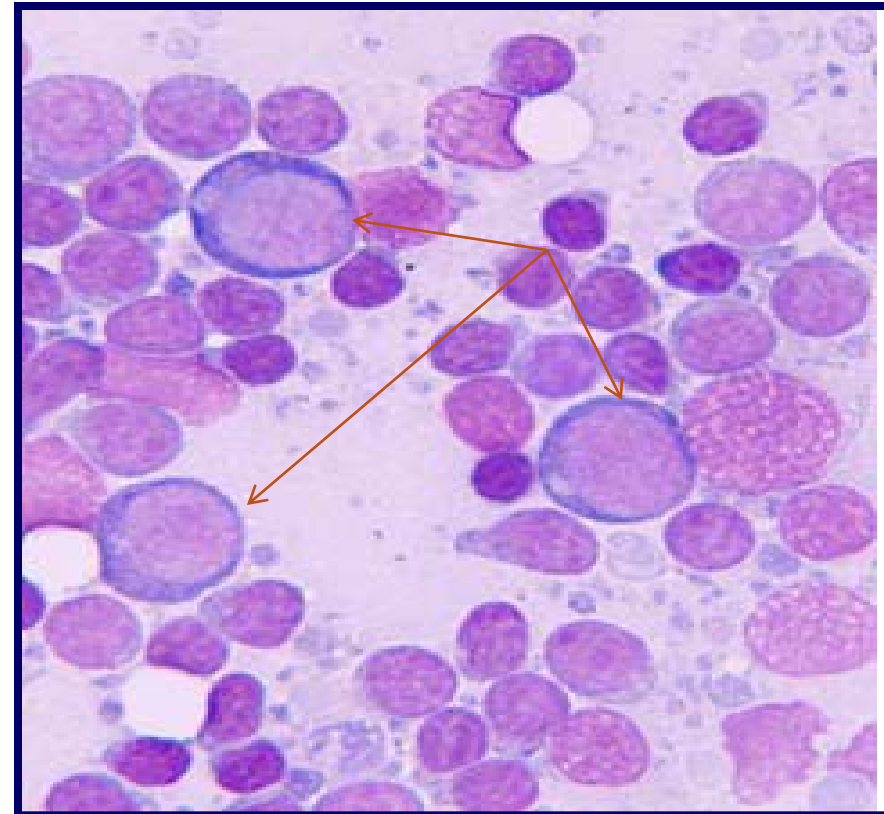


Ganglion Normal

● Lymphoblaste

- < 20%
- Plus grand qu'un neutrophile
- Taille moyenne en général
- Chromatine moins sombre
- Nucléole souvent visible
- Cytoplasme peu abondant

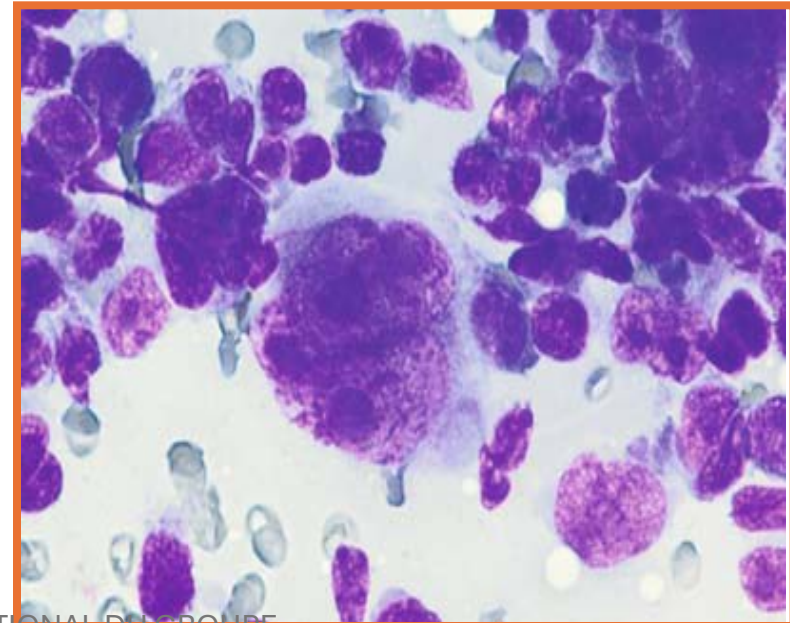
● Lymphocytes matures



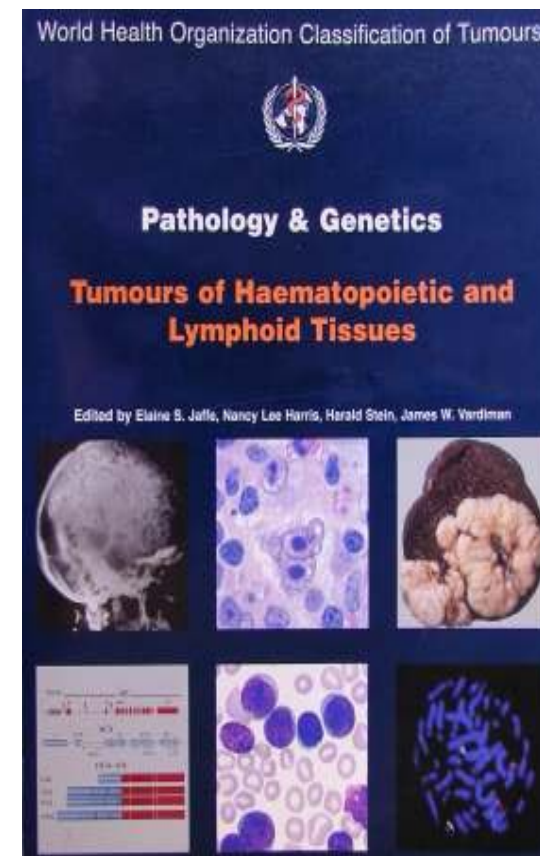
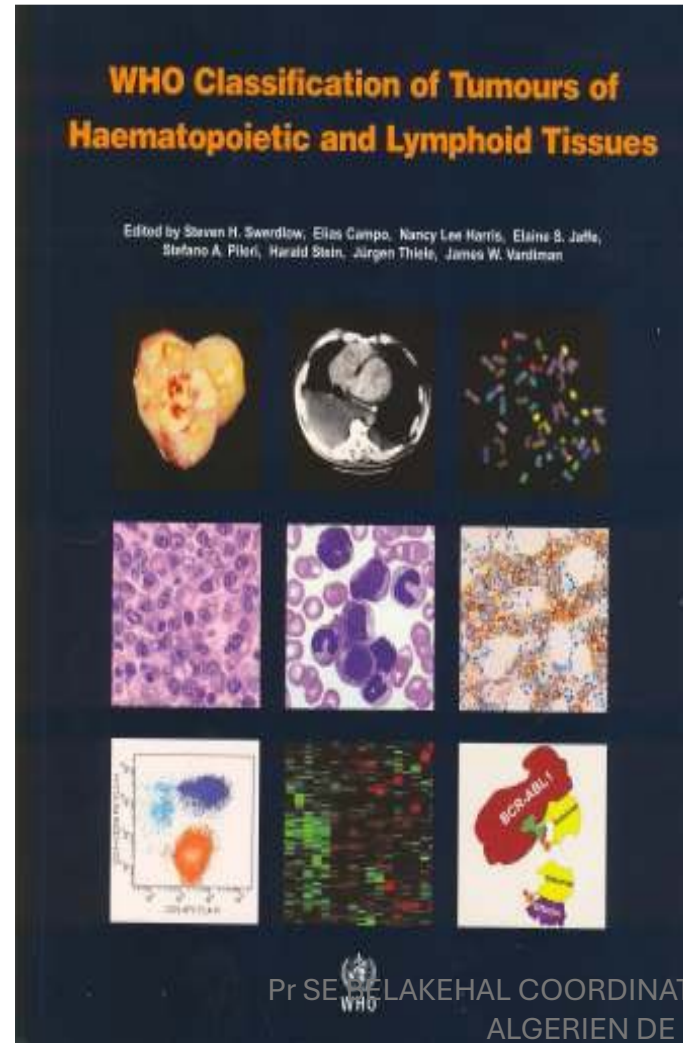
Lymphomes

Approche diagnostique

- ◆ Analyse précise des caractéristiques cellulaires définissant les principales catégories de lymphomes
- ◆ Evaluation des populations lymphomateuses : 5 critères
 - Taille des cellules [Taille du noyau du macrophage ou celle de 2 hématies]
 - Type de cellules
 - Présence des cellules accessoires spécialisées
 - Degré de prolifération
 - Nature de l'environnement non tumoral

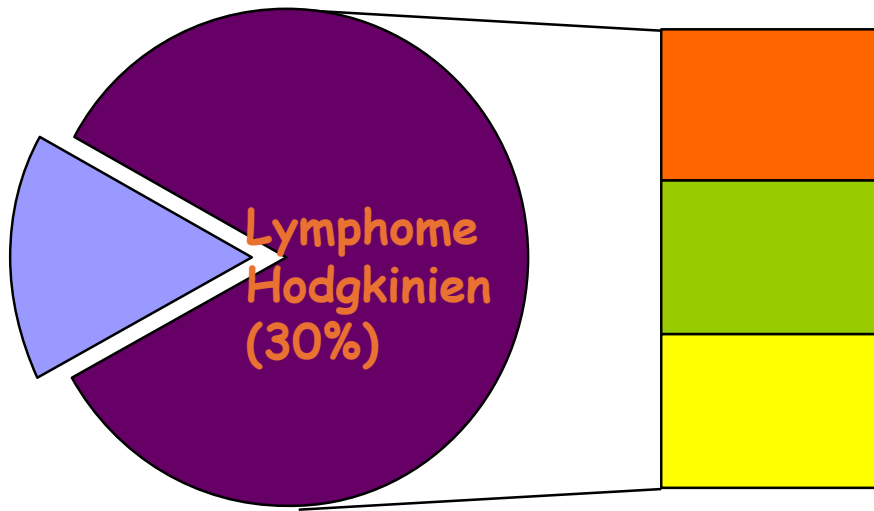


Classification WHO 2008 (4^{ème} Ed.) versus 2001 (3^{ème} Ed.)



Lymphomes

Fréquence relative



Lymphomes ~ 85% type B

Diffus à grandes cellules B
37 %

Folliculaire 29 %

Autres

Lymphomes diffus à grandes cellules B

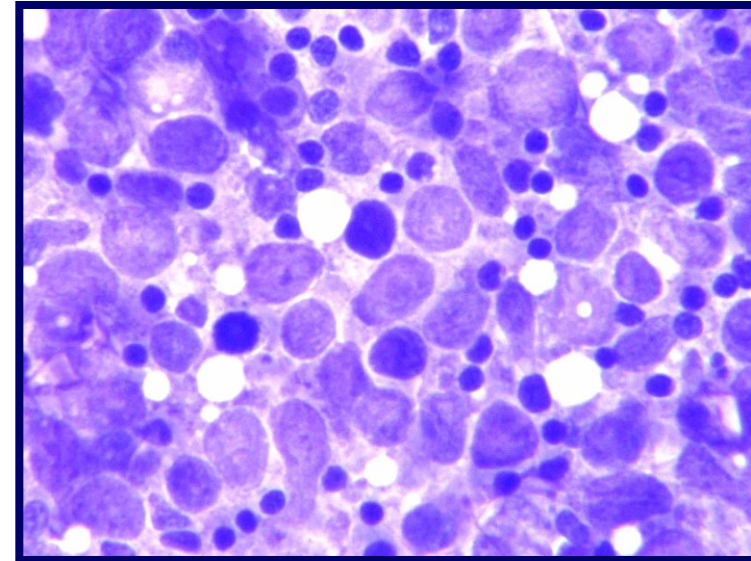
- 25 à 35 % des L Gg* 37 %**
- Terme global: Variantes morphologiques et Sous-types**
- DC cytologique en général aisé

*Akin H et al Leuk Res 28;229-236, 2004

**Bea S et al Blood; 106: 3183-3100,2005; **OMS 2008

Lymphomes diffus à grandes cellules B

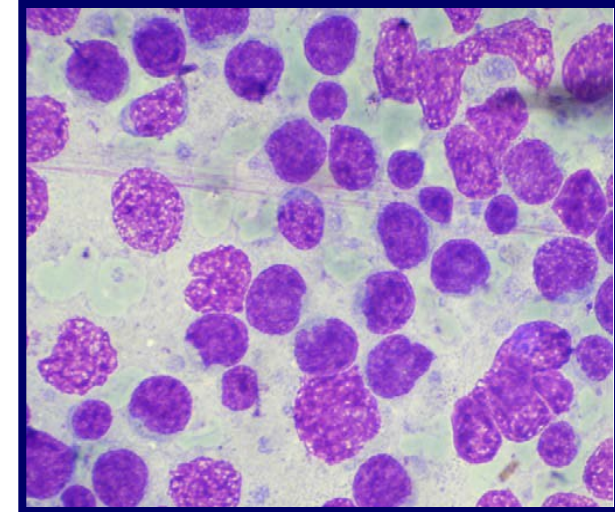
- Population cellulaire hétérogène
 - Centroblastes prédominants
 - Immunoblastes % variable
 - Différenciation plasmocytaire
 - Macrophages à corps tingibles
 - Lymphocytes résiduels ou réactionnels



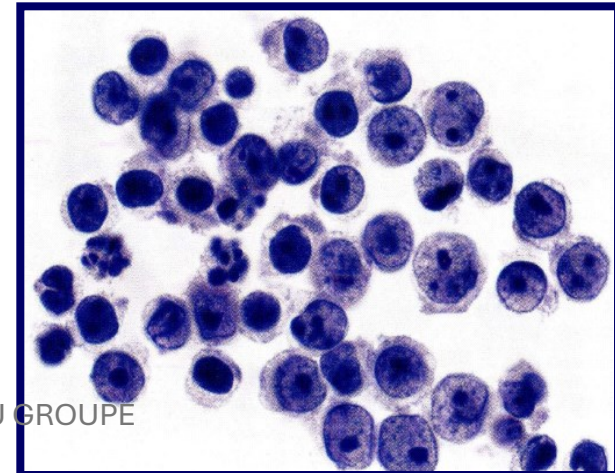
Lymphomes diffus à grandes cellules B

❖ Centroblastes

- Grande taille
- Nx rond excentré (+large/Nx macrophage)
- Chromatine fine ou épaisse
- Un ou plusieurs nucléoles
- Mitoses
- Cytoplasme en couronne basophile



❖ Immunoblastes % variable

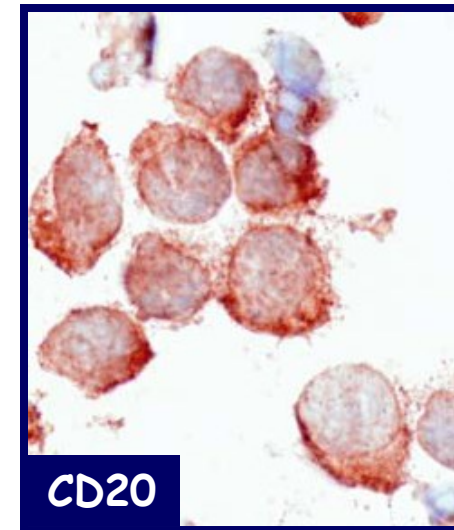


Lymphomes diffus à grandes cellules B

■ Immunophénotype **

Pan B+, IgS+/-

CD45+/-, CD10 +/-



■ Génétique**: Rearrangement de Bcl2, t(14,18) 30%*

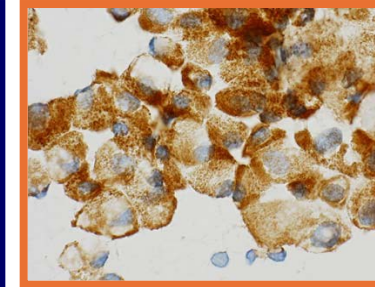
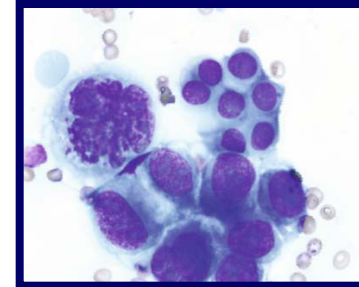
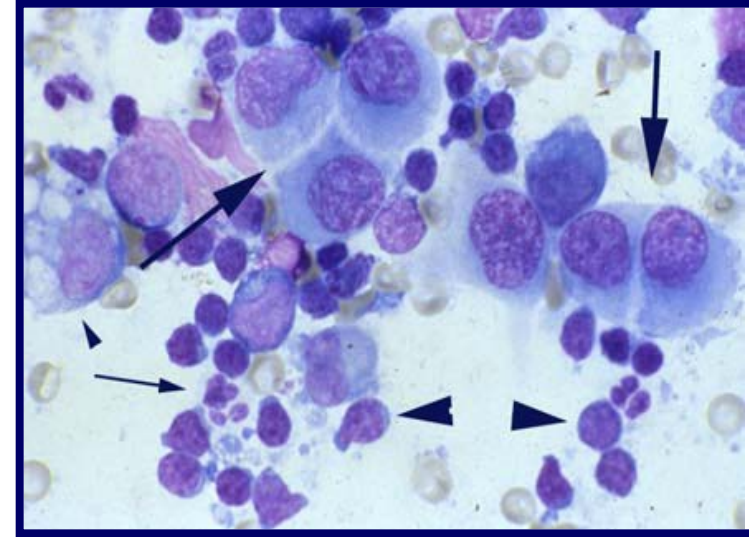
Lymphomes diffus à grandes cellules B

➡ Dg #tiel

➤ Métastases d'un Carcinome à grandes cellules

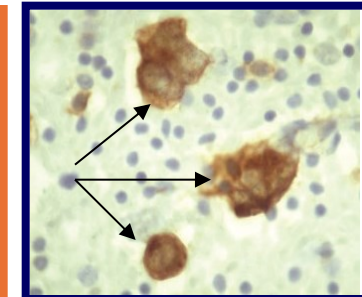
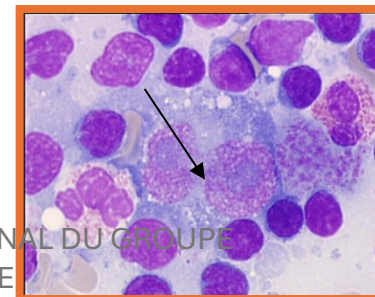
- ≡ macrophages
- Cytoplasme abondant étalé
- Petits lymphocytes

❖ IC : Pan CK +



➤ L. Hodgkinien:

- C. Reed Stenberg
- IC : CD15, CD30, CD45, CD10



Lymphome Folliculaire

- ❖ 20 à 35% * 29 % OMS 2008
- ❖ Progression vers un L diffus à grandes cellules B [30 à 40%] **
- ❖ Cellule d'origine : cellule B centrofolliculaire
- ❖ t(14;18) et réarrangement du gène bcl-2 (70 à 95%) ***

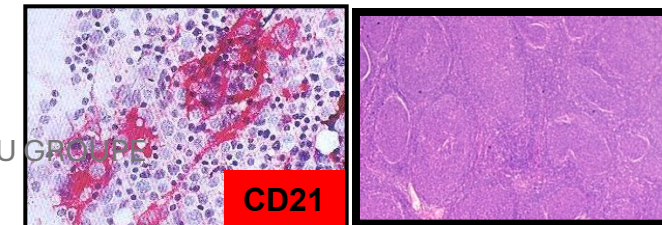
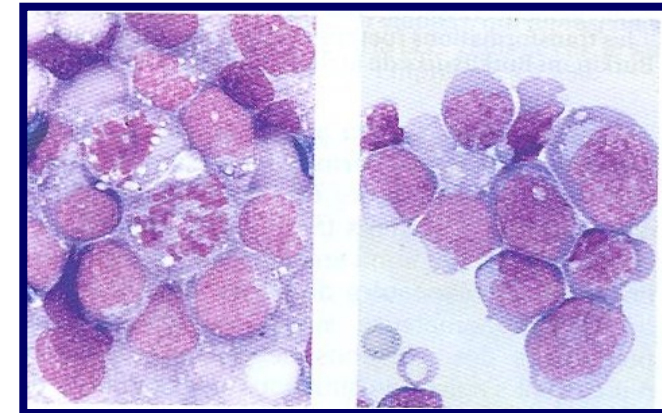
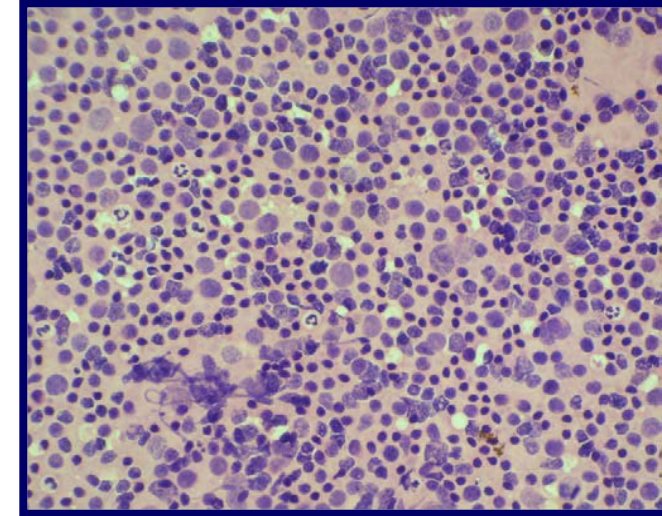
*C. Doyen;EMC-Hématologie 2004

**Hans CP, Blood 101:2363-2367;2003

***Aster JC et al Am J Pathol 160:759-763;2002

Lymphome Folliculaire

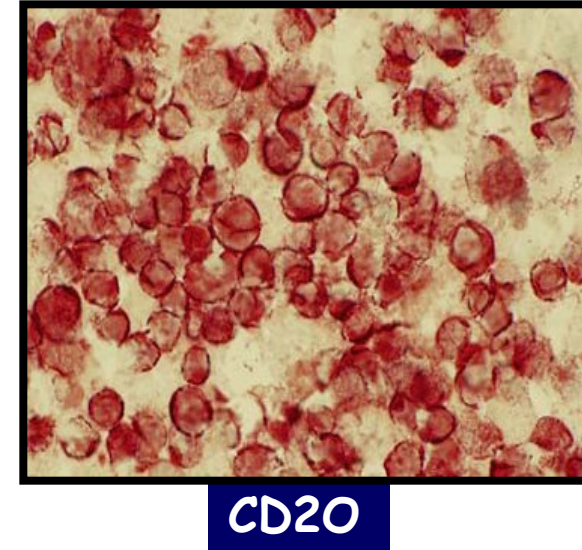
- Population cellulaire hétérogène
- Caractères cohésifs des cellules
- Centrocytes prédominants:
 - Cytoplasme peu abondant
 - Chromatine épaisse et mottée
 - Indentations et encoches du Nx
 - Nucléole non visible
- Centroblastes typiques
- Cellules dendritiques peu nombreuses et dispersées révélées par Immunocytochimie (ICC)



Lymphome Folliculaire

❖ Immunophénotype

- Pan B+, sIg+, CD5-, CD23-
- Bcl-2+ (75% à 95%), CD10+
- Réseau de CFDs: CD21, CD35, Ac DRC



Lymphome Folliculaire

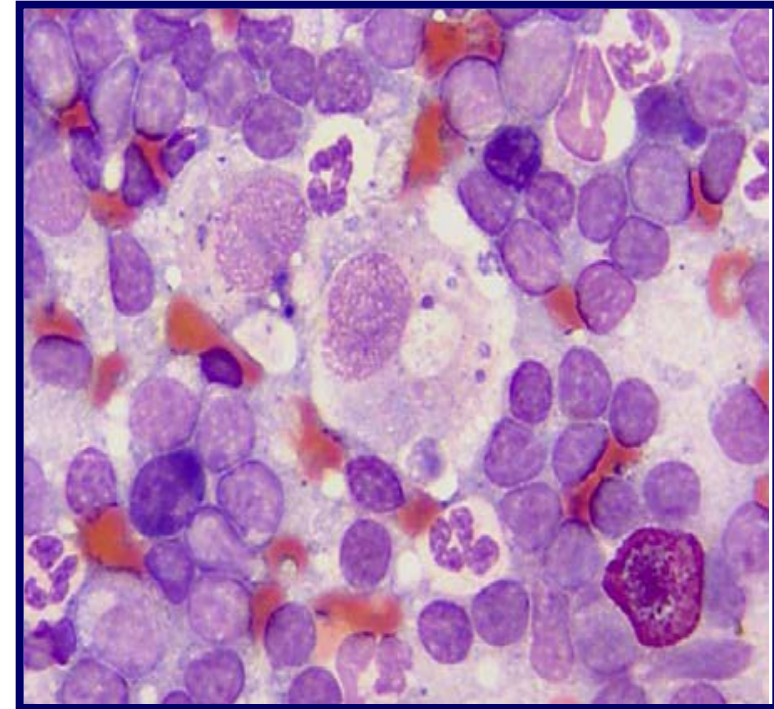
❖ Diagnostic différentiel

- Hyperplasie folliculaire
- L. du Manteau
- L. Zone marginale

Hyperplasie folliculaire

◆ Polymorphisme cellulaire

- ⊕ Plages ± dense de centroblastes avec mitoses
- ⊕ Centrocytes
- ⊕ Rares immunoblastes et plasmocytes
- ⊕ Macrophages à corps tingibles [MCTs]
- ⊕ Cellules dendritiques folliculaires [CDFs] noyaux en doublets, CD35+ et CD21+
- ⊕ Petits lymphocytes dispersés ou groupés
- ⊕ Diagnostic #tiel: LF à grandes cellules centroblastiques (G3)



Lymphome Folliculaire

❖ Diagnostic différentiel

- Hyperplasie folliculaire
- L. du Manteau
- L. Zone marginale

Lymphome du manteau

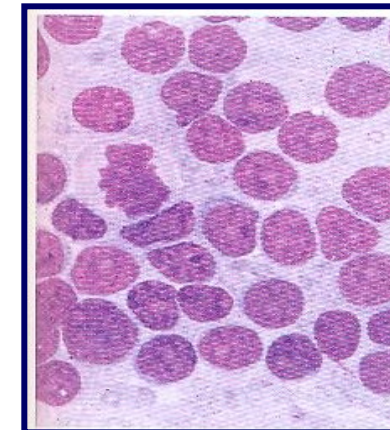
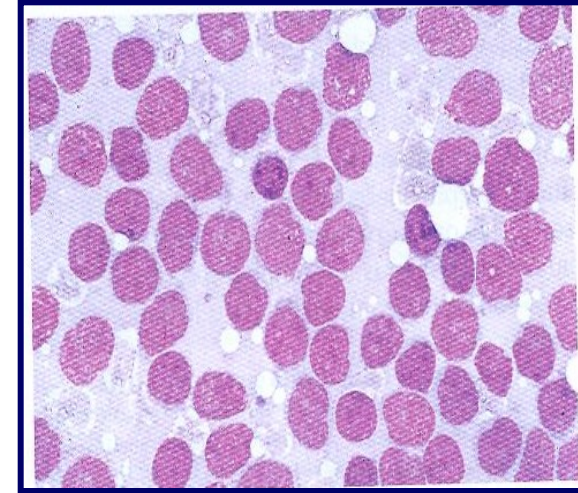
❖ *Aspect monotone*

❖ *Lymphocytes de taille petite à moyenne*

- Nx irrégulier ou "clivé", parfois rond régulier
- Chromatine dense, nucléole à peine visible
- Cytoplasme étroit et pâle

❖ *Pas ou très peu de centroblastes ou immunoblastes, pas de différenciation plasmocytaire*

● *Variante "blastoïde" : Noyaux plus grands, Chromatine plus dispersée, Index mitotique élevé*



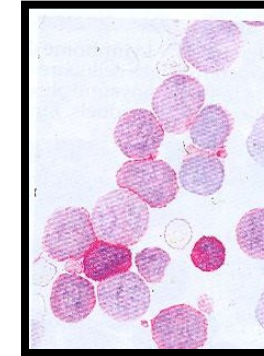
Lymphome du manteau

❖ Immunophénotype:

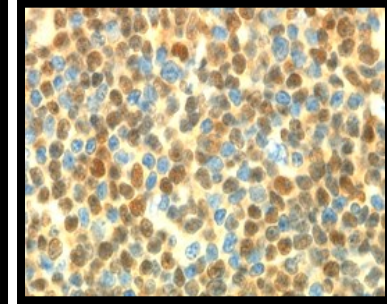
Pan B+, CD5+, Bcl-2+, IgM+, sIgD+,
CD21+, Cycline D1+, CD10-, CD23-

❖ Biologie moléculaire

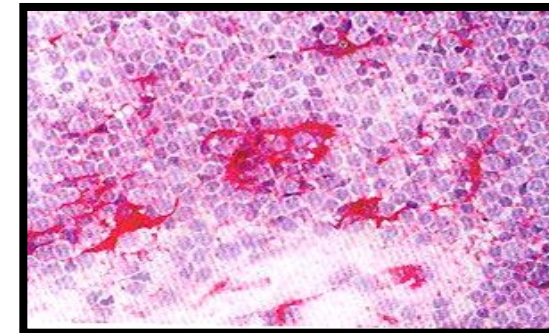
- Atteinte du locus bcl-1
- Translocation (11;14)(q13;q32)
- Surexpression de cycline D1



CD5+



Cycline D1+



CD21 Réseau de CFDs

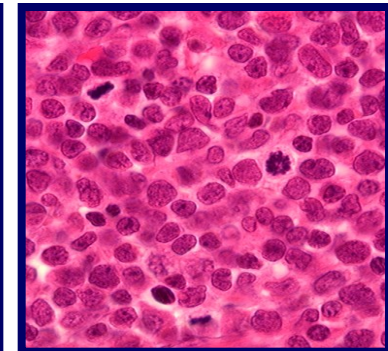
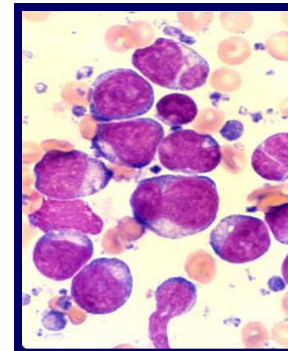
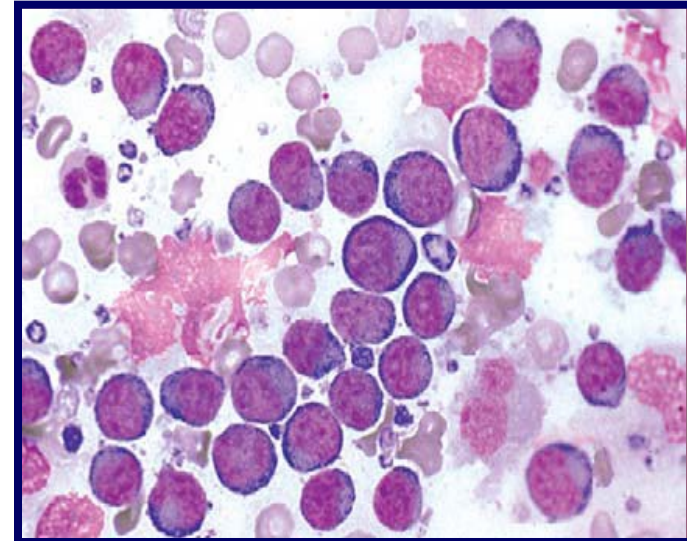
Lymphome Folliculaire

❖ Diagnostic différentiel

- Hyperplasie folliculaire
- L. du Manteau
- L. Zone marginale [ganglionnaire rare]

Lymphome Lymphoblastique

- ❖ 1 à 4 % des L. Gg*
- ❖ Aspect homogène
- ❖ Lymphoblastes [98%]
 - Taille petite ou moyenne
 - Noyau ± irrégulier, Chromatine fine
 - Nucléole à peine visible
 - Cytoplasme étroit
 - Nombreuses mitoses
- ❖ LAL B: CD10+, CIgM±, TdT +
- ❖ LAL T: CD5+, CD3±



Lymphome de Burkitt

❖ 0,8 % OMS 2008

❖ Endémique

- Afrique et autres régions tropicales
- Enfant++, Mâchoire++
- Association à EBV: > 90%

❖ Sporadique

- Localisation intra-abdominale
- Ganglion, plus fréquent chez l'adulte
- Association à EBV: 20%

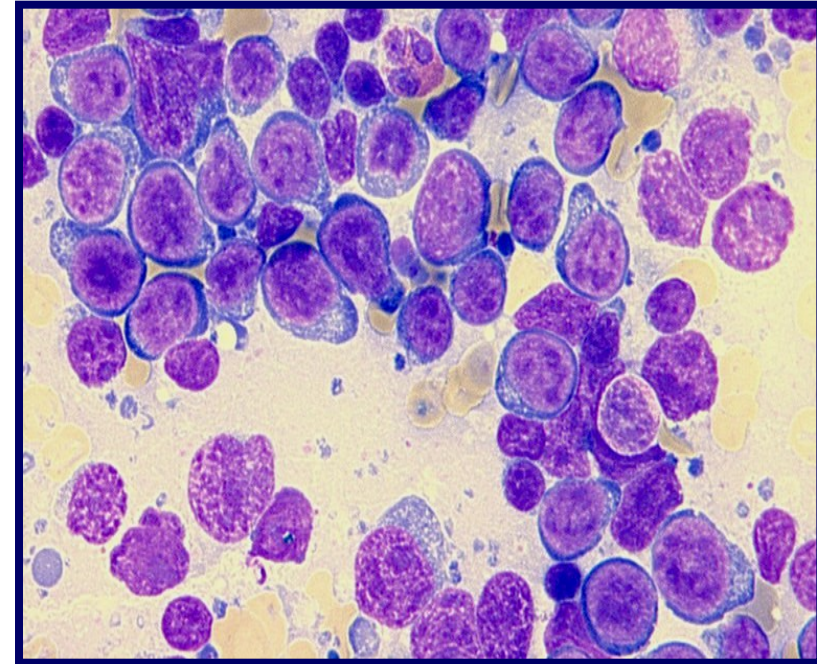
❖ Associé à une immunodéficiência

- La plupart HIV+
- Souvent ganglionnaire
- Association à EBV: 40%

Lymphome de Burkitt

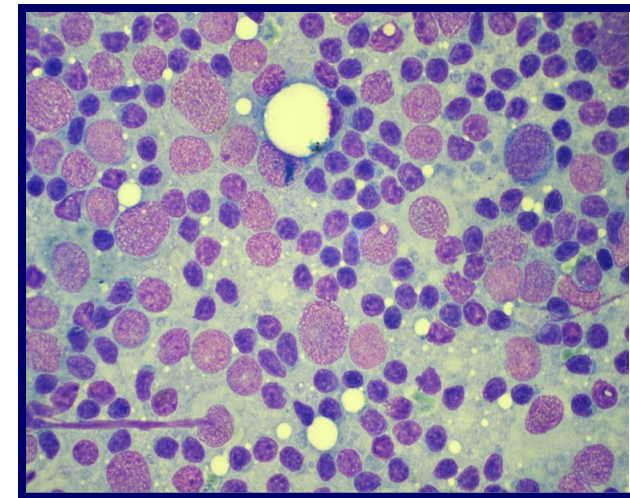
◆ Cytologie

- ✓ Cellules de taille moyenne, cohésives
- ✓ Fine couronne cytoplasmique basophile avec des vacuoles lipidiques
- ✓ Noyau rond, +/- irrégulier
- ✓ Chromatine en mottes
- ✓ Nucléoles multiples (2-5) centraux, de taille moyenne
- ✓ Nombreuses mitoses



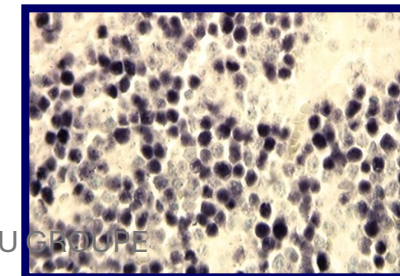
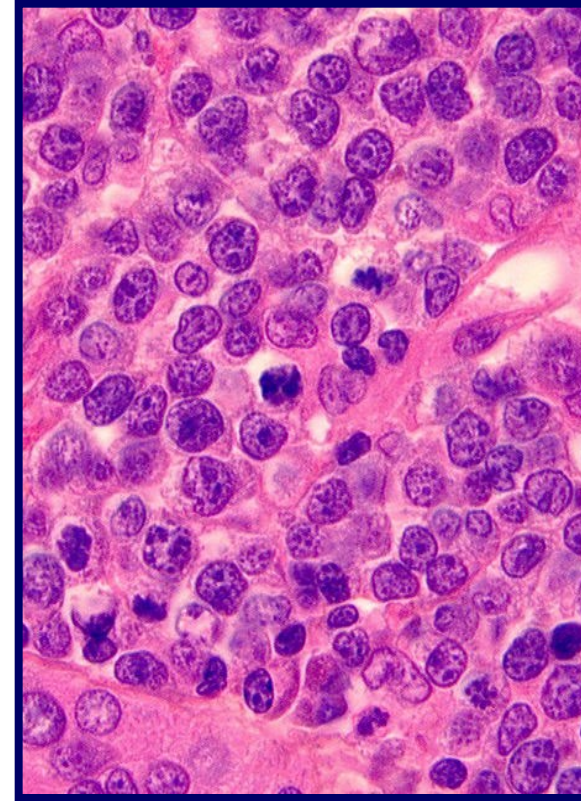
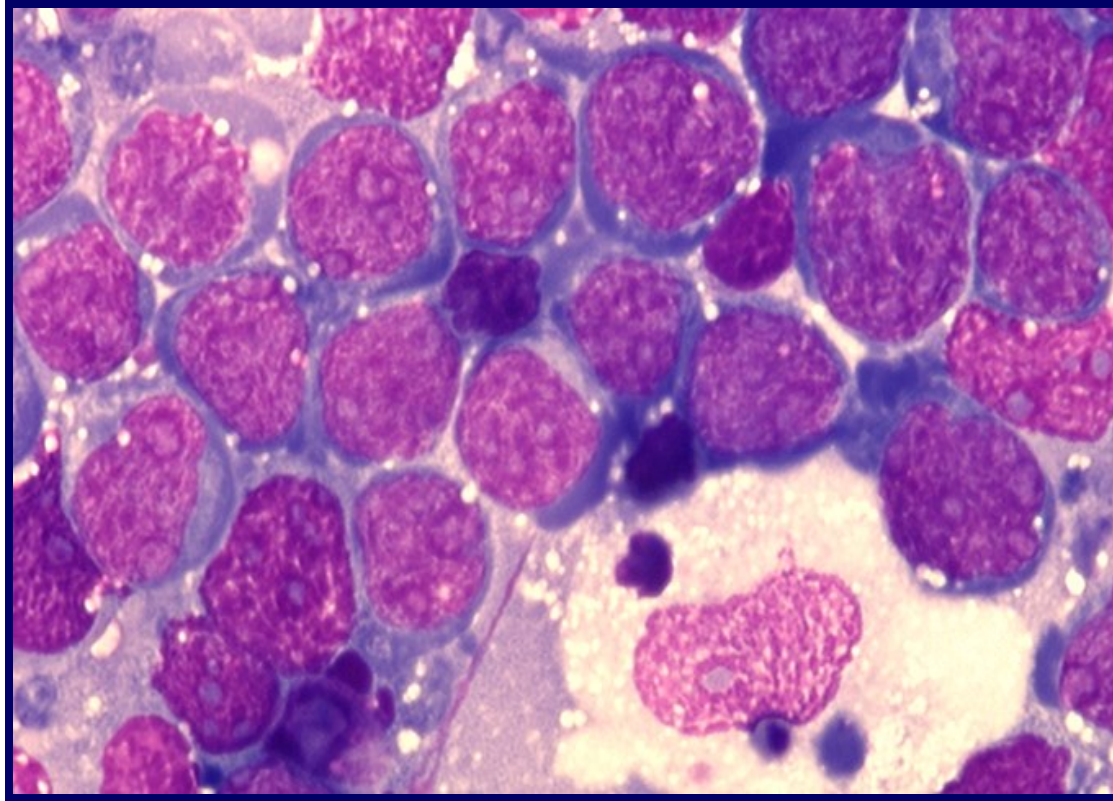
- ## ◆ Immunophénotype :
- Pan B +, sIgM +
CD10 +, bcl-2 - Ki67 > 90%
CD5 -, CD23 -, TdT -

- ## ◆ Biologie moléculaire:
- t(8;14)(q24;32)* et variantes
Réarrangement de c-myc



Lymphome de Burkitt

Classique sporadique EBV+

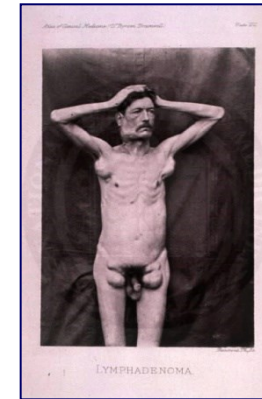


EBER

Lymphome Hodgkinien



Thomas Hodgkin
(1798-1866)



≈ 30% des lymphomes

WHO 2008

1 - *Forme nodulaire à prédominance Lymphocytaire*

2 - *Forme classique*

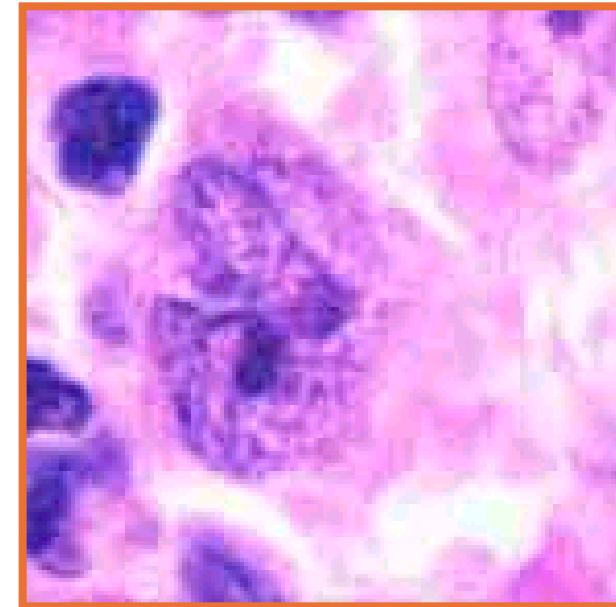
Lymphome Hodgkinien

Forme nodulaire à prédominance Lymphocytaire

❖ 6% LH*

❖ Cellule type "popcorn"

❖ CD20+, CD10+, Bcl-6+

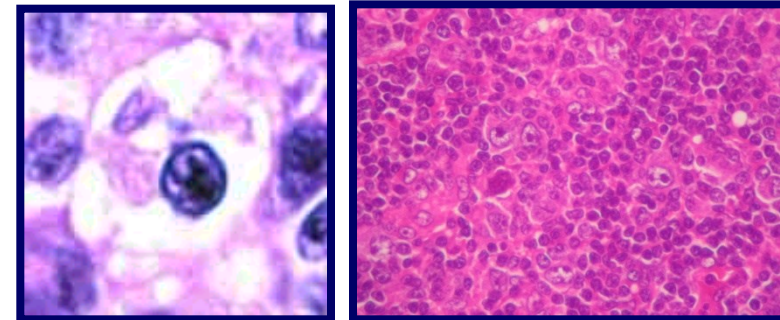
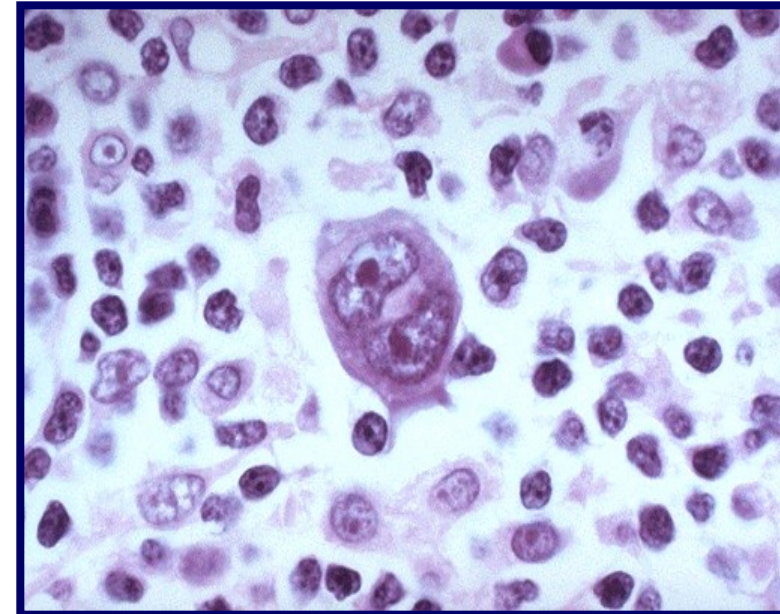


Cellule type "popcorn"

Lymphome Hodgkinien

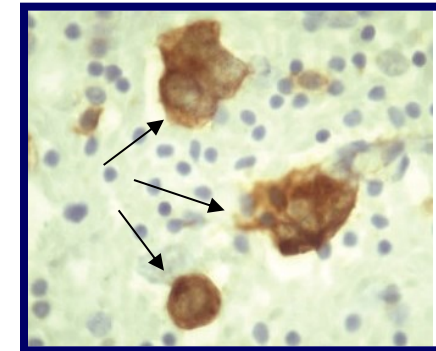
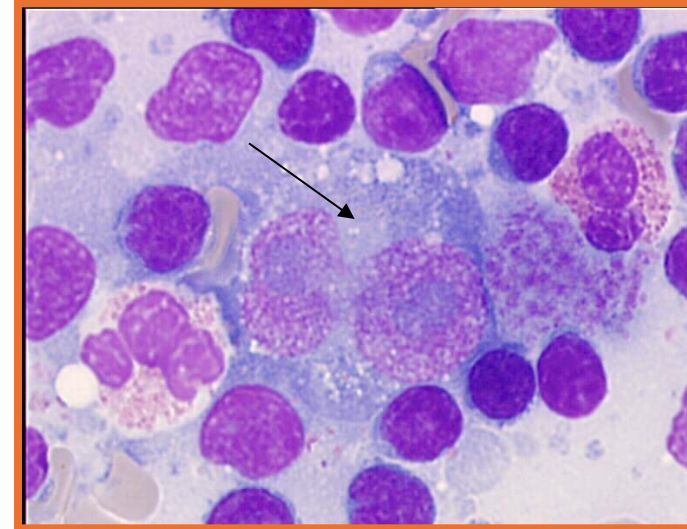
Forme classique

- ❖ 95 % LH
- ❖ Cellule de Reed-Sternberg
- ❖ Cellules de Hodgkin au noyau unique monolobé avec un volumineux nucléole
- ❖ Cellules lacunaires
- ❖ PNE, plasmocytes, histiocytes, lymphocytes T,C. épithélioïdes



Cellule de Reed-Sternberg

- ❖ Carl Sternberg 1898 et Dorothy Reed 1902
- ❖ Très grandes cellules de 50 μ diamètre
- ❖ Noyau bi-ou polylobé avec une chromatine finement réticulée et des nucléoles souvent unique mais volumineux et basophiles donnant un aspect en « masque de carnaval » ou « œil de hibou »
- ❖ Expriment CD20 , CD15, CD30, EMA(-)



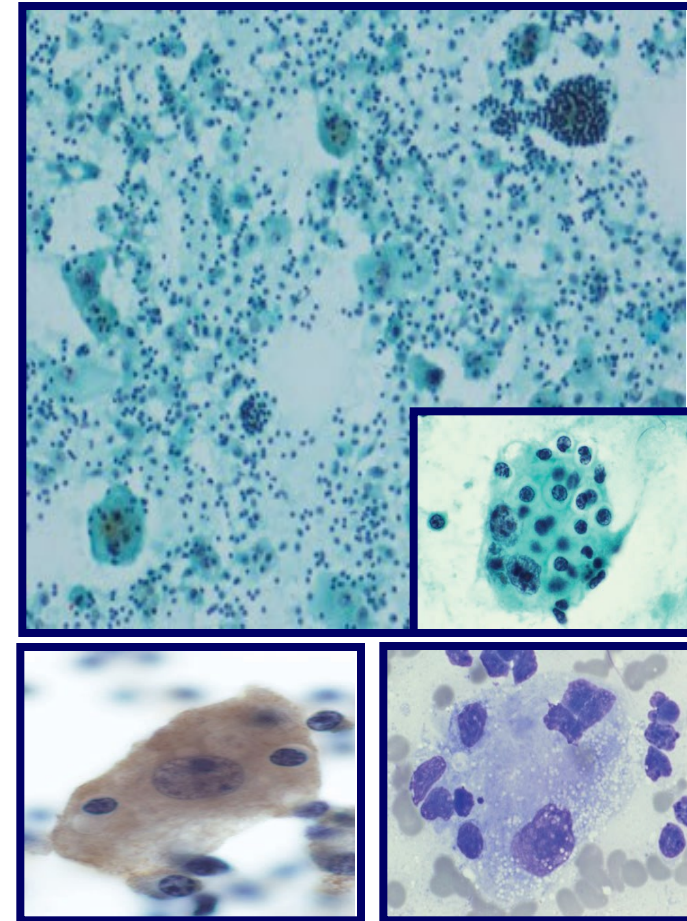
Lymphome Hodgkinien

❖Diagnostic #tiel:

- Adenite réactionnelle
- Lymphomes diffus à grandes cellules B : variantes et s/types
- *L.T riche en cellules épithéloïdes ou angio-immunoblastique*
- *Syndrome de Rosai-Dorfman*
- *Metastases*

Syndrome de Destombes-Rosai-Dorfman

- Histiocytose Sinusale avec lymphadénopathies massives
- Pseudo lymphome
- Prédominance de lymphocytes petits matures et plasmocytes
- Présence de large histiocytes de taille variable [80-180 μm], avec phagocytose des cellules hématopoïétiques
- ICC : LCA, CD68, S-100 positifs



S-100

Conclusion

- Le Dc de lymphome est l'un des plus difficile
- Rôle capital de l'histopathologie pour le diagnostic des lymphomes
- Analyse cytologique /
Associée aux données histologiques
et au contexte clinique
- Intérêt :
 - Surveillance :
 - Ganglions résiduels
 - Rechutes
- Collaboration Anatomo-clinique



Merci

CMF et thrombopathies congénitales

Introduction (1)

Service d'Hématologie==> depuis juin 2007

Cytométrie en flux==> depuis juillet 2008 (08 mois)

Beckmann Coulter 04 couleurs Epics XL-MCL

- **Cytométrie en flux sur cytoponction.**
 - **Phénotype et suivie des SLP et LA (sang + MO)**
 - **Recherche de clone HPN**
 - **Phénotypage plaquettaire**
 - **Quantification d'ADN au PI et cycle cellulaire**
- (Recherche Univ. Oran Département de Biologie)**

Introduction (2)

Les thrombopathies congénitales sont des anomalies héréditaires et fonctionnelles des plaquettes.

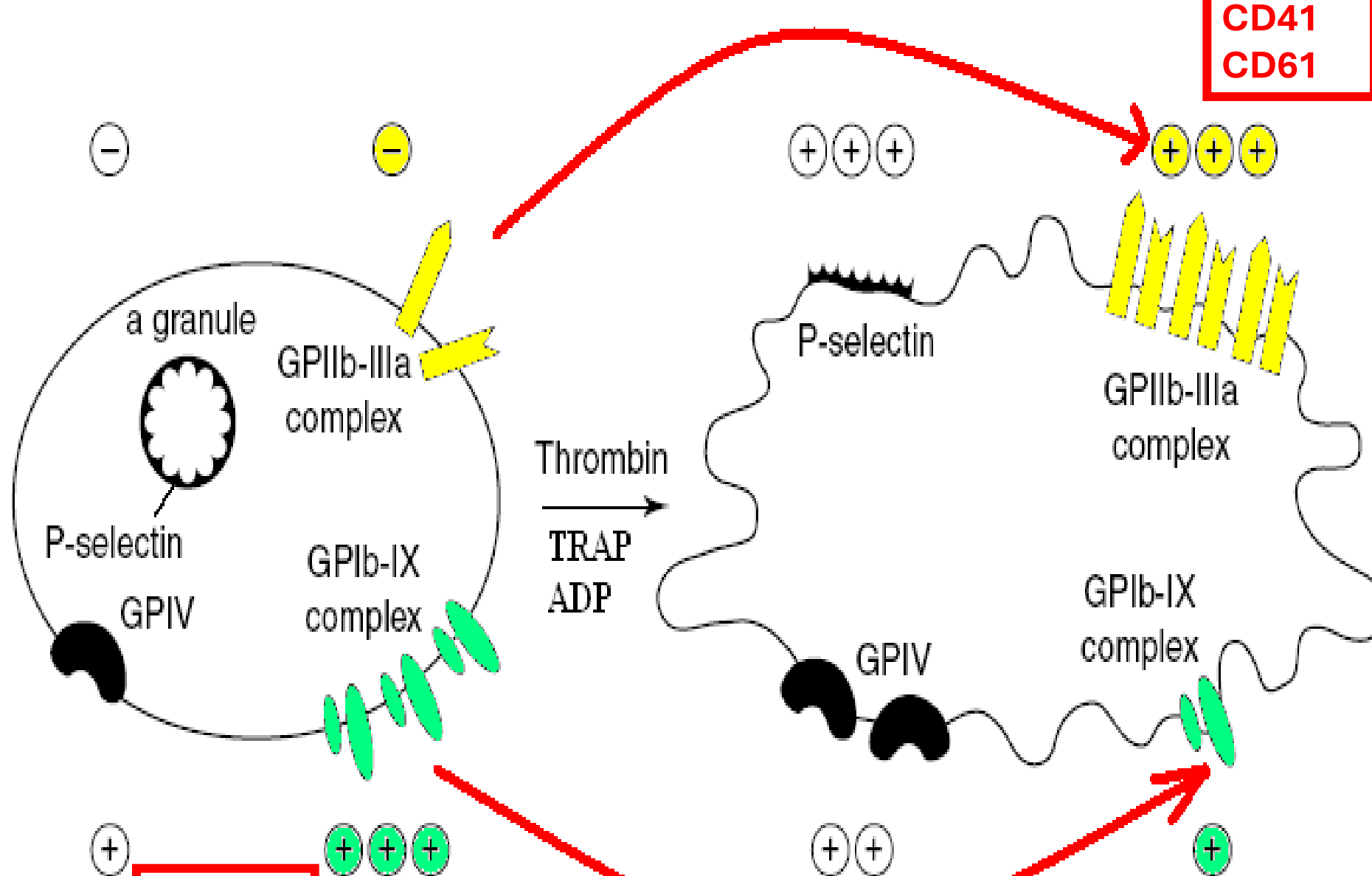
La Thrombasthénie de Glanzmann et le syndrome de Bernard Soulier sont les anomalies les plus recherchées par cytométrie en flux

Introduction (3)

- La thrombasthénie de Glanzmann est due à un déficit quantitatif ou qualitatif des GPIIb/IIIa et aboutit à un défaut d'agrégation plaquettaire
- Le syndrome de Bernard Soulier est dû à un déficit de GPIb-IX, entraînant un défaut de l'adhésion plaquettaire au sous endothélium

RESTING PLATELET

ACTIVATED PLATELET



Intérêt de la CMF

- La détection des GP de membrane
- La quantification indirecte de ces GP grâce à l'Intensité Moyenne de Fluorescence(IMF) avant et après activation.

Quantification de l'expression des glycoprotéines plaquettaires

par cytométrie en flux

QUANTIFICATION DES GLYCOPROTEINES PLAQUETTAIRES (Trousse Platelet Gp Biocytex- Diagnostica Stago)

Prélèvement du : 08/02/2006 Anticoagulant Citrate

Heure d'arrivée du tube :

Renseignements cliniques et biologiques : Syndrome de Bernard Soulier

Préparation : Sang total

Nombre de sites occupés par l'anticorps x 10 ³ par plaquette	Valeurs obtenues pour le patient		Valeurs de référence indiquées par le fabricant	
	Etat Basal	Activation TRAP	Etat Basal	Activation TRAP
GP II b/III a CD 41 a	129	140.6	37-65	58-112
GP III a CD 61	132.3	125.4	41-65	56-108
GP I b α CD 42 b	0.5	0.6	27-49	9-29
GMP 140 CD 62 P	1	6.9	< 1	>1

TRAP : "Thrombin Receptor Agonist Peptide"

Technique de marquage (1)

Pour chaque échantillon :

Un marquage avant activation:

	FITC	PE
TUBE 1	IgG1	IgG2
TUBE 2	CD42b	CD41
TUBE 3	CD61	---

Un marquage après activation ADP

TRAP(Thrombin Receptor Agonist Peptide):

	FITC	PE
TUBE 1'	IgG1	IgG2
TUBE 2'	CD42b	CD41
TUBE 3'	CD61	---

Technique de marquage (2)

- 1. Le Sang est prélevé sur un tube EDTA**
- 2. Préparation du PRP :centrifugation du sang total à 130g pendant 10 min**
- 3. Dilution du PRP dans du PBS afin d'obtenir une concentration de 20×10^3 plaquettes/ μ l**
- 4. 100 μ l de la dilution + 20 μ l ACM**
- 5. Incubation 20 mn à l'obscurité**
- 6. Lavage avec 2 ml de PBS**
- 7. Suspendre le culot dans 500 μ l de PBS**

Acquisition et Gating (1)

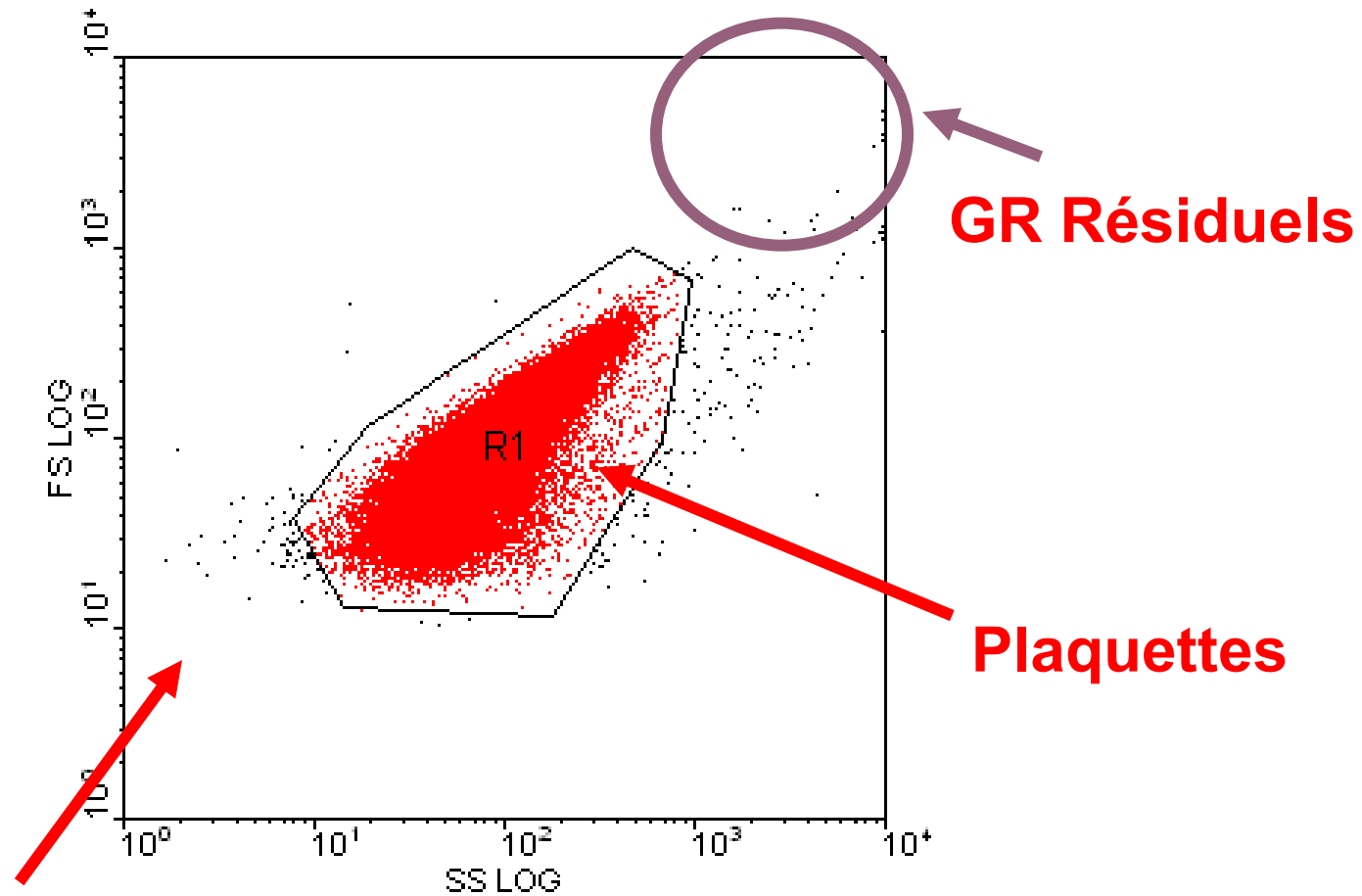
- Beckmann Coulter 04 Couleurs type EPICS XL-MCL

- FSC-H
- SSC-H
- FL1-H
- FL2-H

Échelle logarithmique

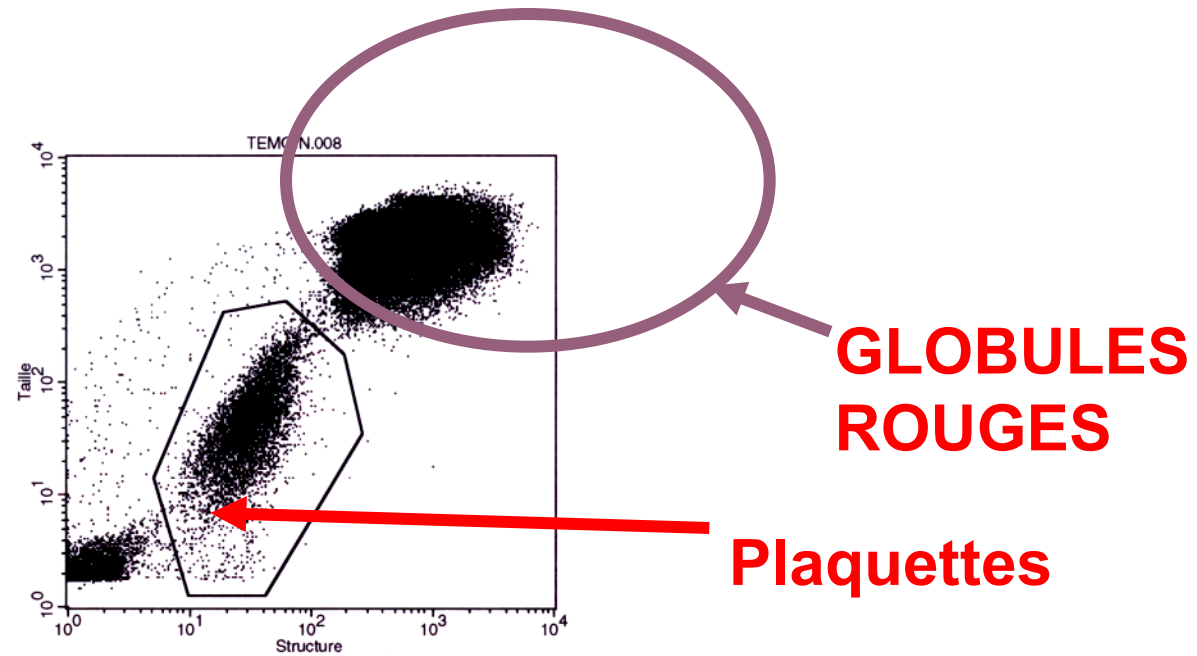
Acquisition et Gating (2)

PRP + Échelle logarithmique



Acquisition et Gating (3)

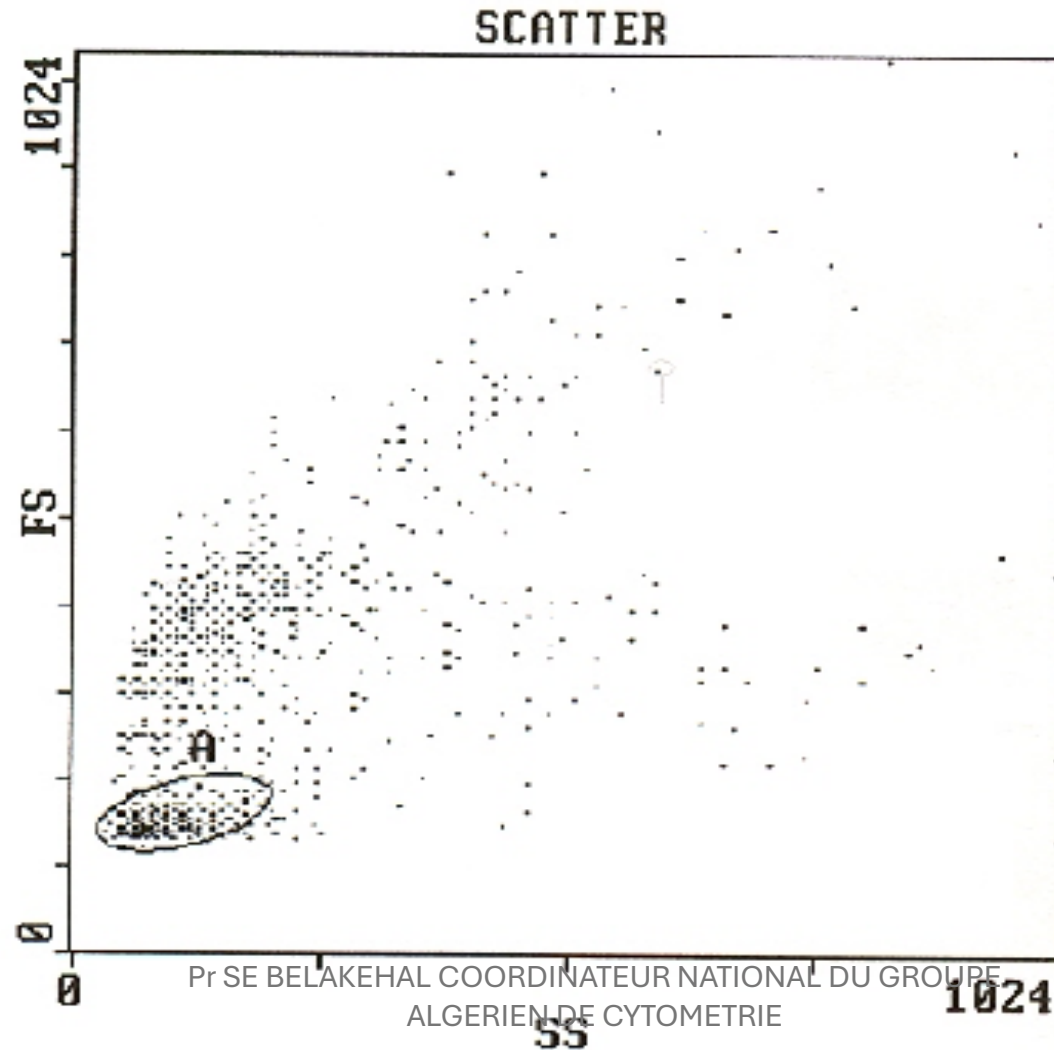
Sang total + Échelle logarithmique



Débris

Acquisition et Gating (4)

PRP + Échelle linière



Thrombasthénie de Glanzmann

Classification

(Nurden et al. Blood 1985)

Type1: déficit quantitatif sévère en GPIIbIIIa (moins de 5% du taux normal)

Type2: déficit quantitatif modéré en GPIIbIIIa (5–20% du taux normal)

Type3: anomalie qualitative de la GPIIbIIIa avec une quantité sub normale

Thrombasthénie de Glanzmann

Classification

(Elleuch et al. 4èmes Journées Maghrébines d'Hématologie 2007)

Type I

**IMF (CD41a): 0 à 20 % de la normale
et/ou**

IMF (CD61): 0 à 2 % de la normale

Type II ou variants:

**IMF (CD41a) > 20 % de la normale
et**

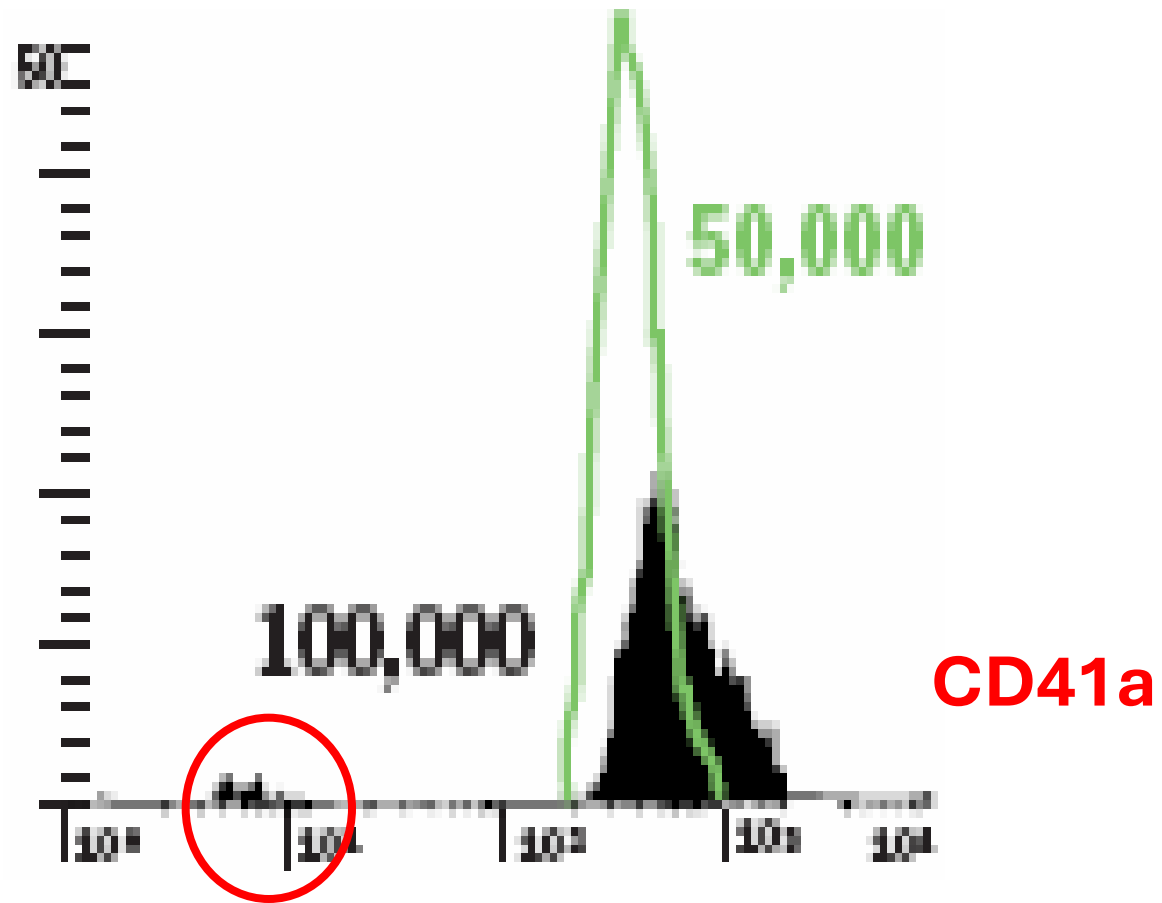
IMF (CD61) > 2 % de la normale

M. Kannan et al. Glanzmann's thrombasthenia in North Indians: Sub classification and **carrier detection** by flow cytometry. Platelets, February 2009; 20(1): 12–15



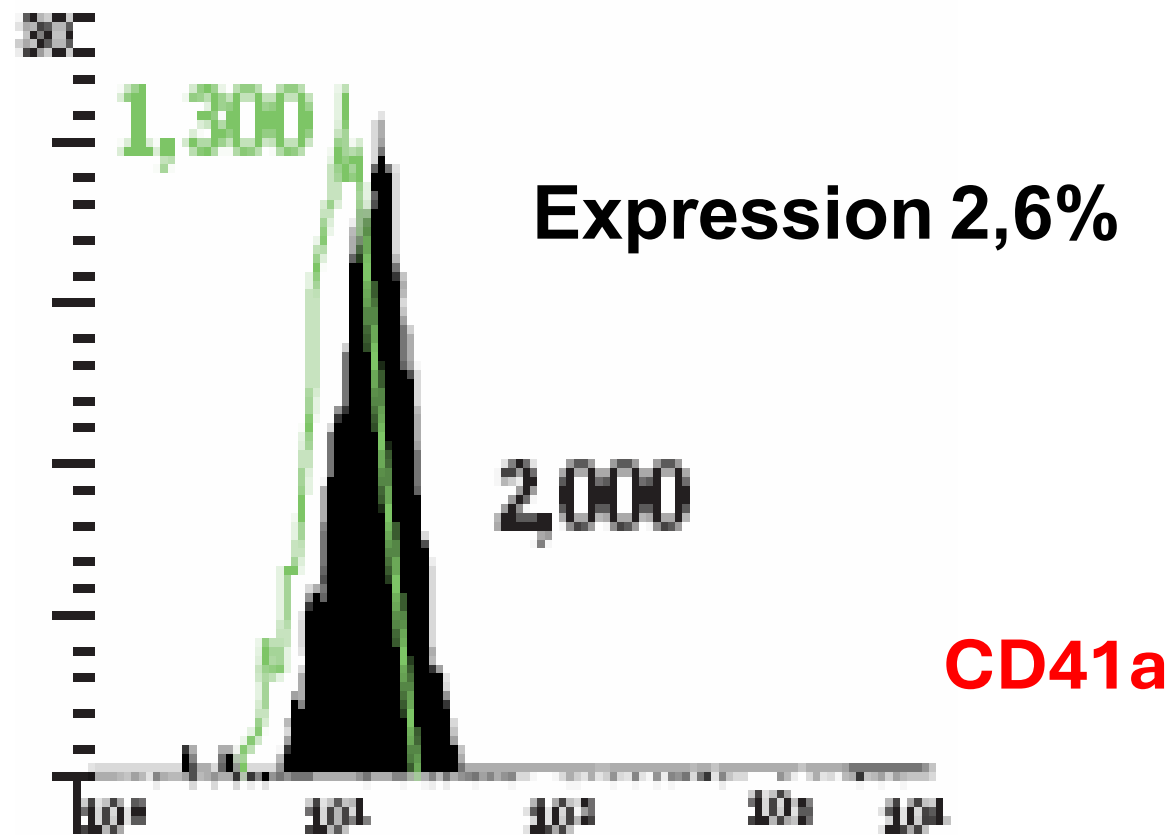
(TG) Les Types 2 étaient des hétérozygotes conducteurs de la maladie

Thrombasthénie de Glanzmann (Exemple)



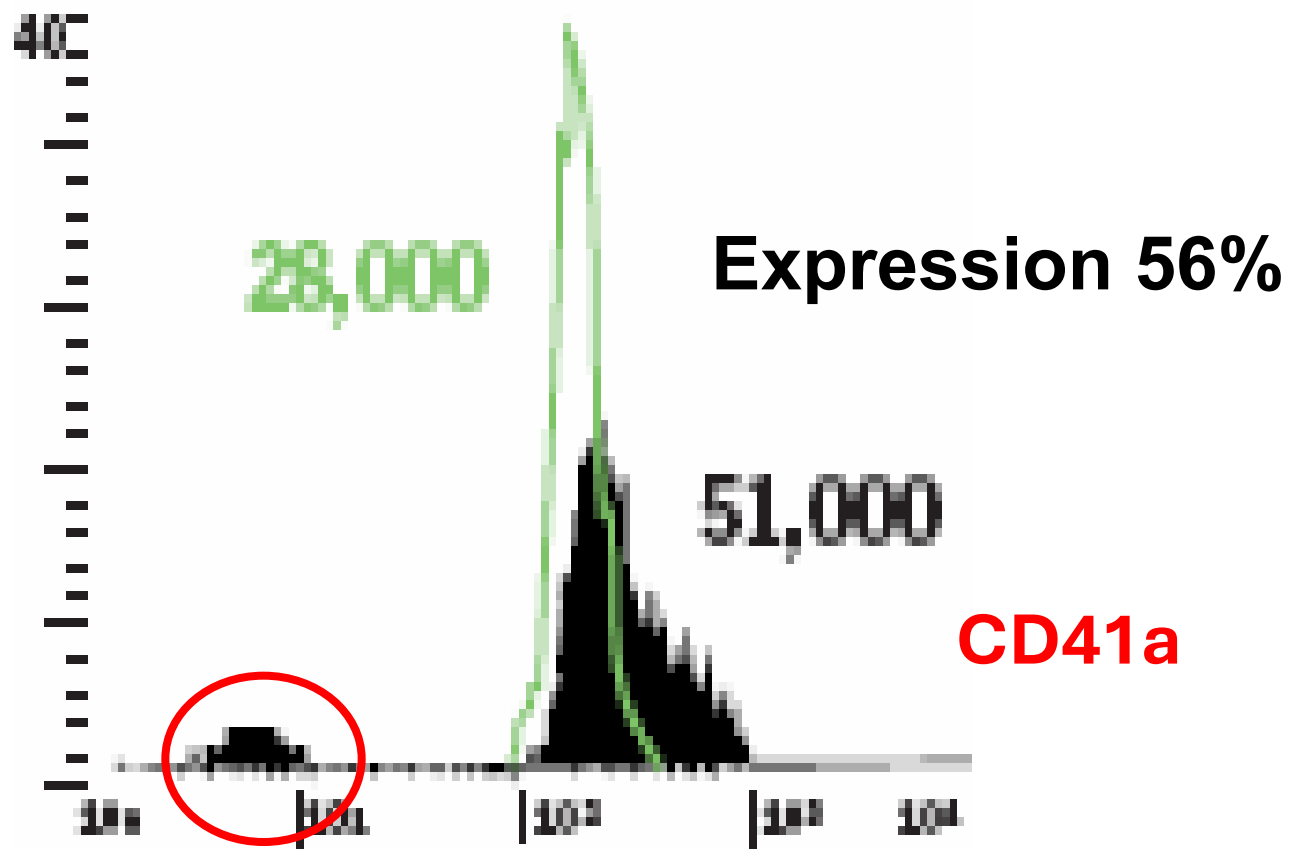
TEMOIN
Normal

Thrombasthénie de Glanzmann (Exemple)



Père
Homozygote
Type 1

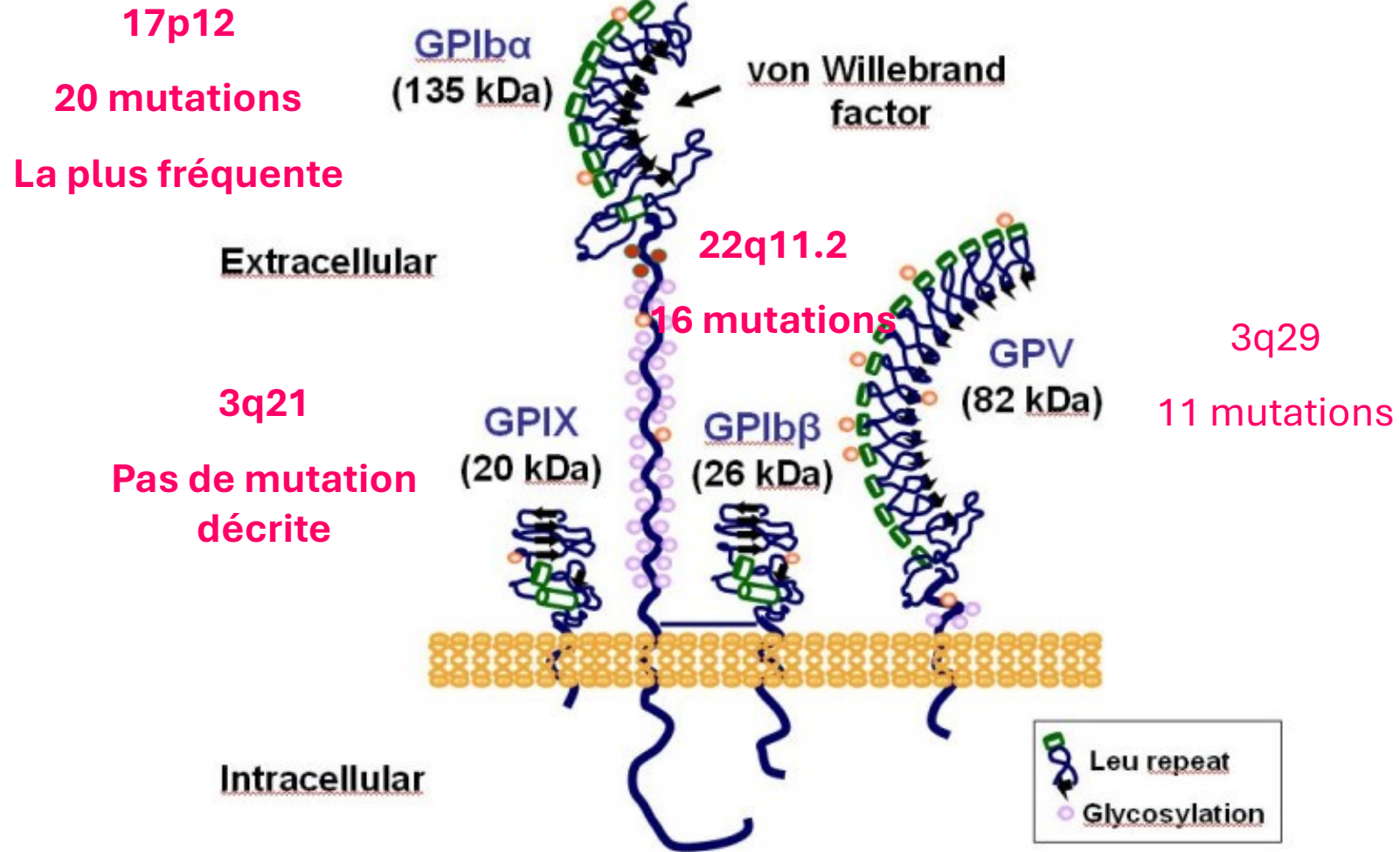
Thrombasthénie de Glanzmann (Exemple)



Fille
Hétérozygote
Type2

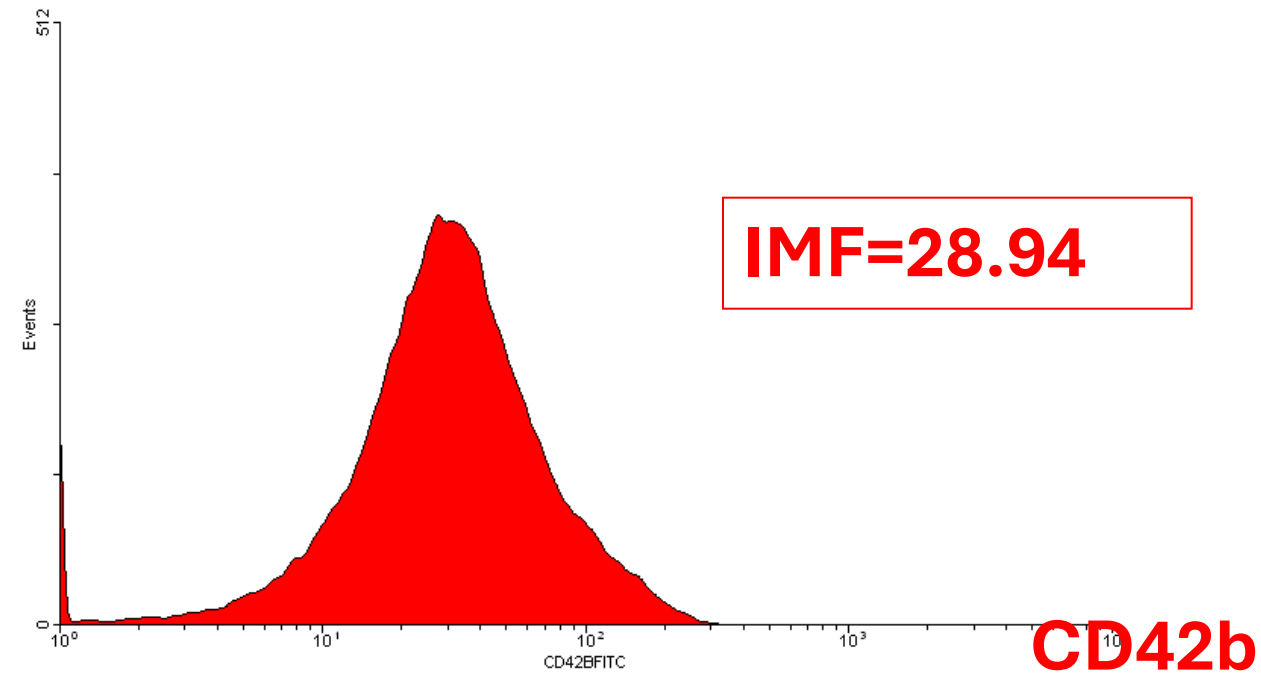
Syndrome de Bernard Soulier

GPIb-V-IX



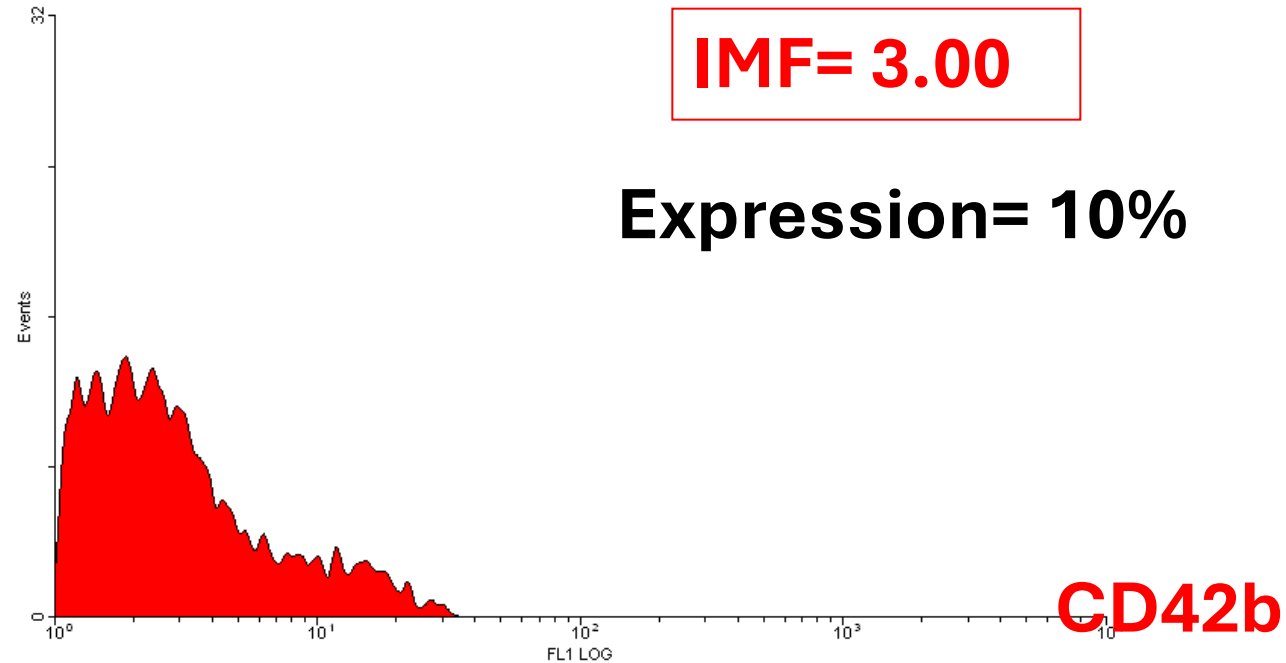
Transmise sur un mode autosomal récessif.

Syndrome de Bernard Soulier (exemple)



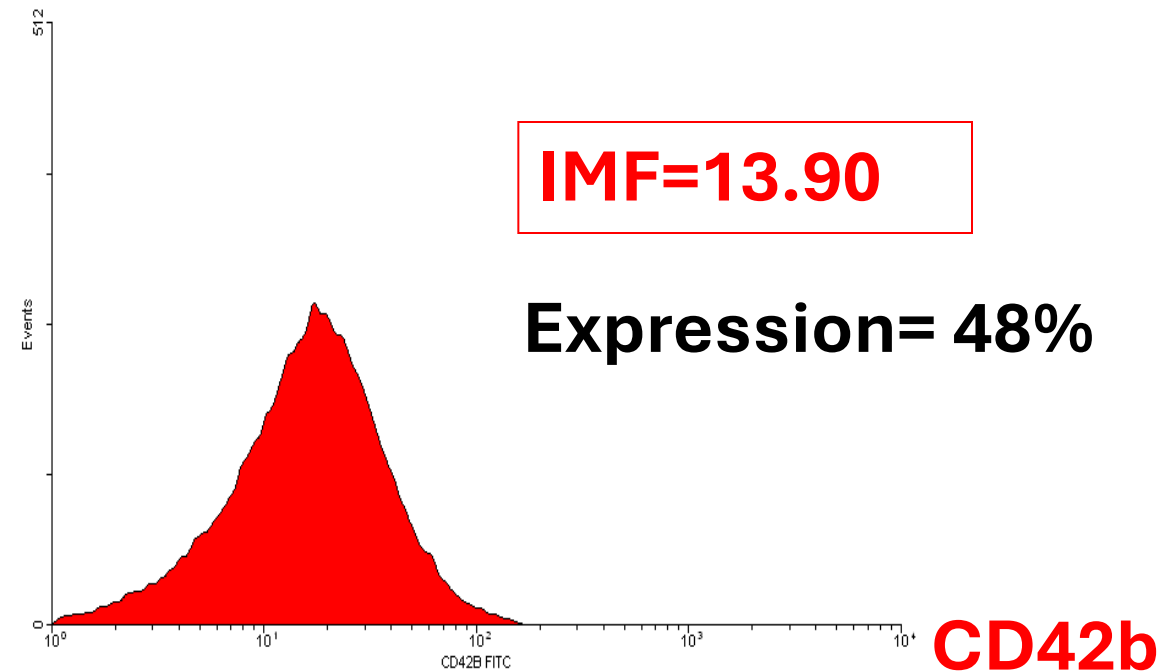
TEMOIN
Normal

Syndrome de Bernard Soulier (exemple)



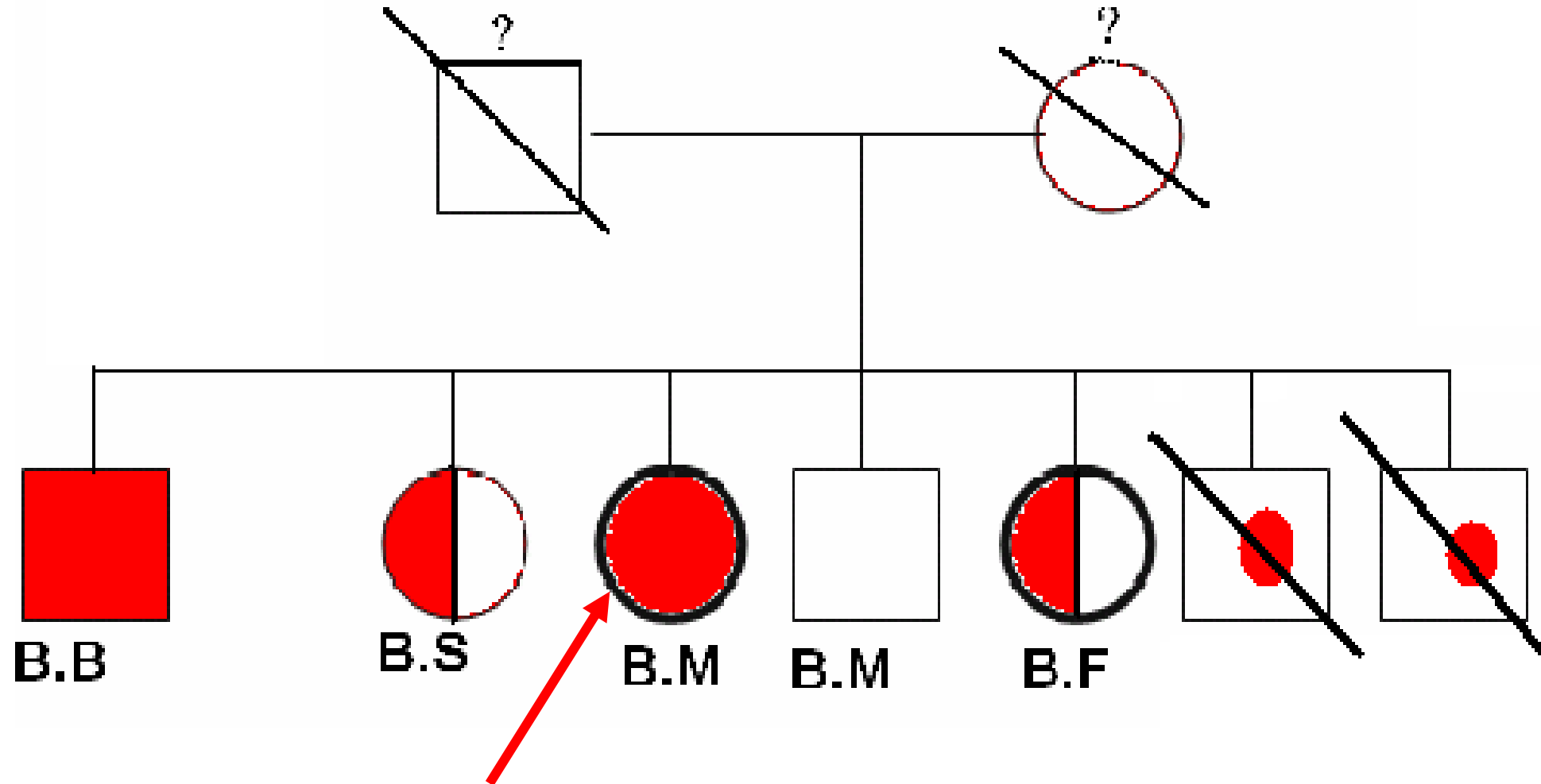
Fille
Homozygote

Syndrome de Bernard Soulier (exemple)



Fille
Hétérozygote

Enquête familiale



IMMUNOPHÉNOTYPAGE DES LYMPHOMES

**CYTOMETRIE EN FLUX SUR BIOPSIES ET
PONCTION-ASPIRATION GANGLIONNAIRE :
INTERET DIAGNOSTIQUE**

2^{ème} Workshop sur CMF 14 et 15 avril 2009

Dr SE BELAKEHAL

Pr SE BELAKEHAL COORDINATEUR NATIONAL DU GROUPE
ALGERIEN DE CYTOMETRIE

Classification des LNH tenant compte de l'immunophénotypage

Harris NL. et al. Blood. 1994

- **REAL (1994)**

entités nouvelles (Immunophénotypage) :

parmi les lymphomes B :

- LMNH B à cellules du manteau,
- LMNH B des zones marginales,
- LMNH B diffus à grandes cellules

parmi les lymphomes T :

- LMNH T périphériques
- LMNH T à grandes cellules anaplasiques

Classification des LNH tenant compte de l'immunophénotypage

(Jaffe S et al, IARC Press, 2001)

(Jaffe S et al, Blood, 2008)

- **OMS (2001 et 2008)**
 - **Le point de départ : morphologique complété par des études immunophénotypiques, et génétiques.**
 - **Sépare les néoplasies de précurseurs lymphoïdes B ou T (lymphomes/leucémies lymphoblastiques) des lymphomes B ou T matures périphériques.**
 - **Considère les lymphomes et les leucémies du même type cellulaire comme une seule maladie, avec des présentations cliniques différentes, (exemple : LLC et LL)**

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

- Examen clinique
 - Syndrome tumoral
 - Signes généraux
- Examens biologiques
 - hémogramme
- Morphologie conventionnelle
 - Cytologie
 - Histologie
- Immunophénotypage
 - Immunocytologie
 - Immunohistochimie
 - **Récemment : Cytométrie en flux**
- Cytogénétique
 - Conventionnelle : caryotype
 - Moléculaire : FISH
- Biologie moléculaire
 - PCR

■ **Problème diagnostic +++**

- Impact direct : Prise en charge thérapeutique « thérapie ciblée »
- Conséquences Pronostiques majeure

■ **Étude anatomopathologique**

- Affirmation du diagnostic
- Référence incontournable
- Problème : Maladie de Hodgkin, hyperplasies lymphoïdes, métastases de carcinome
- Problème : Difficulté : différencier lignées B vs T/NK

■ **Immunophénotypage**

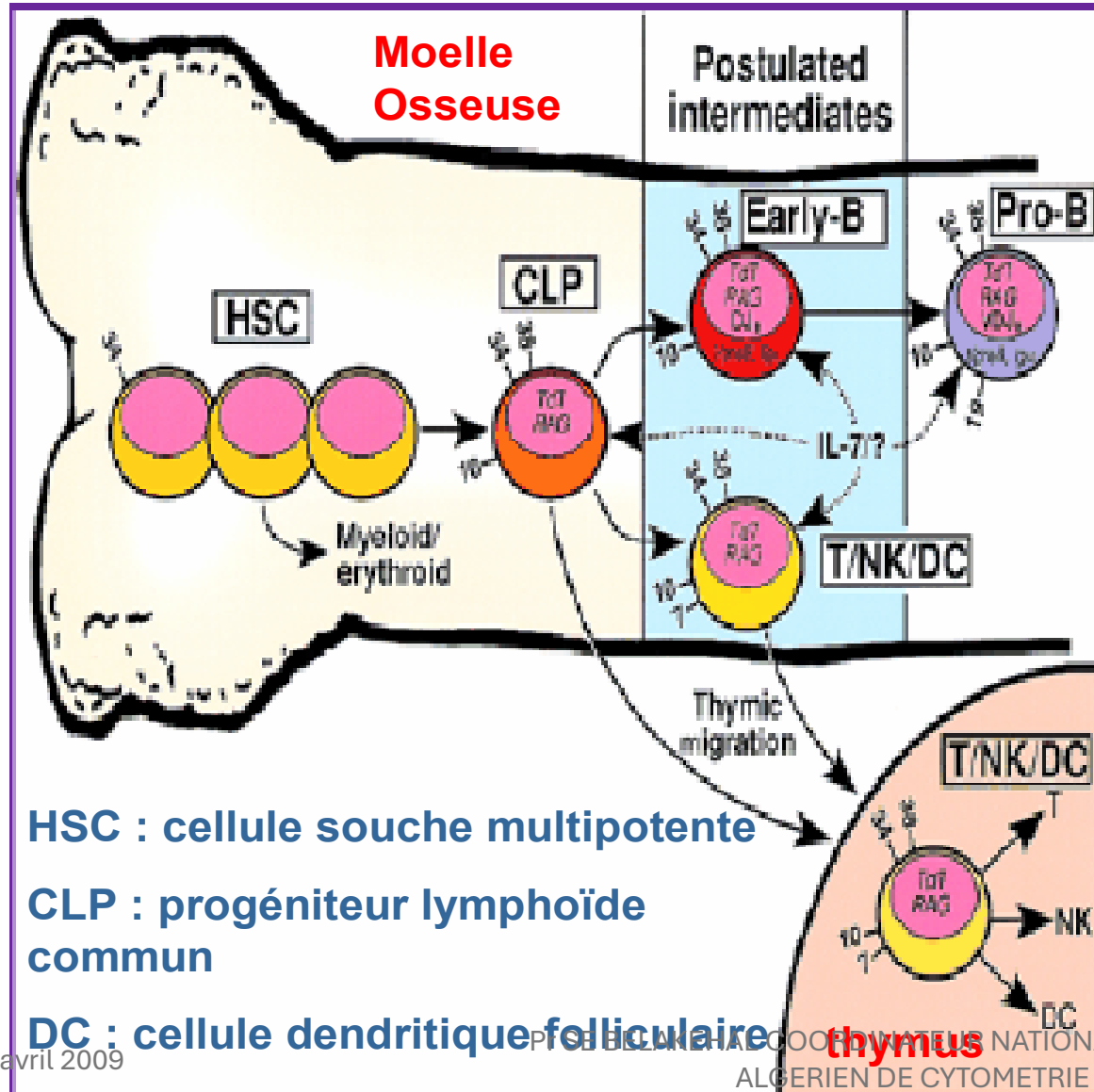
- Immunohistochimie (sur coupe)
- *Cytométrie en flux (sur suspension cellulaire)*

■ **Intérêt CMF dans les lymphomes sur produit ganglionnaire**

- Technique introduite depuis 1994 dans l'étude des LNH Ganglion.

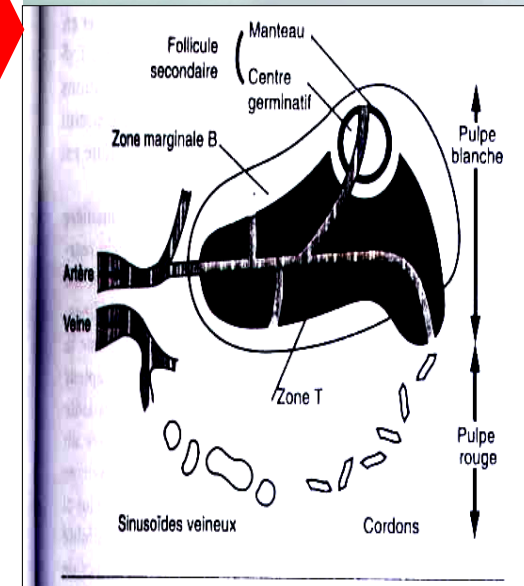
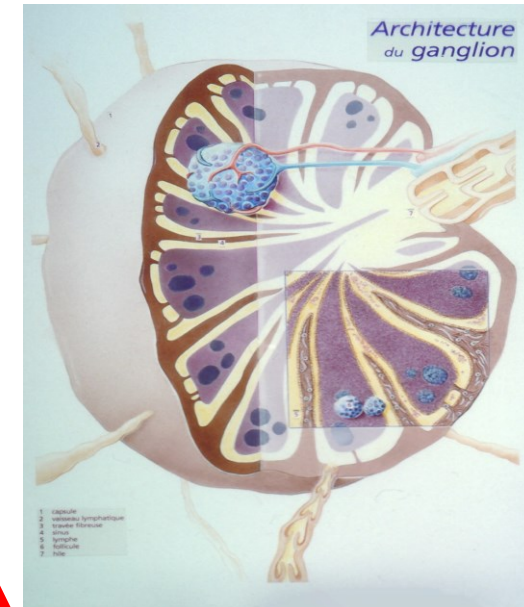
Rappel : Marqueurs de différenciation et origine des lymphomes

Lymphopoïèse précoce : Moelle



Lymphocytes B
mémoires

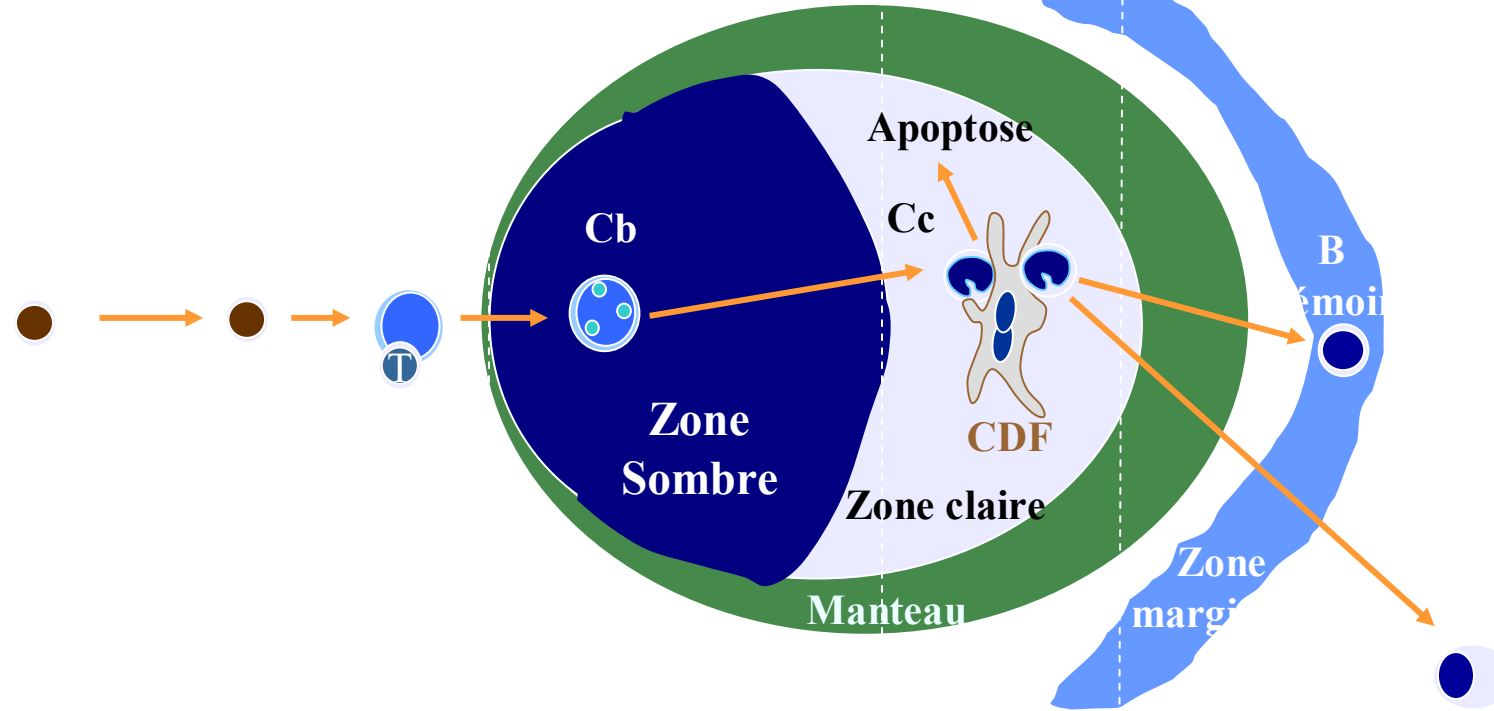
sang



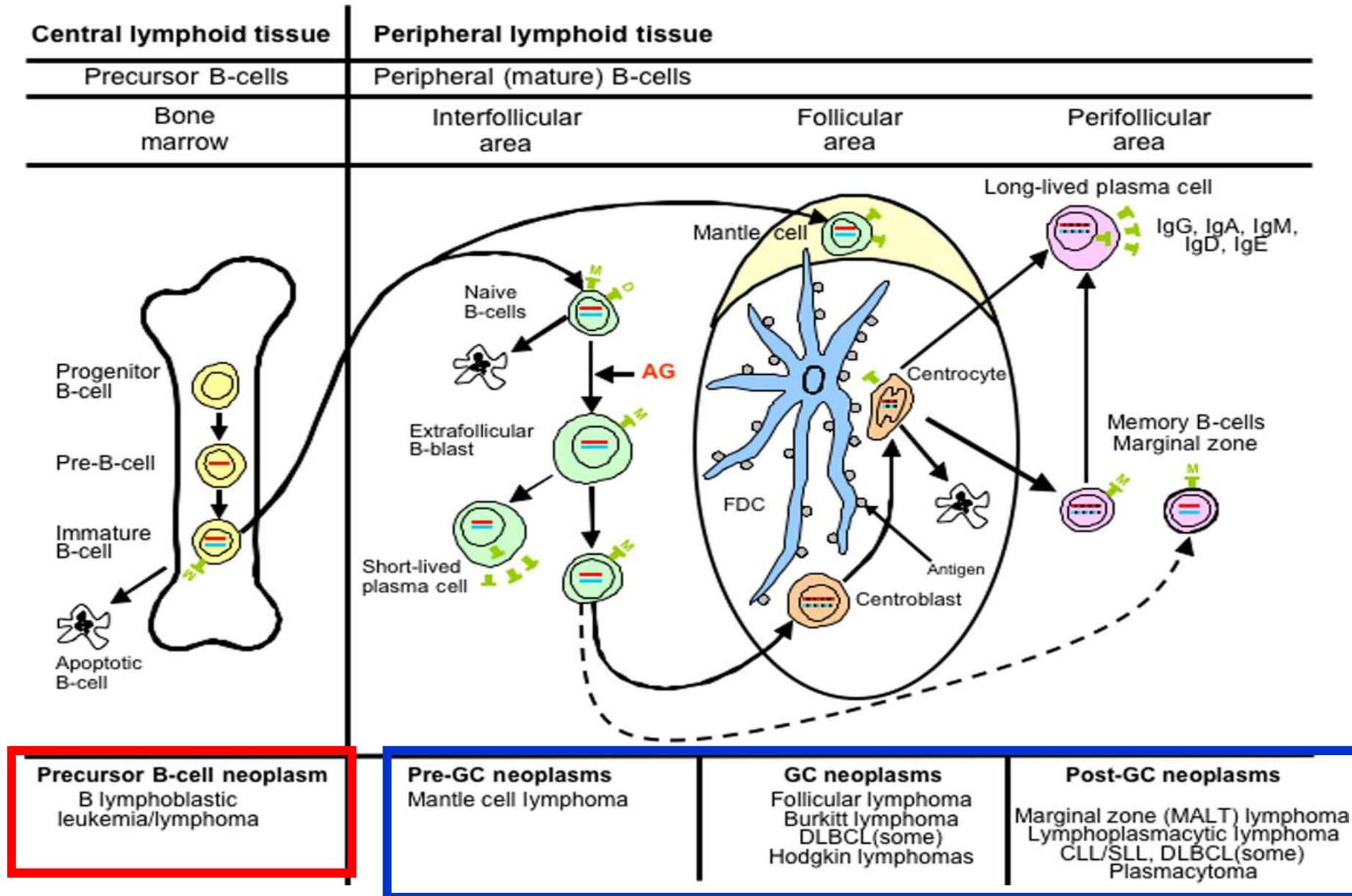
Pré centre germinatif

Centre germinatif

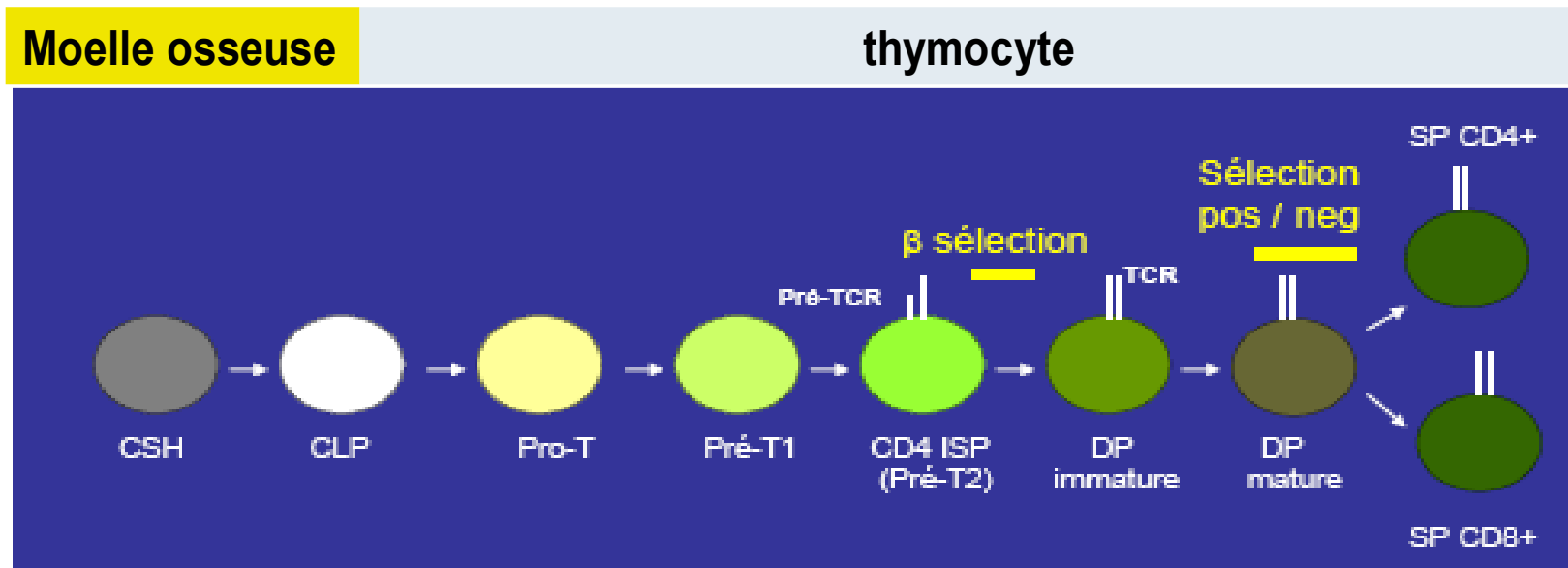
Post centre germinatif



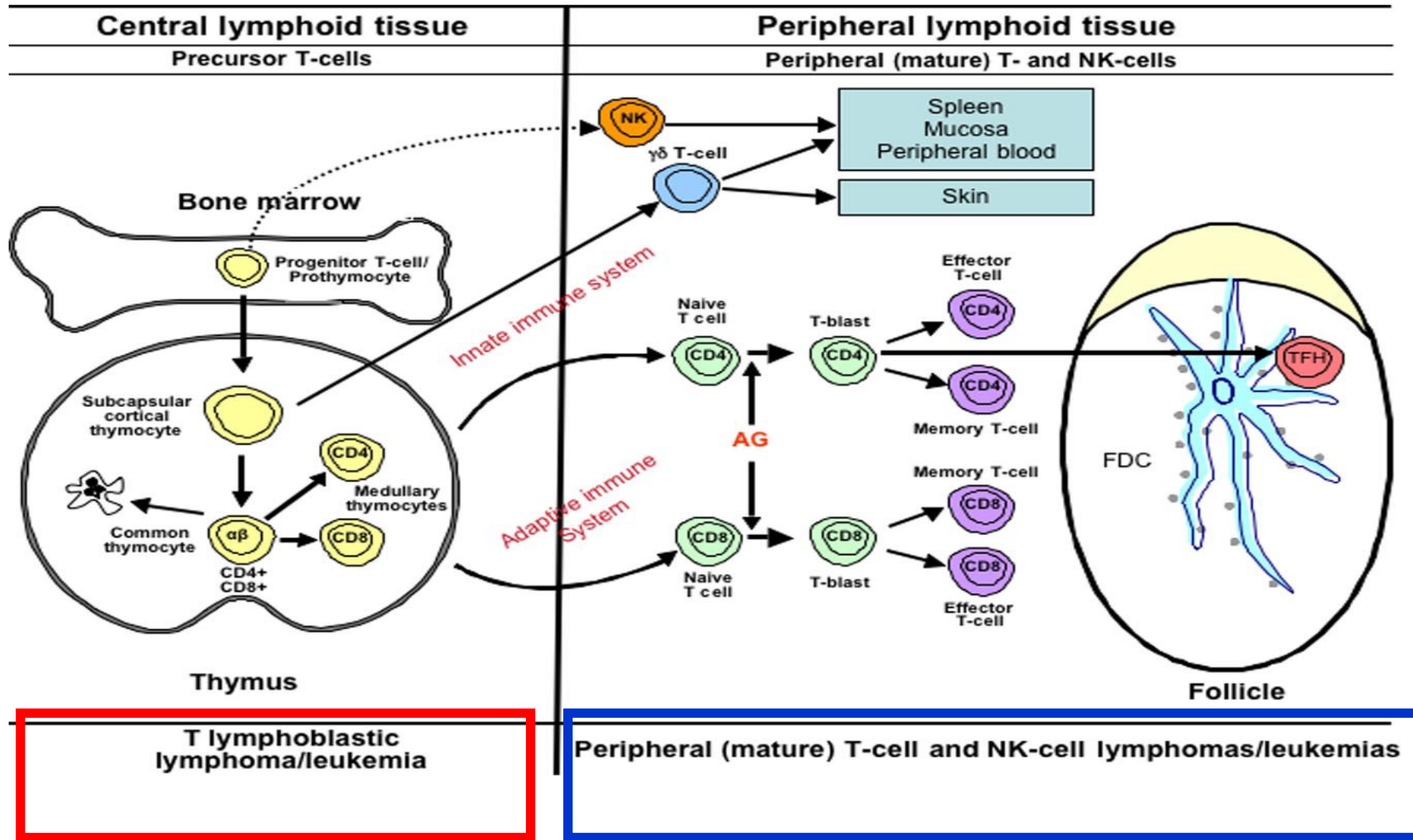
Origine des lymphomes B



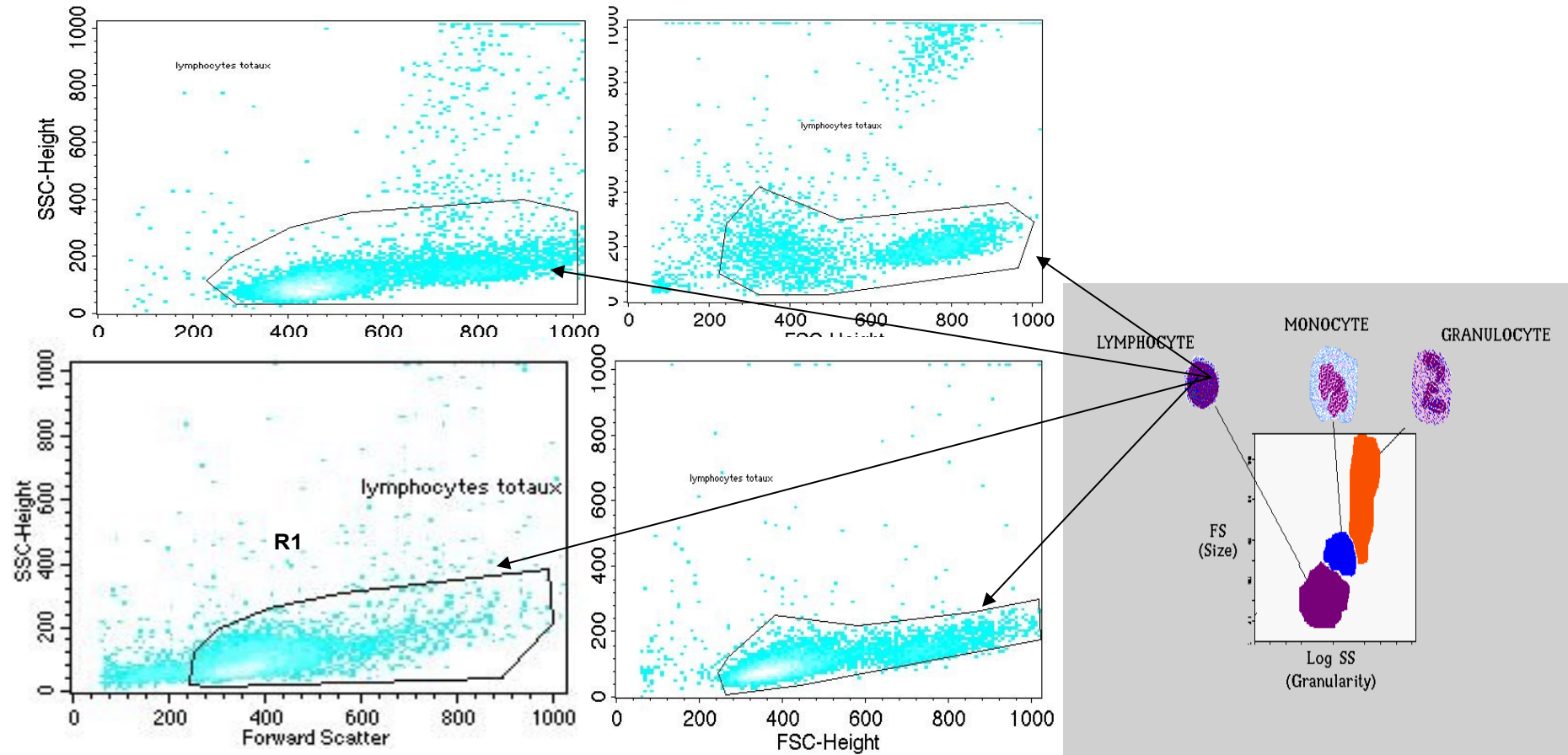
Différenciation lymphoïde T et marqueurs immunophénotypiques



Origine des lymphomes T/NK



Les Signaux Mesurés



GANGLION

SANG

Avantages et intérêt de la cytométrie en flux

■ **Rapide :**

- le médecin est orienté dans la journée
- permet un gain de temps inestimable pour le malade
- et permet d'orienter l'anatomopathologiste en cas de biopsie.

■ **Possibilité de tester plusieurs antigènes sur une même cellule; un panel minimum de 10 anticorps :**

- CD45
- marqueurs B : (CD19, CD20, CD22, CD79b, FMC7, kappa, lambda)
- marqueurs T/NK : (CD3, CD5, CD7, CD56)
- marqueurs d'activation : (CD23, CD38, CD25)

■ **Détection d'une population anormale minoritaire**

- **CMF reconnue dans l'analyse des cellules en suspension**

- **Pathologies**

- **Leucémies aiguës**
 - **Hémoglobinurie paroxystique nocturne**
 - **Phases leucémiques ou l'infiltration médullaire par un LNH**
 - **Suivi des patients HIV**
 - **Déficits immunitaires**
 - **Thrombopathies congénitales**

- **Les échantillons biologiques**

- **Sang**
 - **Moelle osseuse**
 - **Autres liquides biologiques : LCR, L. Pleural, L. Ascite**

- **Intérêt diagnostique de la **CYTOMETRIE EN FLUX** ? Infiltration intra-tissulaire LNH (ganglion)**

- **ponction-aspiration ganglionnaire,**
 - **suspensions cellulaires issues de biopsie ganglionnaire**

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

- Stratégie utilisée par de nombreuses études (1992-2008)
- Détection d'une prolifération lymphomateuse : 80-90% des cas

CANCER
CYTOPATHOLOGY

Fine-Needle Cytology and Flow Cytometry Immunophenotyping and Subclassification of Non-Hodgkin Lymphoma

A Critical Review of 307 Cases with Technical Suggestions

Pio Zeppa, Gilda Marino, Giancarlo Troncone, Franco Fulciniti, Amalia De Renzo, Marco Picardi, Giulio Benincasa, Bruno Rotoli, Antonio Vetrani, Lucio Palombini
[Cancer \(Cancer Cytopathol\) 2004;102:55–65.](#)

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Étude Italienne prospective de [1999 à 2002] de PIO ZEPPA et al.

- **307 patients suspectés de LNH** (dont 77 cas aux ATCD de LNH)
 - ganglionnaires (184 cas)
 - extra ganglionnaires (37cas) : thyroïde (13 cas), parathyroïde (15 cas), sein (4 cas), séreuses (5 cas), foie (2 cas), rate (20 cas), masse digestive (1 cas)
- Cytoponctions (2 à 3)
- Étude cytologique systématique;
- Critères d'exclusion : présence de cellules Sternbergoïdes et de cellules métastatiques
- Marquage 2 à 3 couleurs (FITC / PE; FITC / PE / PerCP)
- Étude histologique (54 cas) : difficiles à classer
- 15 cas d'échecs : pauvre en cellules et ou matériel hémorragique ou nécrotique

Étude Italienne prospective de [1999 à 2002] de Pio Zeppa et al.

Diagnostic et classification des LNH-B et des LNH-T/NK

Correlation between Fine-Needle Aspiration Cytology/Flow Cytometry and Histologic Subtypes of 44 Non-Hodgkin Lymphomas and 10 Suspicious Lymphoproliferative Processes

FNC/FC	No. of patients	Subsequent histology											
		BRH	LpCL	SLL/CLL	MCL	FCCL	MZL/MALT	PTCL	SNCL	NKL	LCL	AL	HD
Suspicious	10	3				3	2	1					1
LpCL	2		2										
SLL/LLC	6			6									
MCL	3				3								
FCCL	6					6							
MZL/MALT	2						2						
PTCL	1							1					
SNCL	2								2				
NKL	1									1			
NHL, NOS	13		1	1	1	3	4	1	1		1		
LCL	5										5		
AL	3											3	
Total	54	3	3	7	4	12	8	3	3	1	6	3	1

Sensibilité : 93% / Spécificité : 100%

Cancer (Cancer Cytopathol) 2004;102:55–65.

LL : pop. CD19+CD5+CD23+K+

MCL :pop. CD19+CD5+CD23- L+

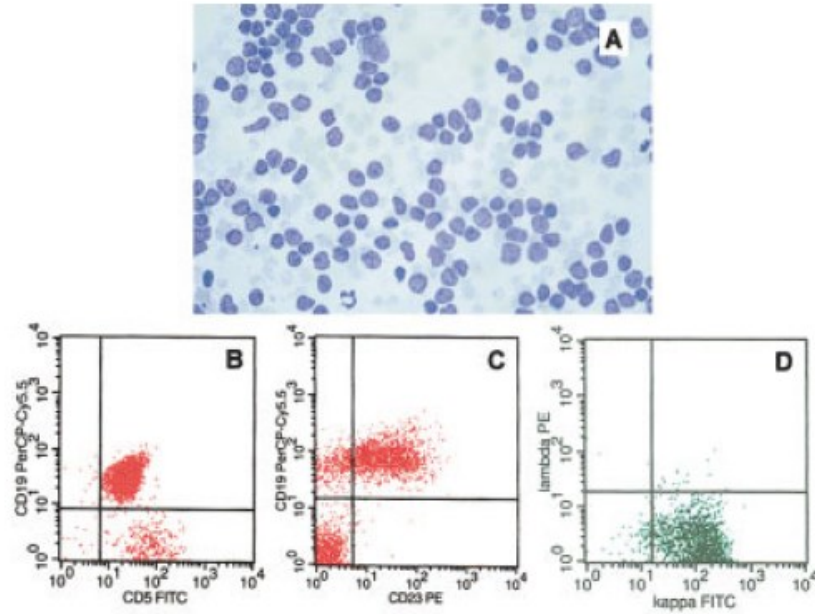


FIGURE 1. Fine-needle aspiration cytology (FNC) and flow cytometric (FC) analysis of small lymphocytic lymphoma/chronic lymphatic leukemia. (A) FNC

LF : pop. CD19+CD10+K+

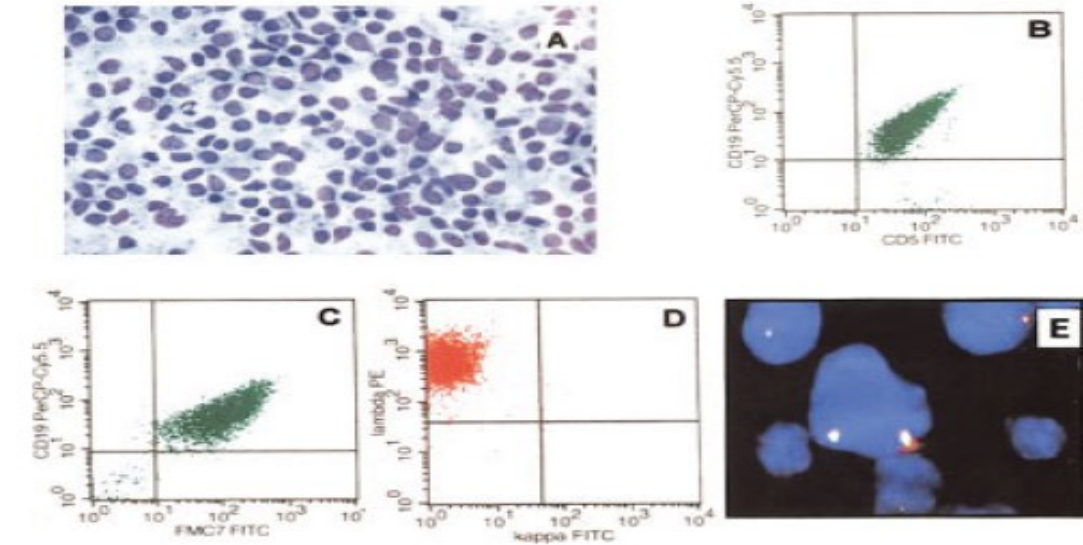


FIGURE 2. Fine-needle aspiration cytology (FNC) and flow cytometric (FC) analysis of mantle cell lymphoma. (A) FNC smear shows medium-sized lym-

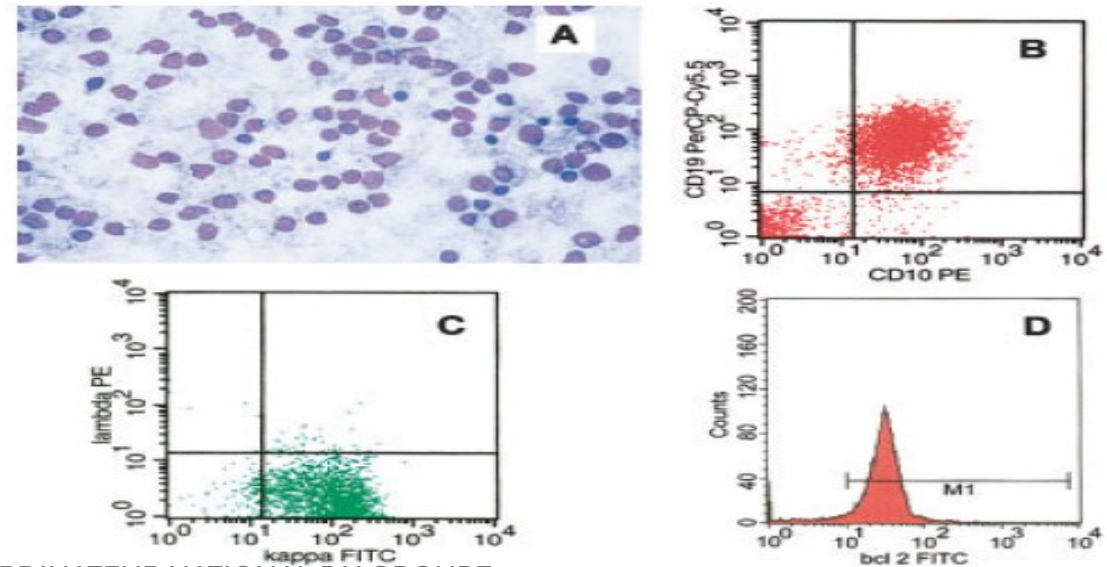
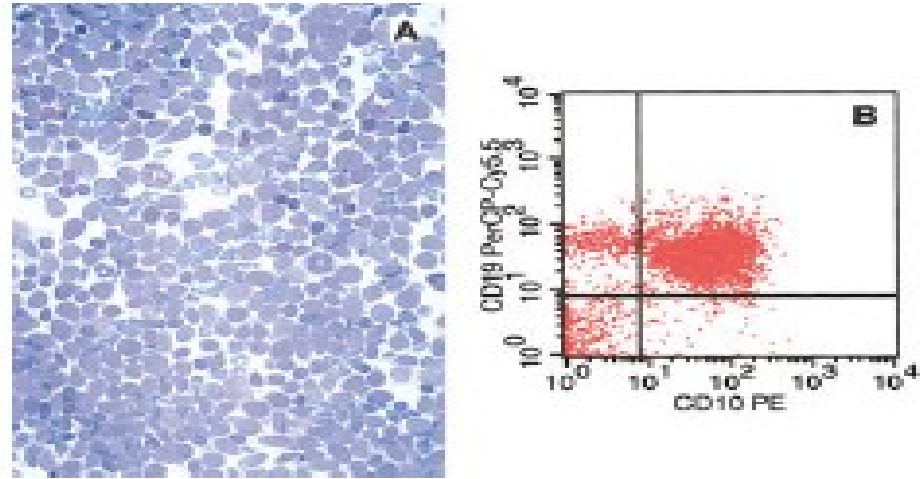
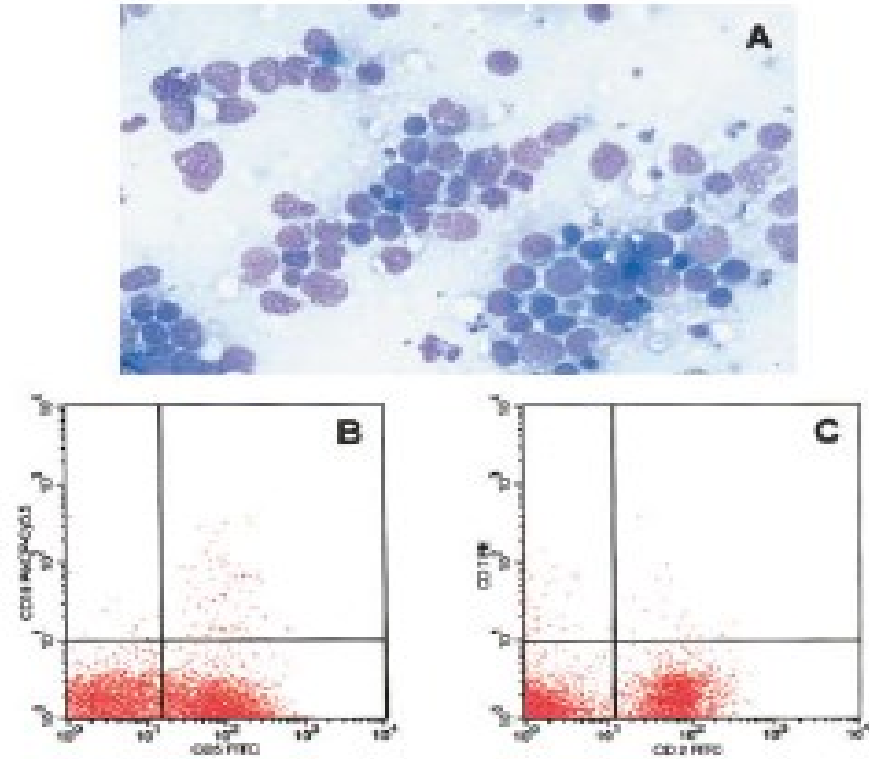


FIGURE 3. Fine-needle aspiration cytology (FNC) and flow cytometric (FC) analysis of follicle center cell lymphoma (FCCL) non-Hodgkin lymphoma. (A)

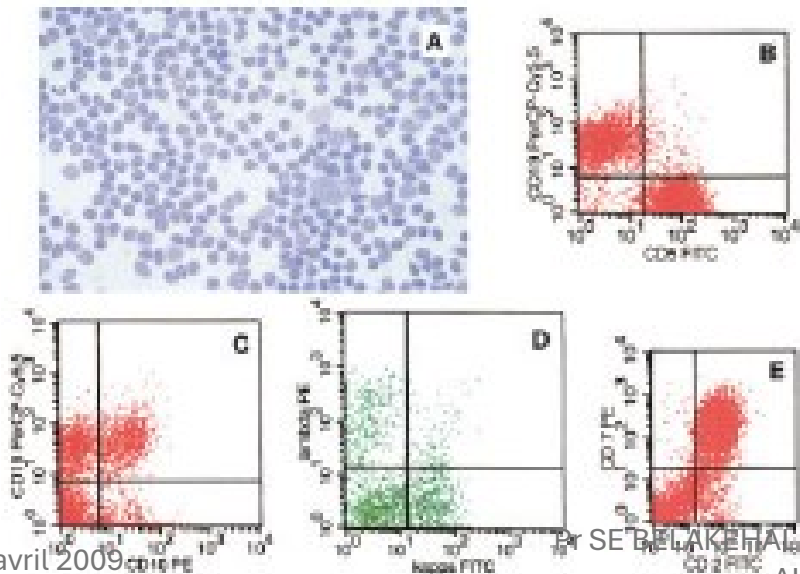
*LNH-B à grandes cellules : pop.
CD19+CD10+ majoritaire, K-/L-*



LNH-T : pop. CD2+CD5+CD7-



*HL: pop polytypique CD19+CD5+CD7+CD2+
K+L+*



Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Diagnosis and Subclassification of Primary and Recurrent Lymphoma

The Usefulness and Limitations of Combined Fine-Needle Aspiration Cytomorphology and Flow Cytometry

Brenton A. Meda, David H. Buss, Ralph D. Woodruff, James O. Cappellari, Robert O. Rainer, Bayard L. Powell, and Kim R. Geisinger

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Étude Américaine rétrospective [1993 à 1998] de B.A. Meda et al.

- 275 patients :
 - dont 158 suspectés de LNH (72 cas aux ATCD de LNH)
 - et 117 HL
- 290 cytoponctions (2 à 4)
- Étude cytologique systématique
- Critères d'exclusion : les métastases de carcinome, et les leucémies
- Marquage 2 à 3 couleurs (FITC / PE; FITC / PE / PerCP)

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Diagnosis of 158 Malignant Lymphomas by Combined Cytomorphologic and Flow Cytometric Results

Diagnosis	No. of Lymphomas	Tissue Biopsy Before Treatment
B-cell lymphoma		
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	18	4
Follicle center lymphoma		
Grade I (small cleaved)	33	8
Grade II (mixed small cleaved and large cell)	15	7
Grade III (large cell)	18	6
Mantle cell lymphoma	9	3
Marginal zone B-cell lymphoma (mucosa-associated lymphoid tissue)	5	1
→ Large B-cell lymphoma	35	8
High-grade B-cell, Burkitt-like lymphoma	1	
T-cell lymphoma		
Precursor T-lymphoblastic lymphoma/leukemia	1	1
Peripheral T-cell lymphoma, unspecified	4	2
Anaplastic large cell lymphoma	1	1
→ Miscellaneous		
Non-Hodgkin lymphoma, unspecified	15	8
→ Hodgkin lymphoma	3	3
Total	158	52

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Diagnostic et classification des LNH-B

Results of Flow Cytometric Immunophenotyping in Fine-Needle Aspirates of B-Cell Lymphomas*

	CLL/SLL (n = 18)	FCL (n = 66)	MCL (n = 9)	MZL (n = 5)	LBCL (n = 35)	BLL (n = 1)
Restricted light chain expression	18/18 (100)	62/64 (97)	9/9 (100)	5/5 (100) →	7/24 (29) [†]	1/1 (100)
Kappa	5/18 (28)	33/62 (53)	6/9 (67)	2/5 (40)	3/7 (43)	1/1 (100)
Lambda	13/18 (72)	29/62 (47)	3/9 (33)	3/5 (60)	4/7 (57)	
CD19/20	18/18 (100)	64/64 (100)	9/9 (100)	5/5 (100)	24/24 (100)	1/1 (100)
CD23	3/3 (100) [‡]	0/64 (0)	0/8 (0)	0/5 (0)		
CD5	18/18 (100)	0/64 (0)	9/9 (100)	1/5 (20)	1/3 (33) [§]	0/1 (0)
CD10	0/18 (0)	61/64 (95)	1/9 (11)	0/5 (0)	2/2 (100)	1/1 (100)
Other						
CD20 bright	1					
Negative surface immunoglobulin		1			1	
CD10+			1			
CD5+	1					
No evidence of lymphoma		1			16	
Technical problems						
Poor viability		1			4	1
Dilute sample	1				4	
Limited study			1	1	9	
Insufficient quantity					3	

BLL, Burkitt-like lymphoma; CLL/SLL, chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma; FCL, follicle center lymphoma; LBCL, large B-cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MZL, marginal zone lymphoma.

* Data are given as number positive/number tested (percent).

Am J Clin Pathol 2000;113:688-699

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Diagnostic et classification des LNH-T/NK et HDK

Results of Flow Cytometric Immunophenotyping in Fine-Needle Aspirates of T-Cell Lymphomas and Hodgkin Lymphoma*

	PTLBL (n = 1)	PTCL (n = 4)	ALCL (n = 1)	HL (n = 3)
CD2	1 (100)	4 (100)	0 (0)	3 (100)
CD3	1 (100)	4 (100)	0 (0)	3 (100)
CD4	0 (0)	3 (75)	1 (100)	3 (100)
CD5	1 (100)	4 (100)	1 (100)	3 (100)
CD7	1 (100)	4 (100)	0 (0)	3 (100)
CD8	1 (100)	2 (50)	0 (0)	3 (100)
CD19/20	0 (0)	2 (50)	0 (0)	3 (100)
Others	—	2 [†]	—	—

ALCL, anaplastic large cell (CD30+) lymphoma; HL, Hodgkin lymphoma; PTCL, peripheral T-cell lymphoma; PTLBL, precursor T-lymphoblastic lymphoma/leukemia.

HDK :

- Expression polytypique des marqueurs T et B
- Immunohistochimie > CMF

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

Histologic Diagnosis in Benign/Reactive Aspirates

Diagnosis	No. of Aspirates	Classification
Follicular lymphoid hyperplasia	12	
With progressive transformation of germinal centers	3	
→ Diffuse large B-cell lymphoma	2	False negative
Atypical follicular lymphoid hyperplasia	1	
Benign lymphoepithelial lesion	1	
Chronic lymphadenitis	1	
Chronic sialadenitis	1	
Fatty lymph node	1	
→ Follicle center lymphoma, grade I	1	False negative
Necrotizing granulomatous lymphadenitis	1	
→ Peripheral T-cell lymphoma	1	False negative
Unsatisfactory for diagnosis	1	
Total	26	

• **Sensibilité : 95%**

• **Spécificité : 100%**

• **Limites : maladie de HDK, infiltration partielles**

Pr SE BELAKEHAL COORDINATEUR NATIONAL DU GROUPE
ALGERIEN DE CYTOMETRIE

Am J Clin Pathol 2000;113:688-699

Intérêt de la cytométrie en flux après ponction ganglionnaire à l'aiguille (FNAC)

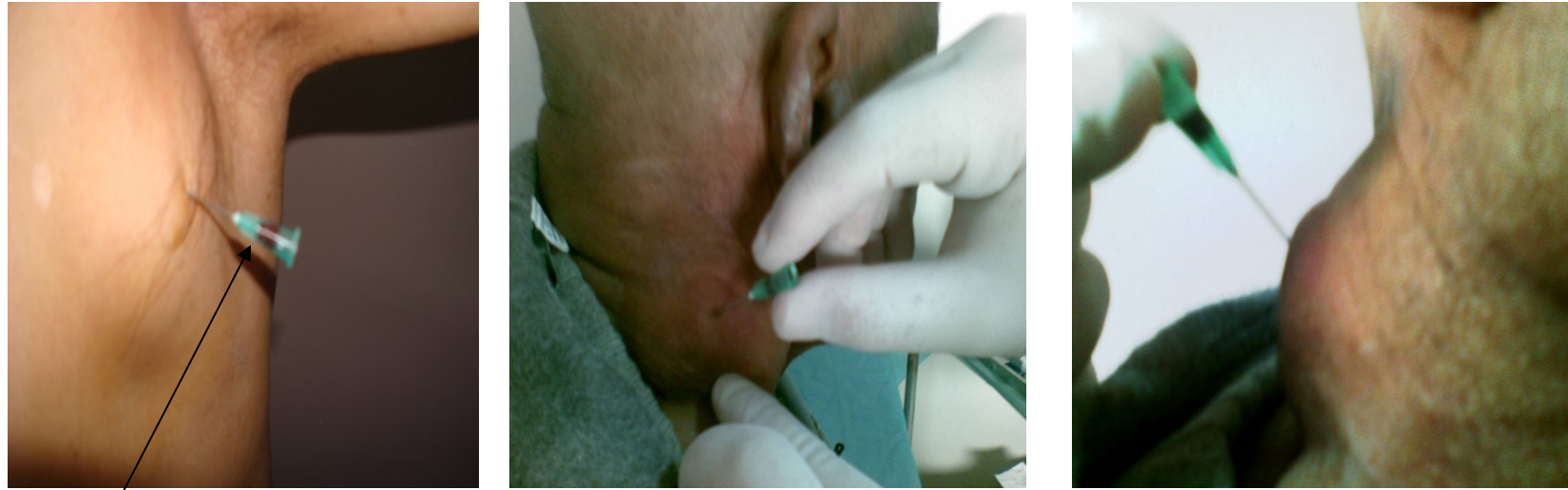
Expérience du Karolinska hospital 2004-2005 *Clinical cytometry 64B : 34-42, 2005*

- Un panel 4 couleurs en CMF peut permettre un diagnostic rapide et précis de LNH près de 90% des cas
- L'immunohistochimie garde cependant des avantages par rapport à la cytométrie : diagnostic de la maladie de Hodgkin et les métastases

Expérience, Hospital, San Giovanni Rotondo, Naple, Italie, 2008 (Hematology and Stem Cell Transplantation Unit, Immunology Unit, Hematology Oncology Unit, Cytopathology Service National Cancer Institute) *Leukemia & Lymphoma, June 2008; 49(6)*

- 67 patients,
- Ponctions **sans aspirations**,
- Cytologie systématique
- Cytométrie : CD45, CD2, CD3, CD5, CD4, CD8, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD23, k et L
- Étude histologique : 63 cas (sauf 4 adénites, 1 LNH-T Lymphoblastique)
- Concordance 96% diagnostic et la classification des LNH

Expérience du service d'hématologie de l'HCA



Ponctions multiples à l'aiguille fine sans aspiration (FNAC)

Aiguille
verte 22 G

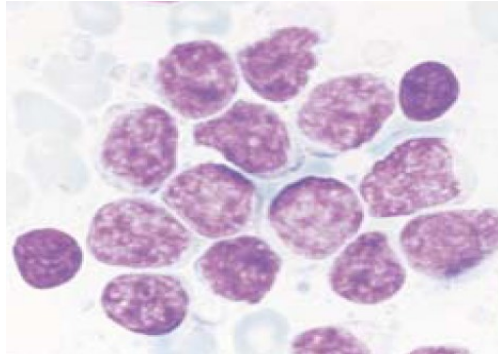


Ponctions multiples à l'aiguille fine avec aspiration (FNAC)

TECHNIQUE

- **Étude cytologiques** : exclusion des Maladies de HDK et métastases
- **Numération** cellulaire
- **Acquisition** 10 000 à 50 000 évènements
- **Incubation** des Ac à température ambiante, à obscurité
- 2 fluorochromes (FITC et PE) à 3 fluorochromes : PerCP
- **Lyse** des GR (Facs lysing de BD) avec **lavages** cell wash
- Suspension reconstituée avec 500 µl de PBS
- **Acquisition** immédiate des cellules fraîches puis **analyse** avec le logiciel CellQuest

Expérience du service d'hématologie de l'HCA

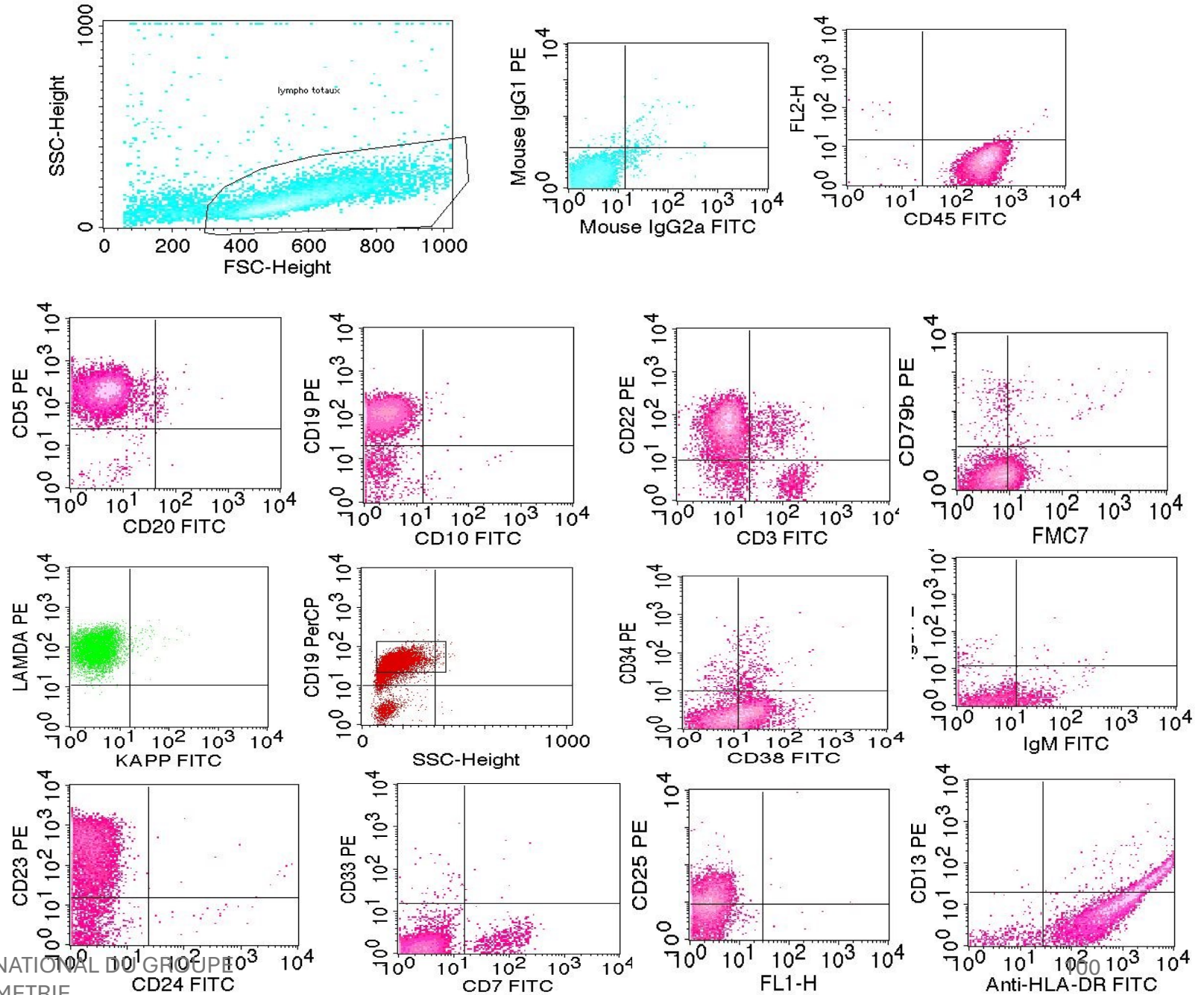


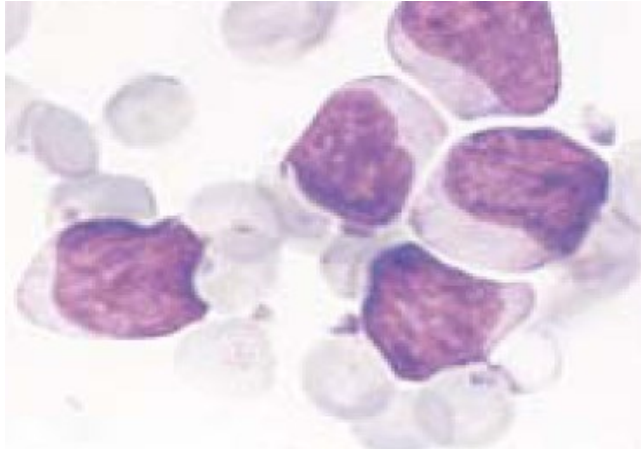
LL. Patient Amr. S.

CMF sur ganglion (ponction ganglionnaire).

Marqueurs B majoritaires > 85%
(CD19+f, CD22+f à moyen),
CD5+, CD23+, CD79b-, FMC7-,
sIgM+f,
Monoclonalité lambda,
CD38+faible,
CD10 négatif,
marqueurs T (CD3, CD7) négatifs.

Histologie : LL

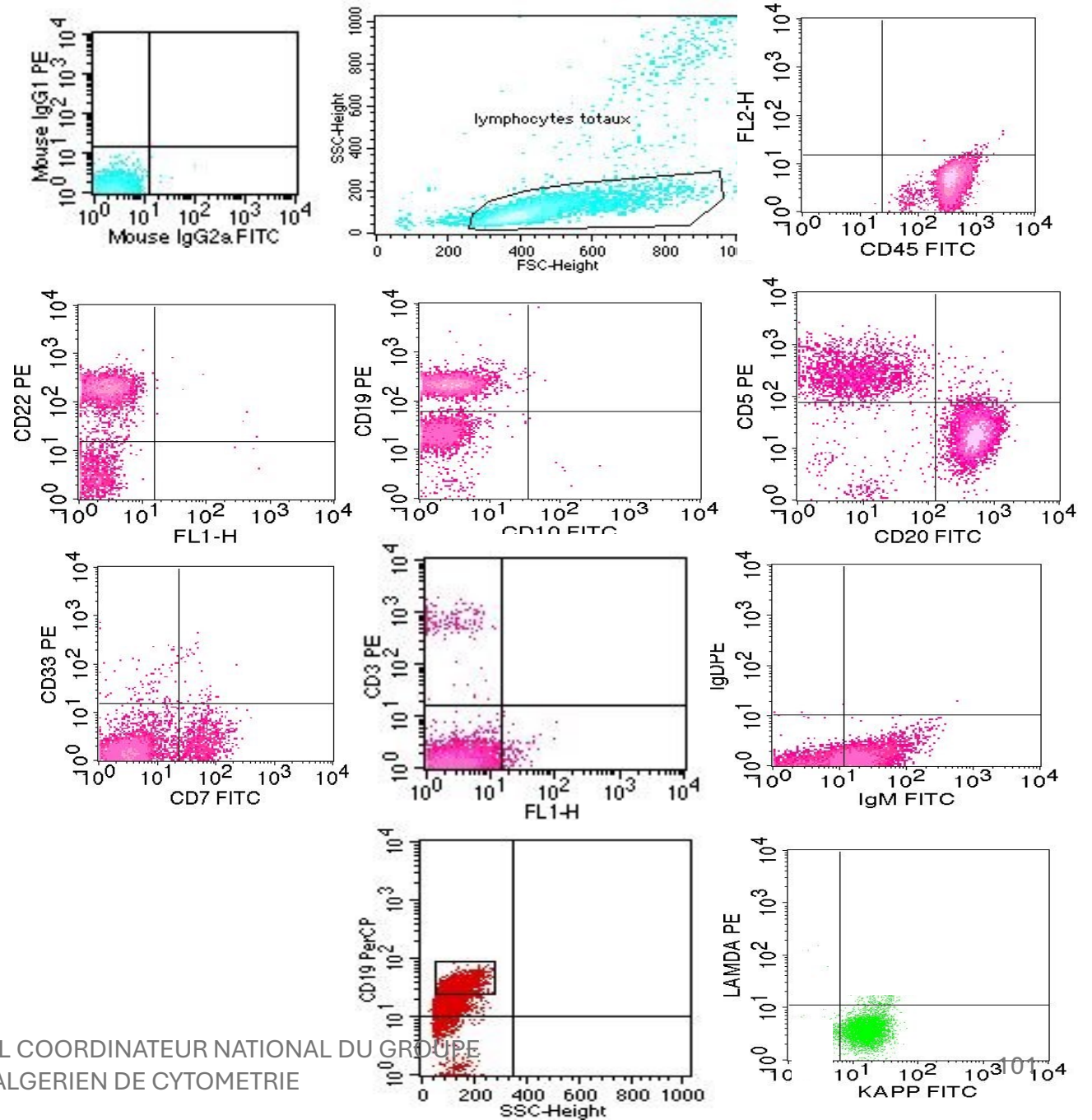


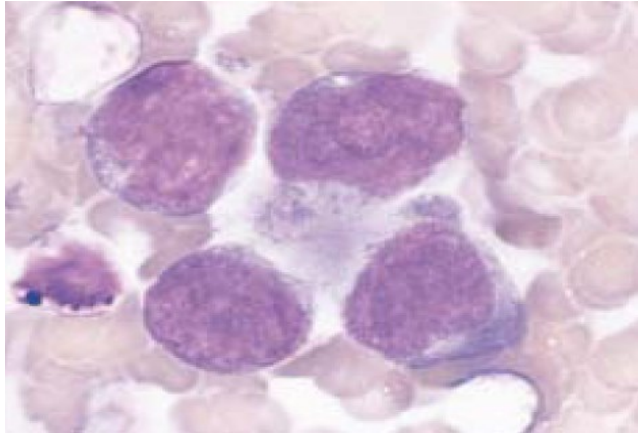


LZM ganglionnaire. Patient Mer. Z

- CMF sur ganglion (ponction ganglionnaire).
- Prédominance lymphocytaire B, > 85% (CD19+ CD20+ fort).
- CD5, et CD23 négatifs.
- CD79b négatif, et FMC7+.
- IgM + moyenne,
- restriction aux chaînes légères kappa.
- CD10 négatif.

Histologie : LGCDB

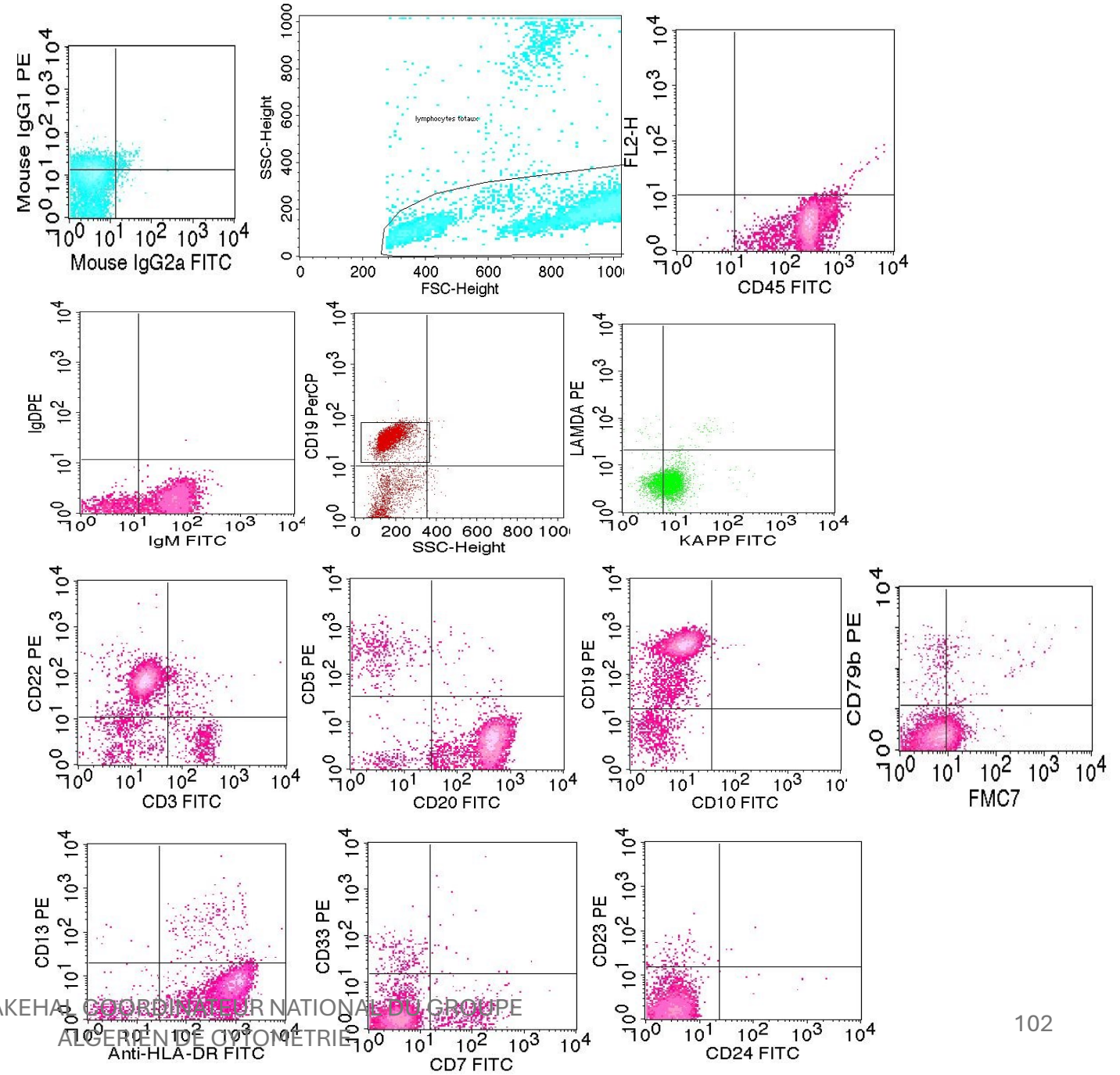


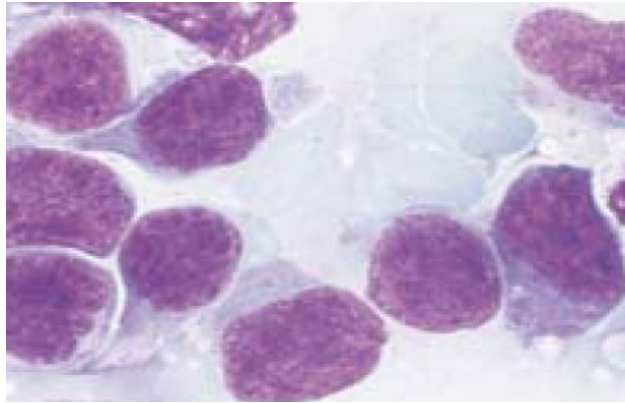


LGCD B. Patient Lar. F.

- **CMF sur ganglion, après ponction ganglionnaire.**
- Population de grande taille en FSC/SSC.
- Population T (CD3, CD5, CD7) négative.
- Population B majoritaire > 85% (CD19+, CD20+, CD22+).
- CD10 négatif. FMC7-, CD79b-, CD23-.
- IgM+ ;
- restriction aux chaînes légères kappa.

Histologie : LGCD B

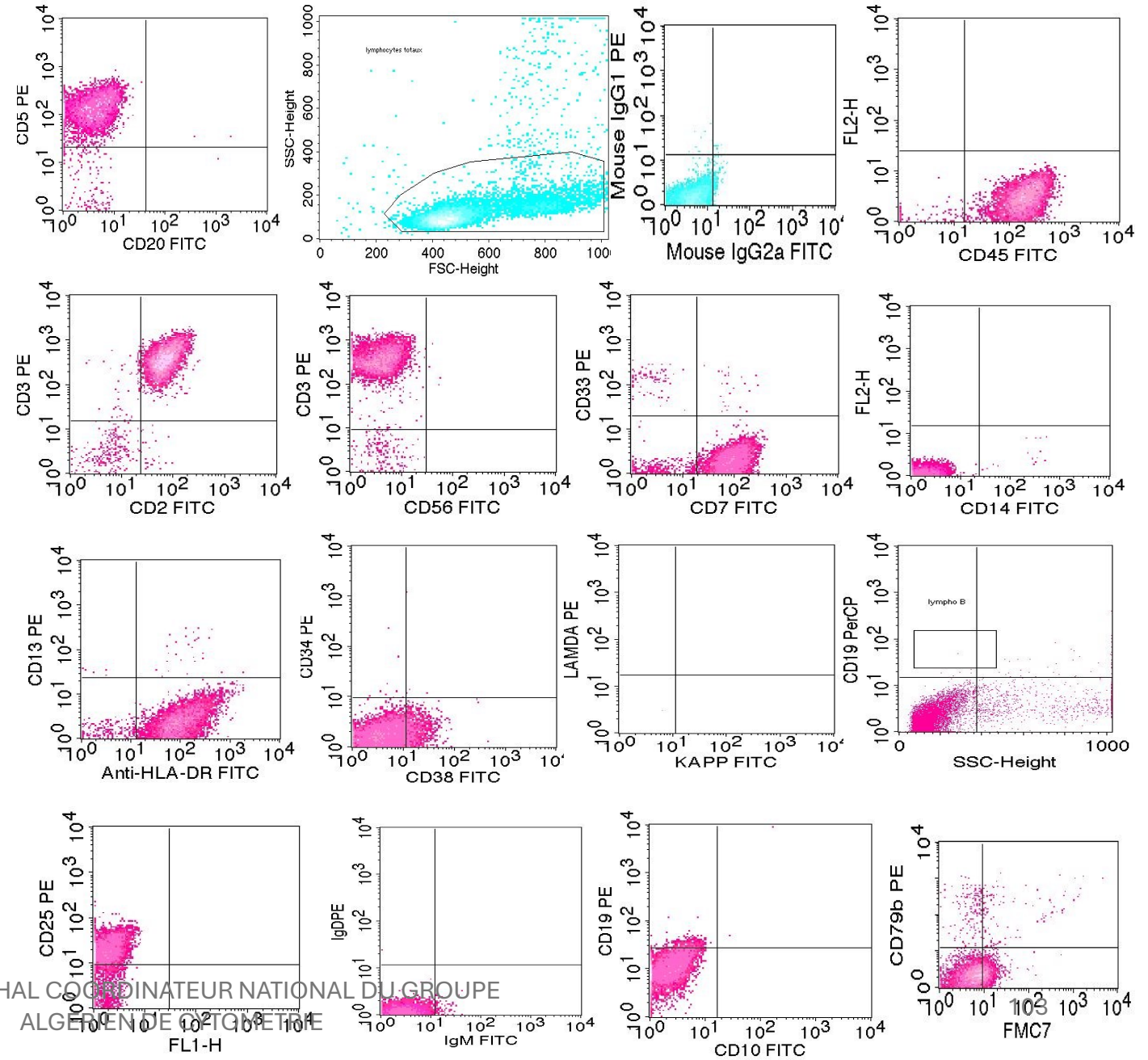




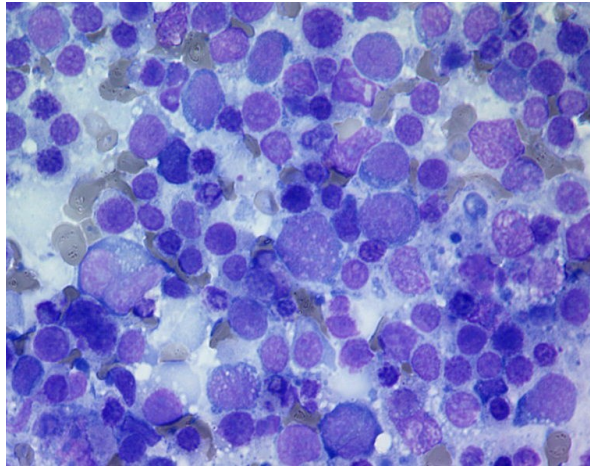
LNH T ganglionnaire. Patient Ben. B.

- CMF sur ganglion, après ponction ganglionnaire.
- Population lymphoïde CD45 fort,
- marqueurs B (CD19, CD20, IgM) négatifs ;
- marqueurs T (CD2, CD3, CD5, CD7) majoritaires > 85%;
- HLA DR et CD25 positifs.

Histologie : LNH-T SAS



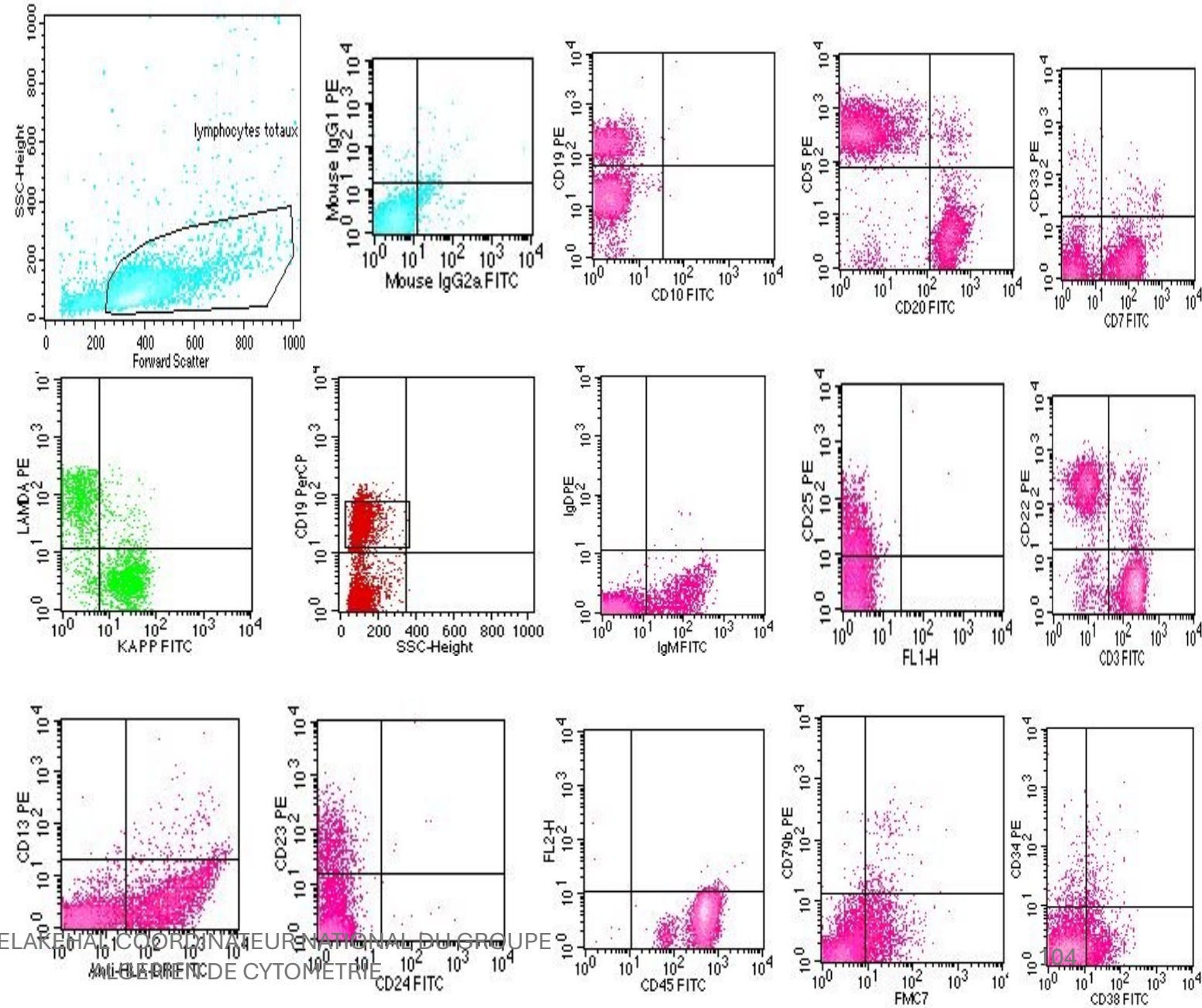
Expérience du service d'hématologie de l'HCA



HL. Patient Bad. K.

- **CMF** sur ganglion (ponction ganglionnaire).
- Coexpression des chaînes légères kappa et lambda
- expression polytypique de marqueurs B et T

Histologie : Adénite



Cytométrie en flux : Prélèvement après Perfusion et ou Trituration- Dilacération ganglionnaire

- Après biopsie ganglionnaire (Service de Chirurgie) le prélèvement est acheminé vers l'unité de CMF dans une compresse imbibée avec du sérum physiologique ou dans du milieu de transport RPMI 1640 médium + 10% de SVF (sérum de veau foetal)
- Par la suite on coupe un petit fragment du ganglion.
- Le plus grand fragment sera fixé au formol et adressé pour étude histologique.
- Des appositions du fragment d'adénopathie sont colorées au MGG et analysées.
- Perfusion avec 3 à 4 ml de sérum physiologique ou du RPMI du fragment non fixé puis trituration dilacération systématique afin d'obtenir une suspension de cellules adaptée à la cytométrie.
- Reprise de la suspension dans un tube à EDTA ou dans un tube Falcon après filtration (filtre à porosité 50 µm ou une toile), pour éliminer les gros morceaux de ganglion, qui pourraient obstruer les tubulures du cytomètre.
- Dès l'obtention de la suspension cellulaire, celle ci sera "préparée" immédiatement

Perfusion, trituration- dilacération

- Ganglion coupé en 2 fragments
- Appositions ganglionnaire et étude cytologique
- Perfusion – trituration- dilacération
- Filtration (filtre 50 μm de porosité)
- Remettre la suspension tube EDTA /Falcon



Remerciements

- **Dr Kacimi** (Service d'anatomopathologie)
- **Dr Benhamou** (Service des brûlés, unité de chirurgie générale)
- **Pr Abad** (Service d'hématologie, CAC Blida)
- **Pr Hamladji** (Service d'hématologie, CPMC)
- **Pr Raphaël, Dr Tawfik, Dr Abbed** (Service d'hématologie, unité de cytométrie en flux, Hôpital Kremlin Bicêtre - France)

SUIVI DES PATIENTS HIV POSITIFS EXPERIENCE DU CENTRE DE TRANSFUSION SANGUINE DE L'ARMEE

Y.FLICI , A.BOULTIF , S.BENABDELLAH , M.ARDJOUN, D.BACHA .



GENERALITES

**Le virus immunodéficient humain (HIV)
se traduit par des désordres immunitaires liés à:**

- ♦ **Disparition progressive des lymphocytes «T4 ou T helper »**
- ♦ **Activation des lymphocytes « T8 ou T suppresseur »
induisant l'augmentation de leur nombre**



**Pour un suivi efficace de patients séropositifs
il est important de déterminer:**

- 🔴 **l'évolution des sous populations lymphocytaires (T4 et T8).**
- 🔴 **la mesure de la charge virale présente dans le sang.**



DOSAGE DE CD4/CD8 PAR CYTOMETRIE EN FLUX

La CMF permet de mesurer des paramètres de cellules dans un flux en triant et séparant physiquement les sous populations

Le FACSCount est un cytomètre en flux spécialement adapté à la numération des lymphocytes "T" : CD4⁺, CD8⁺ et CD3⁺ dans le sang non lysé.



FACSCount



MODE OPERATOIRE

Le sang est collecté dans des tubes EDTA et gardé à température ambiante.

FACSCCount nécessite l'utilisation d'un contrôle (sujet hématologiquement sain) pour le réglage de l'appareil.



Notre étude au sein du laboratoire de cytométrie a porté sur le dosage des CD4/CD8 dans:

- ❖ Une population témoin de 51 individus adultes , composée de 24 hommes et 27 femmes âgés de 20 à 60 ans.
- ❖ Une population HIV positive de 158 personnes composée de 33 femmes et 125 hommes âgés de 20 à 70 ans.
- ❖ 6 enfants âgés de moins de 5ans.



SUIVI DES PATIENTS DANS L'INFECTION HIV

- ♦ 86 patients (13 de sexe féminin et 73 de sexe masculin) ont bénéficié d'un suivi de dosage CD4/CD8 de 2003 à 2009.
- ♦ 2 à 15 dosages CD4/CD8 par patient ont été effectués (de 3 à 6 mois d'intervalle) en 6 ans .
- ♦ Ces malades ont bénéficié parallèlement de charges virales HIV par PCR avec Cobas Amplicor en 2004 et depuis 2007 par PCR avec TaqMan (technique plus sensible et plus rapide).



RESULTATS DU DOSAGE CD4/CD8/CD3 EN FONCTION DU SEXE DANS LA POPULATION TEMOIN

CD (Cellule/μl) \ SEXE	MASCULIN n=24 Moyenne $\pm$ SD	FEMININ n=27 Moyenne $\pm$ SD	t *	P**	Interprétation
CD3	1752.8$\pm$483.9	1715.1 $\pm$571.5	0.25	>0.5	NS
CD4	1010 $\pm$322.8	1043.63$\pm$382.18	3.17	<0.01	SIGNIFICATIF
CD8	681.0$\pm$230.7	741.6$\pm$698.3	0.39	>0.50	NS
CD4/CD8	1.60 $\pm$ 0.66	1.82 $\pm$ 0.67	1.17	>0.20	NS

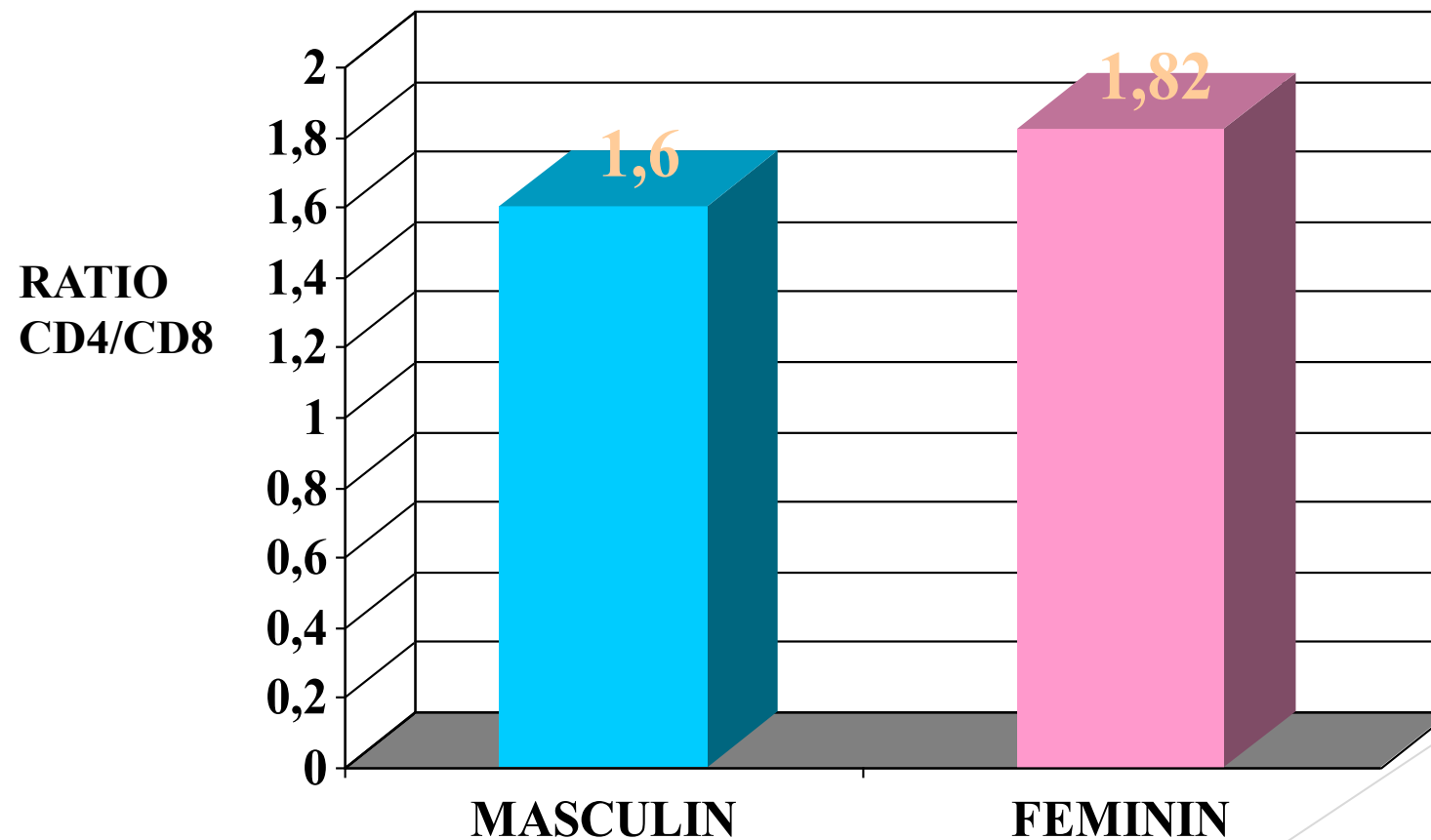
*TEST DE STUDENT

**PROBABILITE

NS=non significatif

ddl=48

DOSAGE CD4/CD8 EN FONCTION DU SEXE DANS LA POPULATION TEMOIN



14 et 15 avril 2009

MASCULIN

Pr SE BELAKEHAL COORDINATEUR NATIONAL DU GROUPE ALGERIEN DE
CYTOMETRIE

FEMININ



RESULTATS DU DOSAGE CD4/CD8/CD3 EN FONCTION DE L'AGE DANS LA POPULATION TEMOIN

AGE CD (Cellule/μl)	[20 – 30 [n=15 Moyenne $\pm$ SD	[30 – 40 [n=15 Moyenne $\pm$ SD	[40 – 50 [n=08 Moyenne $\pm$ SD	[50 – 60 [n=13 Moyenne $\pm$ SD
CD3	1770.1$\pm$540.1	1656.0$\pm$1880.1	1880.1$\pm$317.5	1690.7$\pm$698.8
CD4	1102.0$\pm$344.2	939.8$\pm$220.5	1016.6 $\pm$263.3	1065.3 $\pm$488.5
CD8	619.3$\pm$258.8	863.6$\pm$872.0	773.8 $\pm$262.5	599.2 $\pm$253.7
CD4/CD8	1.90 $\pm$ 0.53	1.53 $\pm$ 0.53	1.59 $\pm$ 1.03	1.87 $\pm$ 0.61

RESULTATS DU DOSAGE CD4/CD8/CD3 DANS LA POPULATION HIV EN FONCTION DU SEXE

SEXE CD (Cellule/μl)	MASCULIN n=125 Moyenne $\pm$ SD	FEMININ n=33 Moyenne $\pm$ SD	t *	P**	Interprétation
CD3	1167.76$\pm$761.08	173.15 $\pm$642.39	0.65	0.50	NS
CD4	298.37 $\pm$333.87	245.85$\pm$161.59	0.88	0.35	NS
CD8	772.59$\pm$489.05	815.09$\pm$503.96	0.44	>0.50	NS
CD4/CD8	0.44 $\pm$0.60	0.33 $\pm$ 0.21	1.08	0.30	NS

*TEST DE STUDENT

**PROBABILITE

NS=non significatif

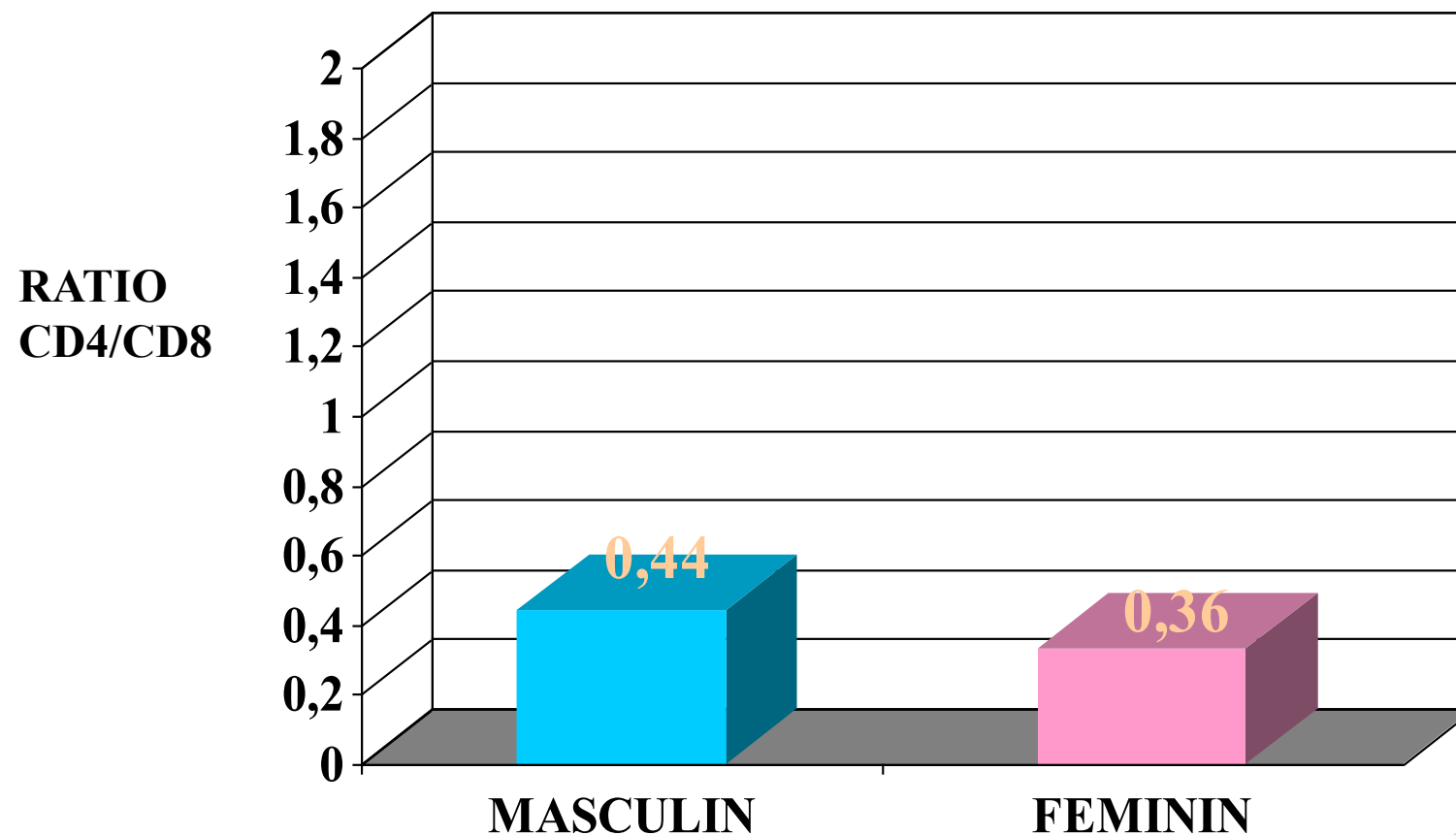
ddl= 156

14 et 15 avril 2009

Pr SE BELAKEHAL COORDINATEUR NATIONAL DU GROUPE ALGERIEN DE
CYTOMETRIE



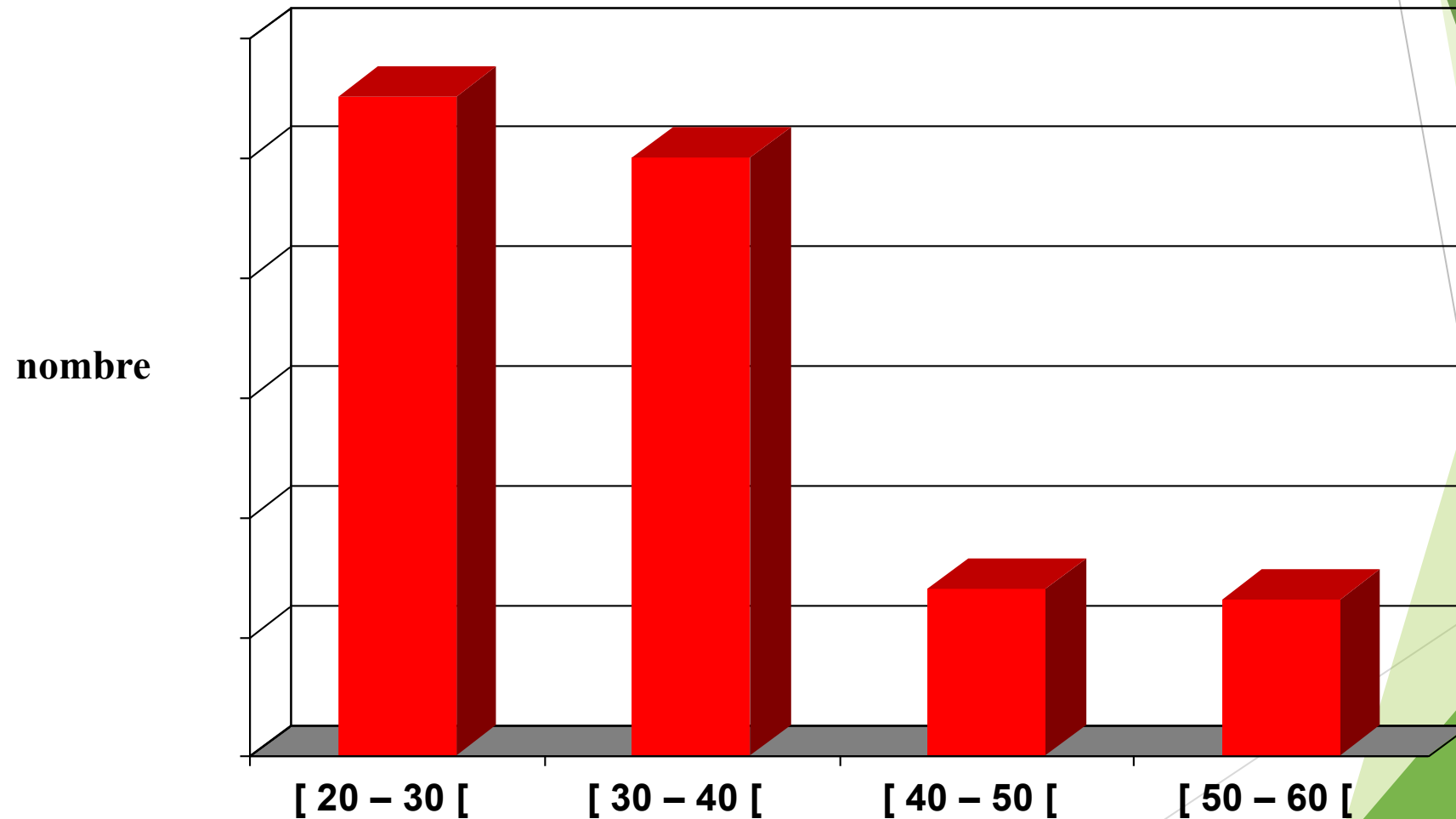
DOSAGE CD4/CD8 EN FONCTION DU SEXE DANS LA POPULATION HIV



RESULTATS DU DOSAGE CD4/CD8/CD3 EN FONCTION DE L'AGE DANS LA POPULATION HIV

AGE CD (Cellule/μl)	[20 – 30 [n=55 Moyenne ± SD	[30 – 40 [n=50 Moyenne ± SD	[40 – 50 [n=14 Moyenne ± SD	[50 – 60 [n=13 Moyenne ± SD
CD3	1158.56±687.93	1257.68±772.93	1133.50±809.51	804.15±474.11
CD4	307.56±322.77	349.44±361.37	201.43±220.44	138.23±159.92
CD8	783.35±493.22	842.48±536.94	928.14±707.64	634.62±348.78
CD4/CD8	0.47± 0.63	0.44 ± 0.52	0.25 ± 0.33	0.21 ± 0.15

POPULATION MALADE EN FONCTION DE L'AGE



COMPARAISON DES CD3/CD4/CD8 ENTRE LA POPULATION TEMOIN ET LA POPULATION MALADE

CD (Cellule/ μ l)	TEMOIN n=51 Moyenne $\pm$ SD	MALADE n=158 Moyenne $\pm$ SD	t *	P**	Interprétation
CD3	1733.60 $\pm$ 527.90	1148.00 $\pm$ 736.94	5.32	<0.001	TS
CD4	1031.50 $\pm$ 353.80	287.40 $\pm$ 306.30	13.63	10 ⁶	TTS
CD8	710.20 $\pm$ 532.60	781.47 $\pm$ 490.88	0.48	>0.50	NS
CD4/CD8	1.73 $\pm$ 0.67	0.42 $\pm$ 0.54	12.65	10⁵	TTS

*TEST DE STUDENT

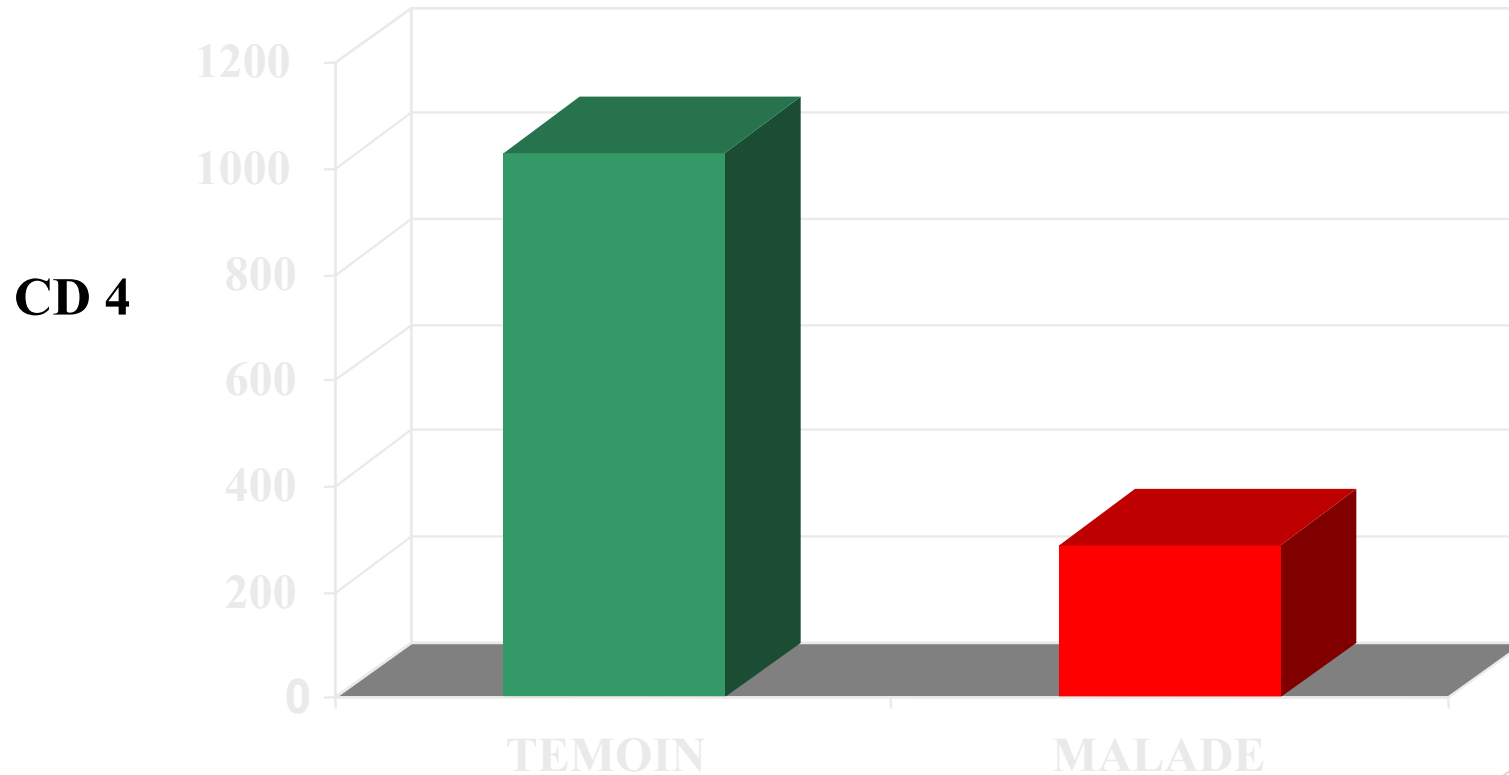
**PROBABILITE

NS=non significatif

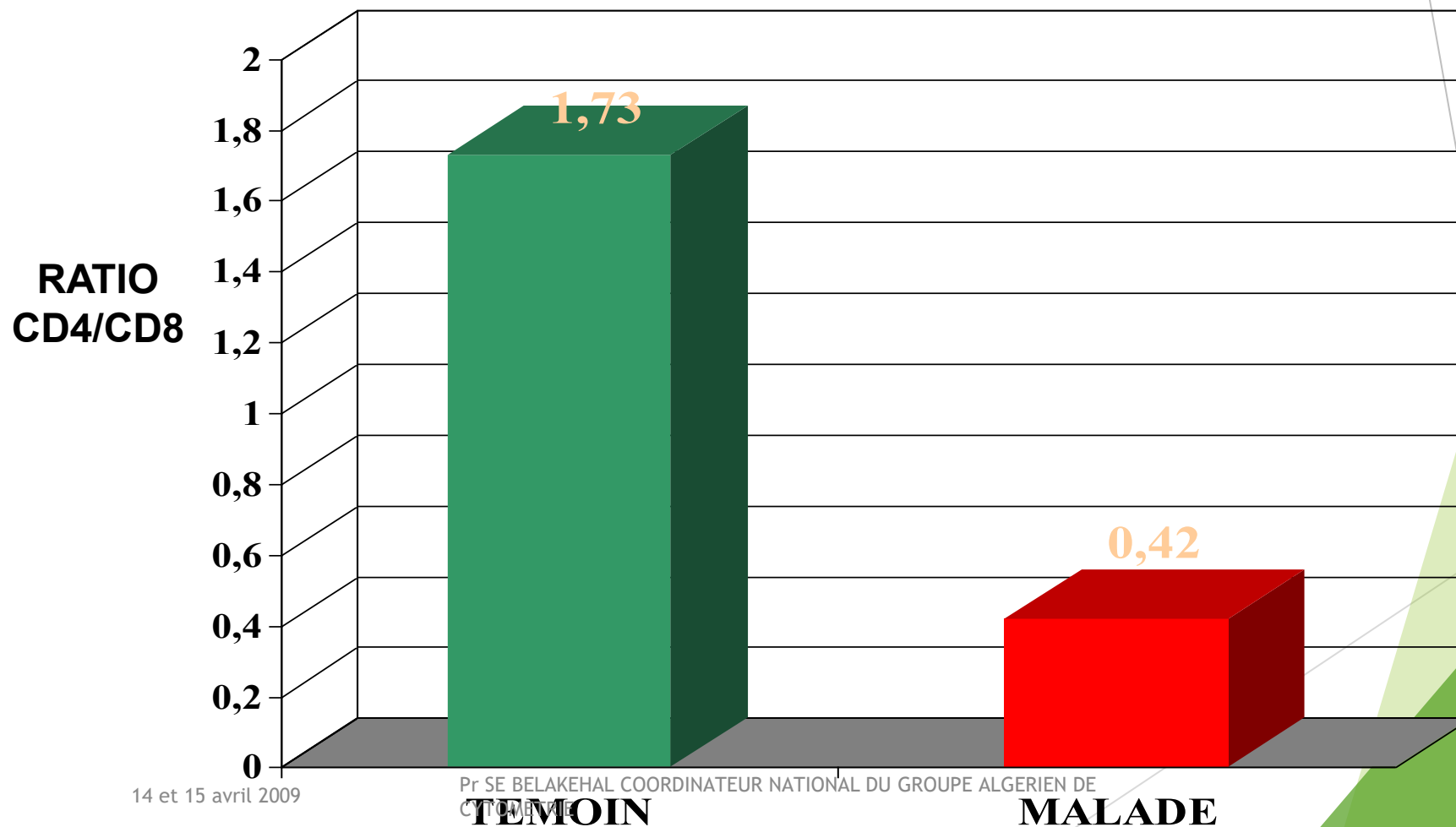
ddl=207



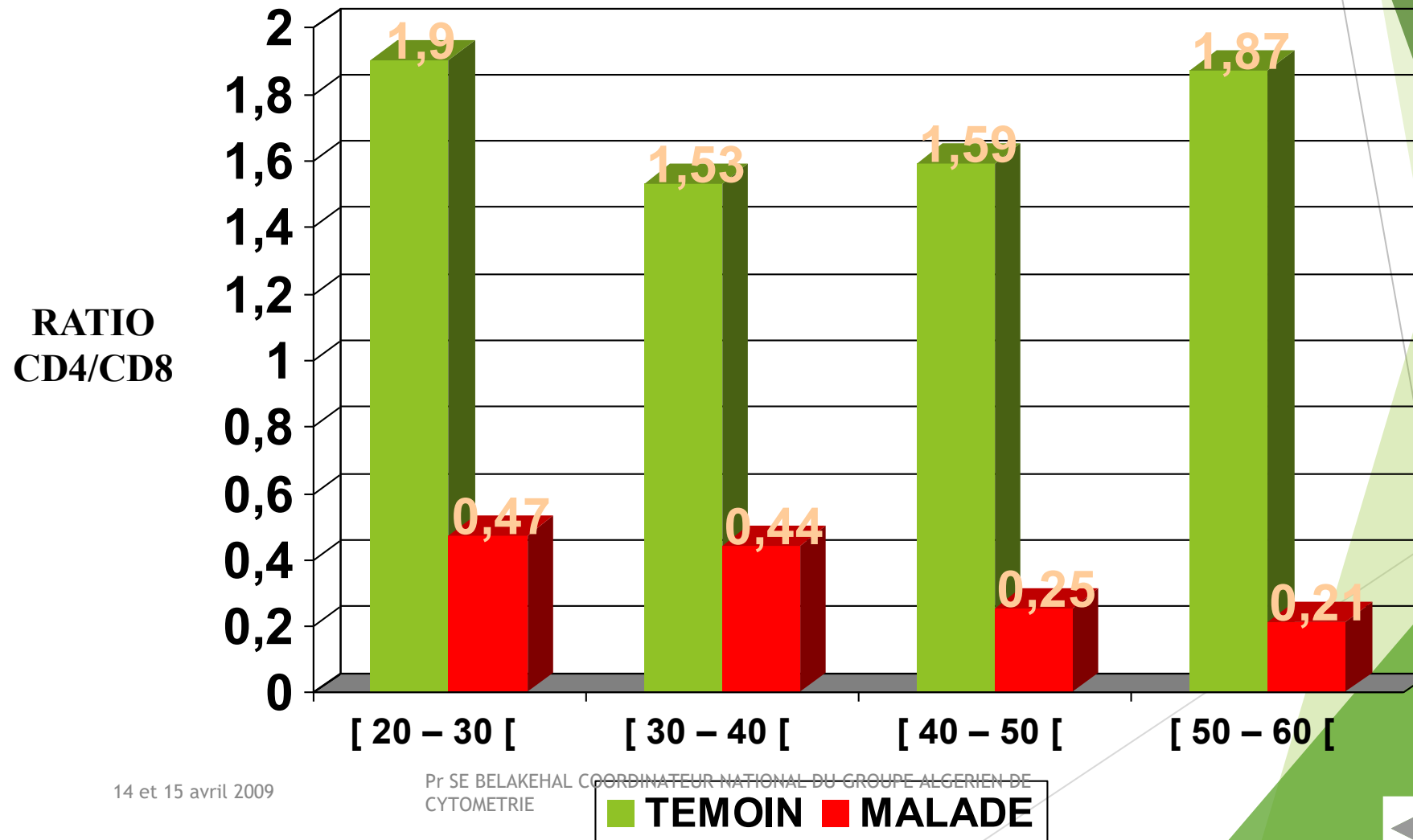
DOSAGE CD4 COMPARANT LES DEUX POPULATIONS



DOSAGE COMPARANT LE RATIO CD4/CD8 ENTRE LES DEUX POPULATIONS

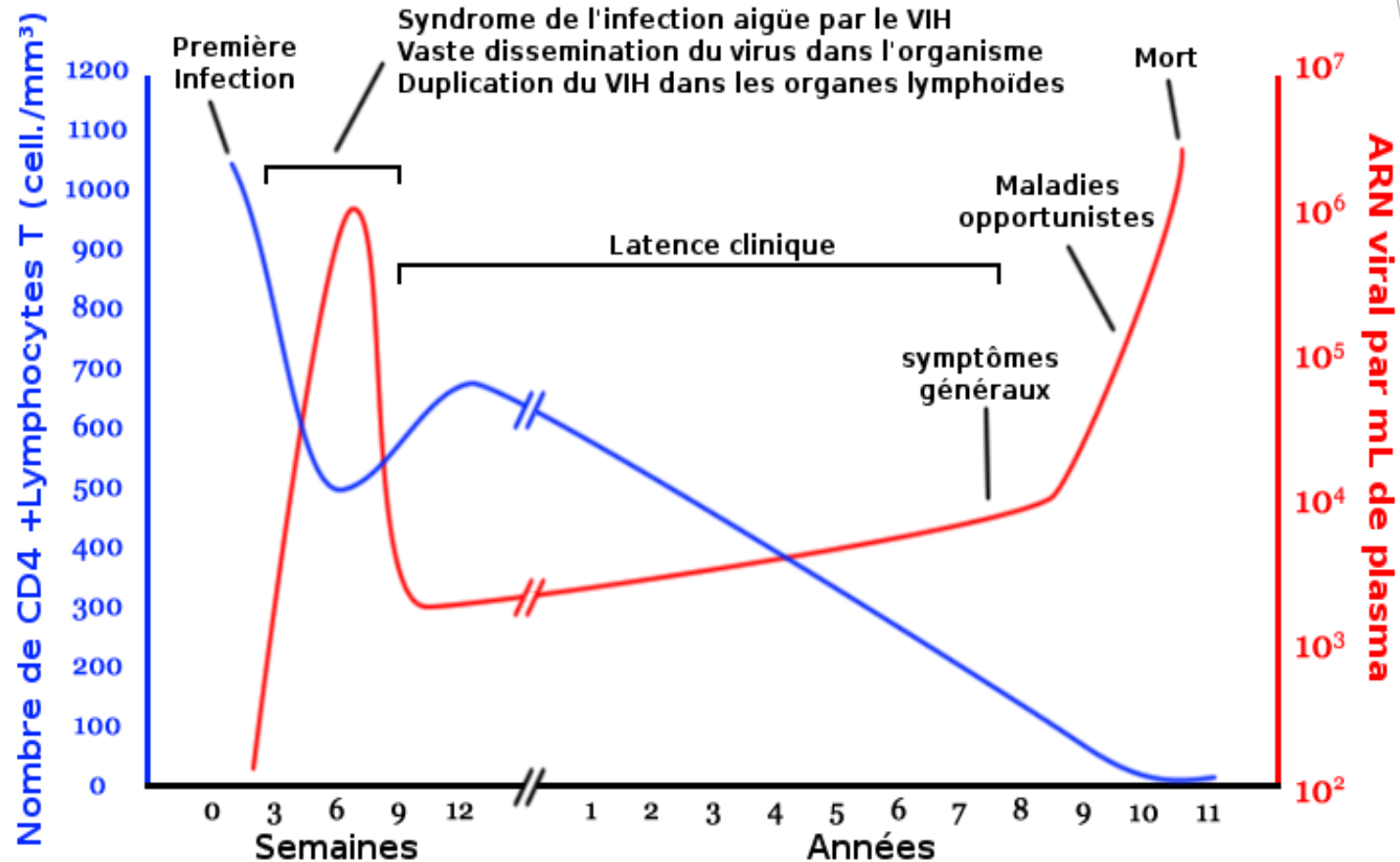


DOSAGE COMPARANT LE RATIO CD4/CD8 ENTRE LES DEUX POPULATIONS EN FONCTION DE L'AGE



TYPES DE PATIENTS SUIVIS

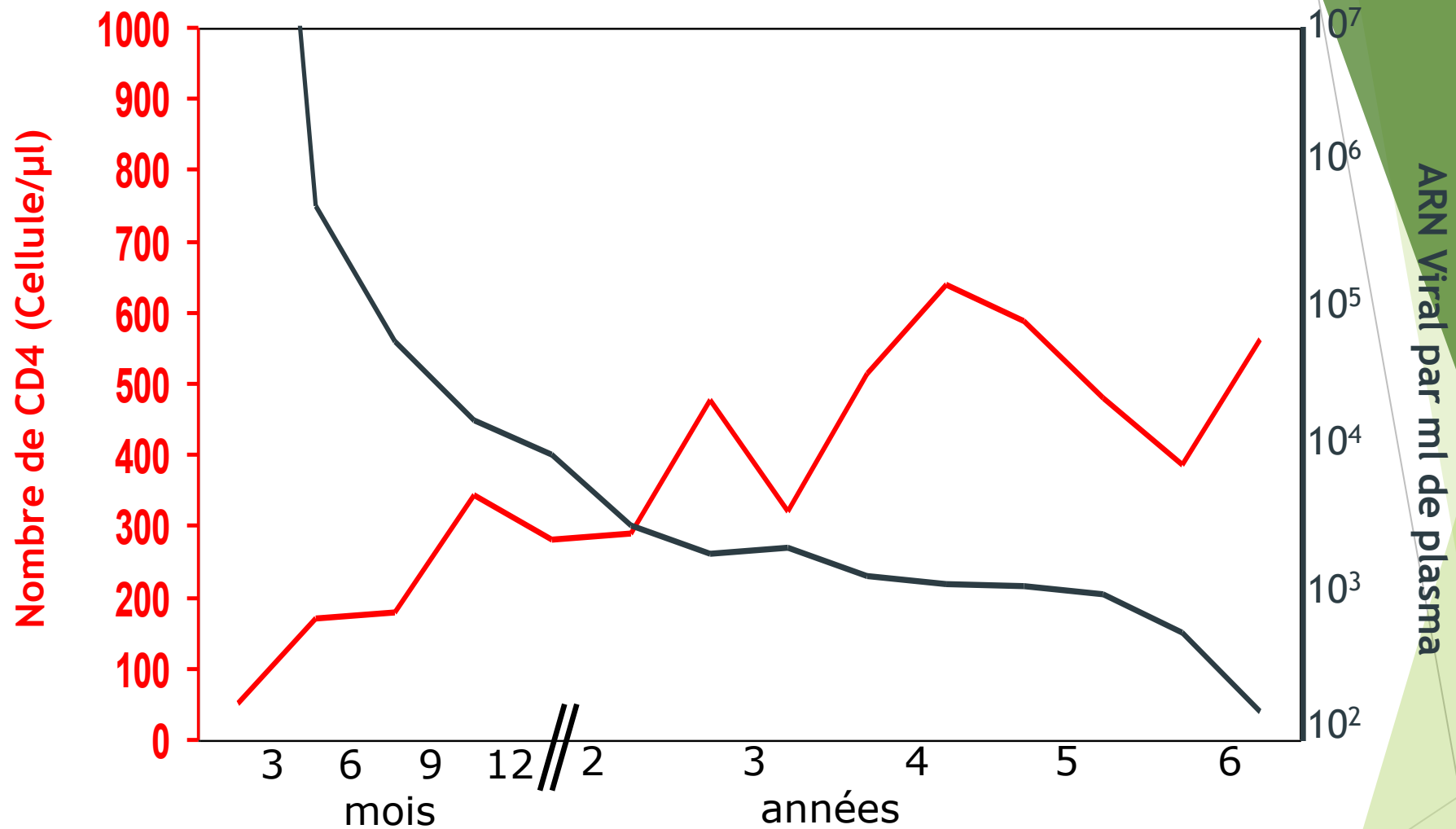
Taux de CD4cell/μl	Premier Taux de CD4 Min-Max	Dernier Taux de CD4 Min-Max	Durée	Nombre de malades
Moins 200	1 - 199	1 - 961	6mois à 1an	46
	3 - 160	179 - 926	1an à 6ans	
Entre 200-350	229 - 346	205 - 870	6mois à 1an	18
	219 - 337	80 - 655	1an à 6ans	
Plus de 350	385 - 980	250 - 984	6mois à 1an	22
	372 - 772	393 - 914	1an à 6ans	



EVOLUTION DU TAUX DE CD4 ET DE LA CHARGE VIRALE CHEZ UN MALADE HIV

(Réf: HIV-1 infection, Nature 1995)





EVOLUTION DU TAUX DE CD4 ET DE LA CHARGE VIRALE CHEZ UN MALADE HIV SUIVI AU C.T.S.A (sur 15 prélèvements)



DISCUSSION

- ❖ Parmi les patients HIV positifs sous thérapie, régulièrement suivis, 64% ont vu leur taux de CD4 augmenté .Alors que pour 36% des patients ce dernier est reste stable est a même diminué dans certains cas .
- ❖ Le dosage régulier du taux de CD4 chez les patients HIV positifs sous thérapie reste un facteur important et déterminant dans l'évolution de la maladie.



CONCLUSION

La détermination du taux de CD4 par CMF est un indicateur significatif dans la progression de la maladie HIV.

La CMF est devenue un outil indispensable pour certains domaines de la médecine (comme l'hématologie) ou de la recherche (comme l'immunologie).



Contrôle de qualité des greffons de **CSH**

Numération des cellules CD34

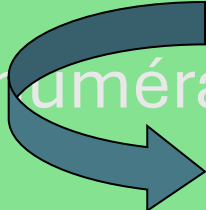
F.Hariche, N.Aouanouk, F.Zerhouni, R.M.Hamladji.

Laboratoire d` hématologie-Centre Pierre et Marie Curie, Alger.

Contrôle de qualité des greffons de CSH

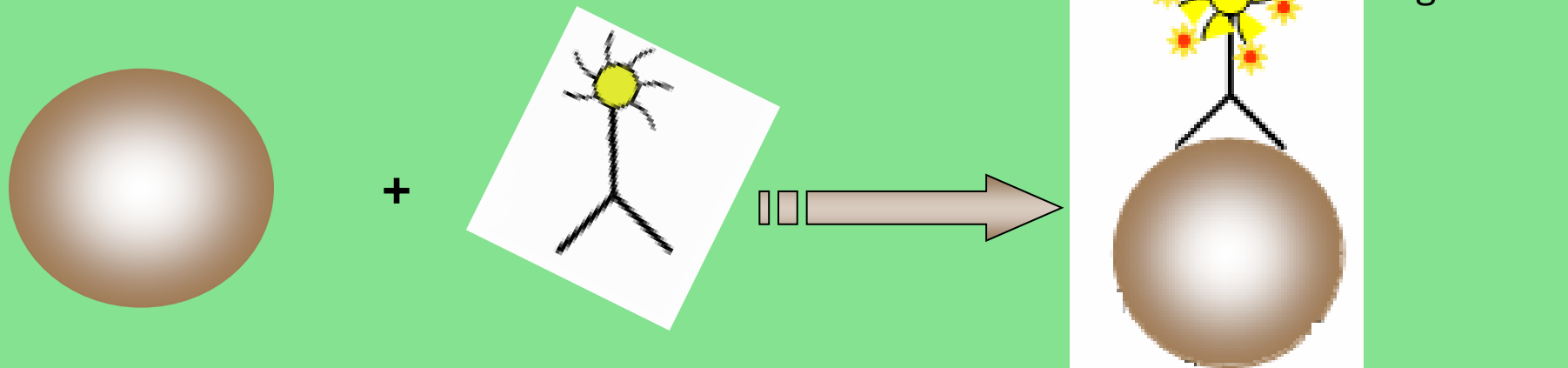
- Composition cellulaire globale: NFS:
 - GB, GR, Plaquettes (automates).
 - formule leucocytaire, CMN (Frottis,MGG).
 - viabilité au bleu trypan (mo).
- Richesse en CSH et progéniteurs:

numération des cellules CD34



Caractérisation des CSH

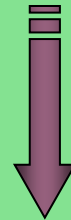
- Tests clonogéniques: fonctionnels
 - capacités de multiplication et différenciation.
 - délai de réponse: **14 jours!!!**
- Phénotype: Ag spécifique = Ag CD34



- Délai de réponse: **14 à 30 jours!!!**

Mais...

- Cellules CD34+:
- Population hétérogène: totalité des progéniteurs, CSH multipotents (CFU GEMM) et unipotents (BFU-E, CFU-GM, CFU-Meg)
- Événements rares (~1% dans mö, < 0.1% dans le sang)

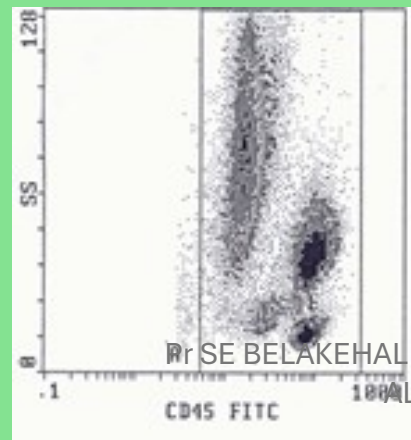


- Stratégies de fenêtrages multiparamétriques afin de purifier les CSH/ différents prélèvements.
- N = 60.000 – 75.000 cellules.

Critères d`identification des CSH

- Cellules de faible structure interne: SSC faible
- Cellules CD34+
- Cellules CD45+ faible ou intermédiaire.

GR, EB, Plq
CD45 neg



CD45: Ag pan leucocytaire (CLA).

Ly: CD45+ forts

Mono: CD45+ intermédiaires

Granulocytes: CD45+faibles.

Prélèvements -I-

- Greffons bruts:
 - CSP: produits de cytophérèse,
 - moelle osseuse,
 - sang de cordon,
- greffon décongelé:
 - contrôle à la réinjection (décongélation d` un tube témoin pilote)
- Sang veineux: après mobilisation:
valeur prédictive de la qualité de la récolte cytophérèse:
 choix du timing: moment optimal

($10^6 \text{CD34}^+/\text{ul} \sim 2 \times 10^6 \text{CD34}^+/\text{kg}$).

Pr SE BELAKEHAL COORDINATEUR NATIONAL DU GROUPE
ALGERIEN DE CYTOMETRIE

Prélèvements –II–

- < 24H.
- EDTA: Sang
- ACDA: Cytaphérèses.
- 18-25°C jusqu'` au marquage.
- **Contrôle de Num avant tout marquage.**

Les procédures...

- Double plate-forme: 2 étapes.

- Compteur hématologie: NFS (WBC + formule leucocytaire)
- Cytomètre: % cellules CD34+



$$VA (CD34+/ul) = WBC * \%CD34$$

CV élevé!!

- Simple plate-forme: 1 étape. (+ précises)

Tubes + billes (nbre connu)

$$VA(CD34+/ul) = \frac{\% CD34 \text{ comptés}}{\text{Nbre billes comptées}} \times \frac{\text{nbre billes dans tube}}{\text{volume de l' échantillon}}$$

Notre expérience

- Num CD34 depuis 1998 (Greffes de CSH Avril 1998).
- FacsCalibur™: 3 couleurs (laser blue 488nm).
- Procount™(BD Biosciences):
 - Technique simple plate-forme
 - Tubes Trucount™
 - Lyse no wash: - sans séparation cellulaire,
 - sans lavages (**pertes cellulaires sélectives !**)
 - sans fixation.
 - lyse douce (NH₄Cl)!!
 - Analyse automatique des résultats.

Kit procount.

<u>Réactif CD34</u>	<u>Réactif Contrôle</u>
Nucleic Acid Dye (ADN/ARN)	Nucleic Acid Dye (ADN/ARN)
CD34-PE (classe III)	IgG1-PE (non Humain)
CD45-PerCP	CD45-PerCP

+ Tubes Trucount : billes en concentration connue (fabriquant).

Précautions

- Respecter le rapport nbre cellules/AC!!

PBSC: Dilution systématique : $WBC \leq 50G/L$

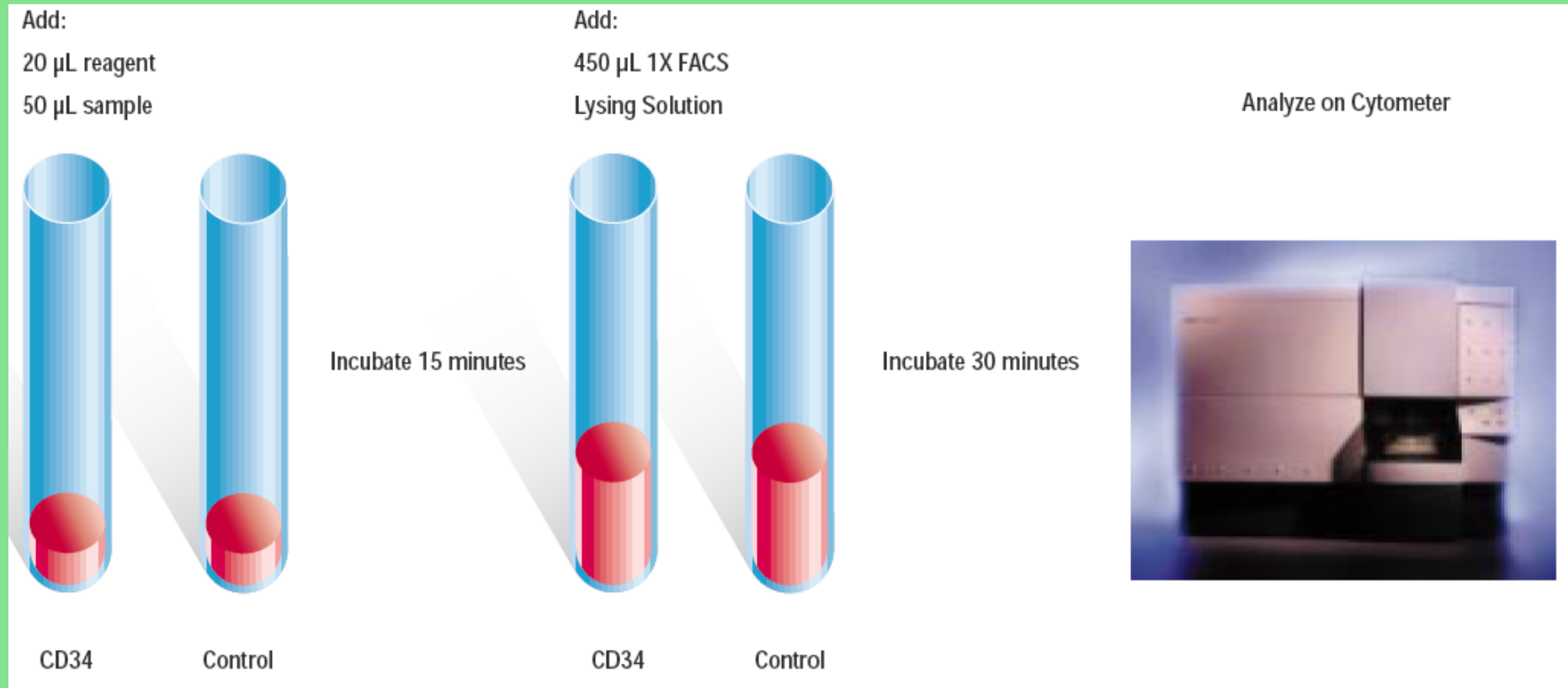
Attendre la Num!!

x le résultat par le facteur de dilution.

- Si $CD34 > 2000/ul$: linéarité!

Faire une dilution plus grande!

1- Marquage cellulaire- IFD.

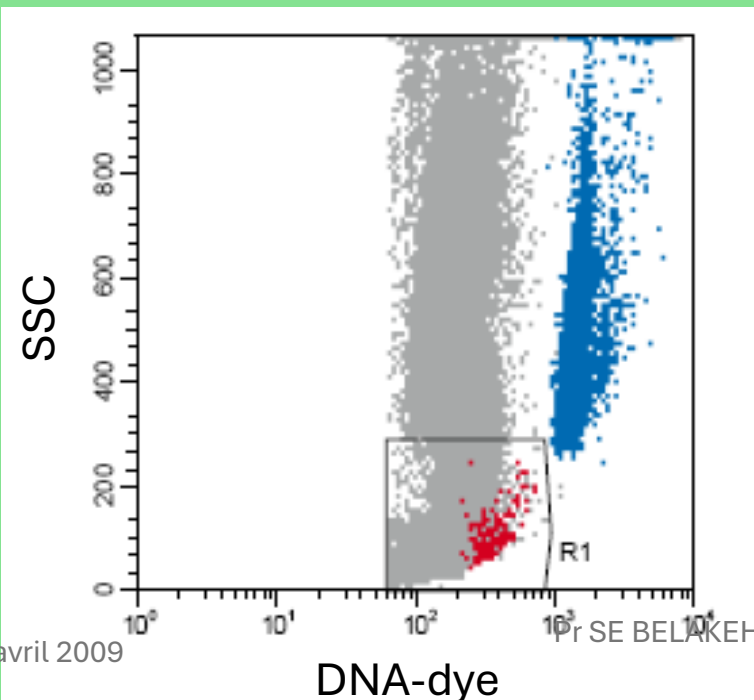


Acquisition: 60 000 cellules et 100 CD34 minimum.

2- Stratégie de fenêtrage -I-

- ➡ **But:** - sélectionner la pop d`intérêt
- réduire les interférences **des débris** et des cellules matures

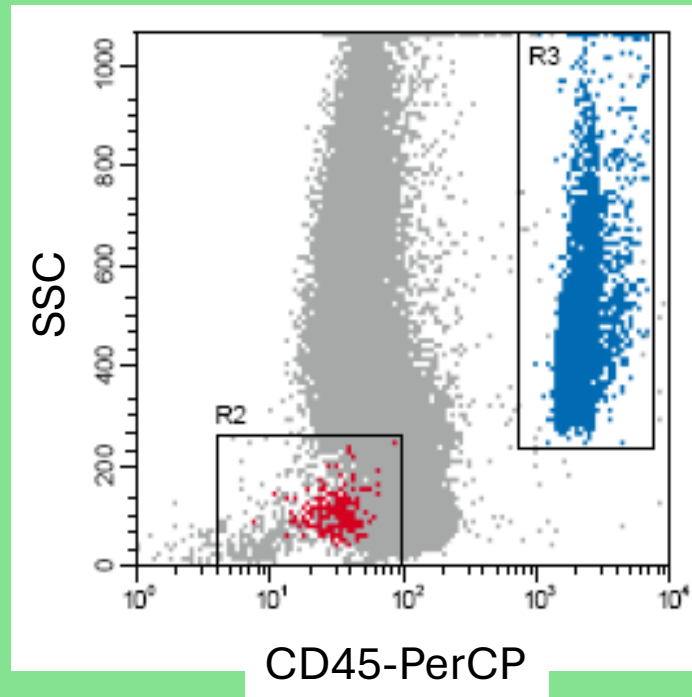
Analyse 3 graphiques! Fichier CD34 (d`abord).



1er cytogramme: DNA dye/SSC:

- Éliminer GR, plq, débris (**seuil**)
- **1ère fenêtrage R1**
- 60.000 événements.

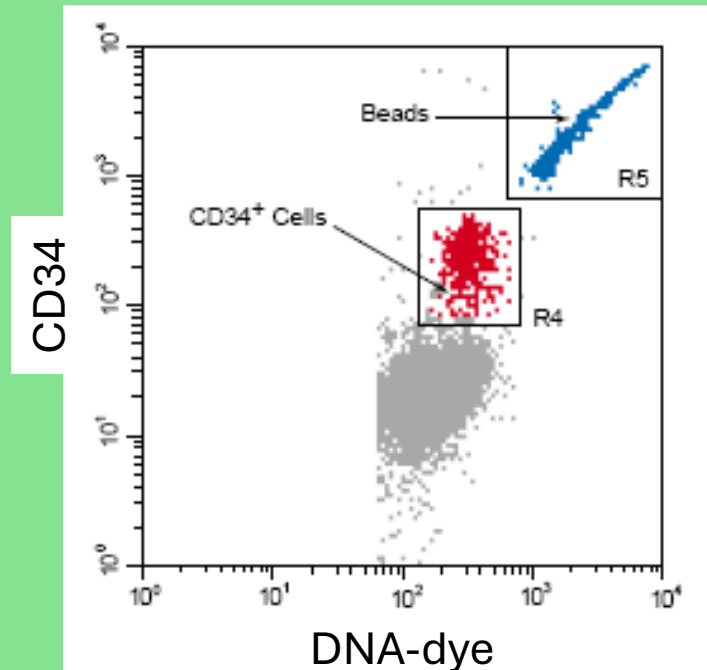
2- Stratégie de fenêtrage -II-



2ème cytogramme:CD45 perCP/SSC:

- Sélection des cellules CD45 faibles ou intermédiaires
- 2ème fenêtre R2.
- Fenêtre R3 billes.

2- Stratégie de fenêtrage -III-



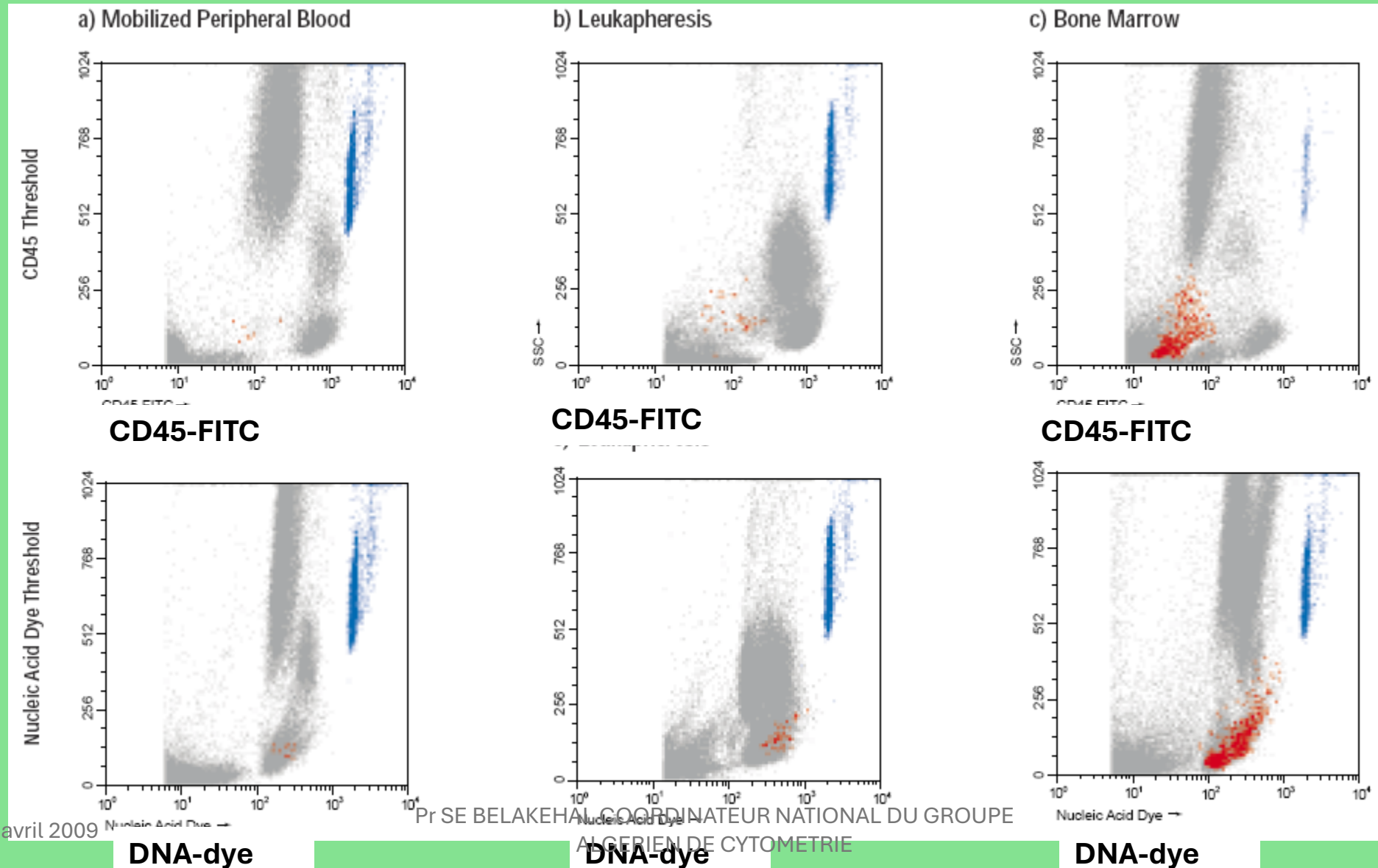
3ème cytogramme: DNA dye/CD34-PE:

- Conditionné sur R1 et R2
- Sélection des cellules CD34⁺ (R4)

$$\text{CD34}^+/\text{ul} = \frac{\text{Nbre CD34 (R4)}}{\text{Nbre billes (R3+R5)}} \times \frac{\text{nbre billes dans tube}^*}{50}$$

Appliquer les mêmes régions fichier de contrôle (**ajuster si nécessaire**)

Seuil: DNA- dye vs CD45.



Résultats

- ***Nbre CD34+/ul.***
- Multiplier par volume de la poche (ml),
- Diviser par poids du receveur (kg)

$N \times 10^6$ cellules/kg (poids R)

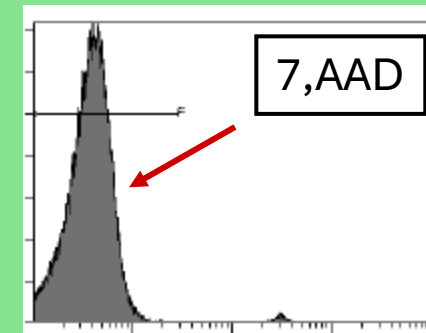
Avantages et inconvénients

- Avantages:

- Reproductible, sensible, rapide: 1H – 1H30min.
- fenêtrage automatique (Procount™)
- Fenêtrage utilisateur (cellquest pro™).

- Inconvénients:

- Sensible aux **erreurs de pipetage!!**(Reverse pipeting)
- Pas de marqueur de **viabilité cellulaire** (7,AAD)
(Bleu Trypan insuffisant CD34 vivantes??.)
- Utilité du DNA-dye??? (seuil sur CD45).
- ***Nouveau Kit BD Sept 2009? (avec viabilité!)***



Recommandations de l`ISHAGE (ISCT 2002)

International Society of Hematotherapy and Graft Engineering.

- **Anticoagulant:** - EDTA Sang
- ACDA produits de cytophérèse.

Analyse:

- Diffraction FSC/SSC
- Double fluorescence CD34/CD45

Type d` AC et de fluorochromes:

- CD45-FITC
- CD34-PE (classe II ou III)

Marqueur de viabilité cellulaire: (7,Amino-Actinomycin D).

Technique lyse no wash, Duplicate.

Contrôle isotypique

Analyse de 75000 cellules et 100 CD34 minimum.

Immunophénotypage dans les lymphomes malins non hodgkiniens.

Diagnostic par cytométrie en flux des LMNH sur liquide biologique et ponction-aspiration ganglionnaire.

S.Oukid, S.Taoussi, M.T.Abad.

Service Hématologie, CAC Blida.

Introduction:

Les LMNH sont des hémopathies lymphoïdes malignes caractérisées par une infiltration ganglionnaire ou extra ganglionnaire par des cellules lymphoïdes malignes et

monoclonales issues soit de la lignée B (85% des cas) soit de la lignée T.

La morphologie des cellules lymphomateuses (petites ou grandes cellules) et l'architecture de la prolifération définissent le type histologique du lymphome.

Une des applications principales de la cytométrie en flux au sein d'un laboratoire

d'hématologie est d'aider à caractériser au mieux ces pathologies

La CMF ne se substitue pas aux techniques traditionnelles utilisées pour le diagnostic de ces pathologies: La cytologie ,l'histologie et l'immunohistochimie

restent les techniques de référence pour la classification de ces entités.

La cytométrie en flux vient en complément parfois décisif de ces techniques en apportant des informations complémentaires permettant de mieux définir ces entités et en particulier en précisant la monoclonalité.

Avantages et intérêt de la cytométrie en flux

- Rapidité des résultats
- 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 (lésions monoclonales ou polyclonales).

STRATEGIE D'ANALYSE:

Un premier panel d'orientation va être utilisé de manière systématique lorsque nous recevons un échantillon pour suspicion d'infiltration par un processus lymphoprolifératif :

CD19, CD5, k, Lambda, CD3,CD4,CD8,NK.

En fonction des résultats obtenus, nous déciderons des marquages à mettre en route pour préciser au mieux le phénotype des cellules anormales que nous aurions mises en évidence à l'aide de ce premier panel.

Matériels et méthodes:

Dépistage et diagnostic des LMNH: sang, moelle, liquide pleural et ponction aspiration ganglionnaires.

Matériel biologique

- **Sang total , moelle ou liquides biologiques : liquide pleural , ponctions aspiration de suc ganglionnaire**

Méthodes d'étude

- **Lyse ,lavages, marquage**
- **Acquisition = 10000 évènements BD Facs Calibur 4 couleurs**
- **Plusieurs étapes**
 - **Panel de dépistage**
 - **Panel Diagnostique**
 - **Lymphoproliférations B**
 - **Lymphoproliférations T**

Résultats:

A: Etude sur le sang et moelle:

- 30 patients type: 03 sur étude de la moelle et 27 sur le sang.
- IL s'agit de 11 femmes et 19 hommes.
- moyenne d'âge de 66,25 ans (43 à 80 ans).

Tableau clinique:

- Adénopathies dans 08 cas.
- Splénomégalie dans 16 cas.
- Adénopathies et Splénomégalie dans 05 cas.

Biologie:

Hyperleucocytose dans 27 cas franche dans 55% des cas.

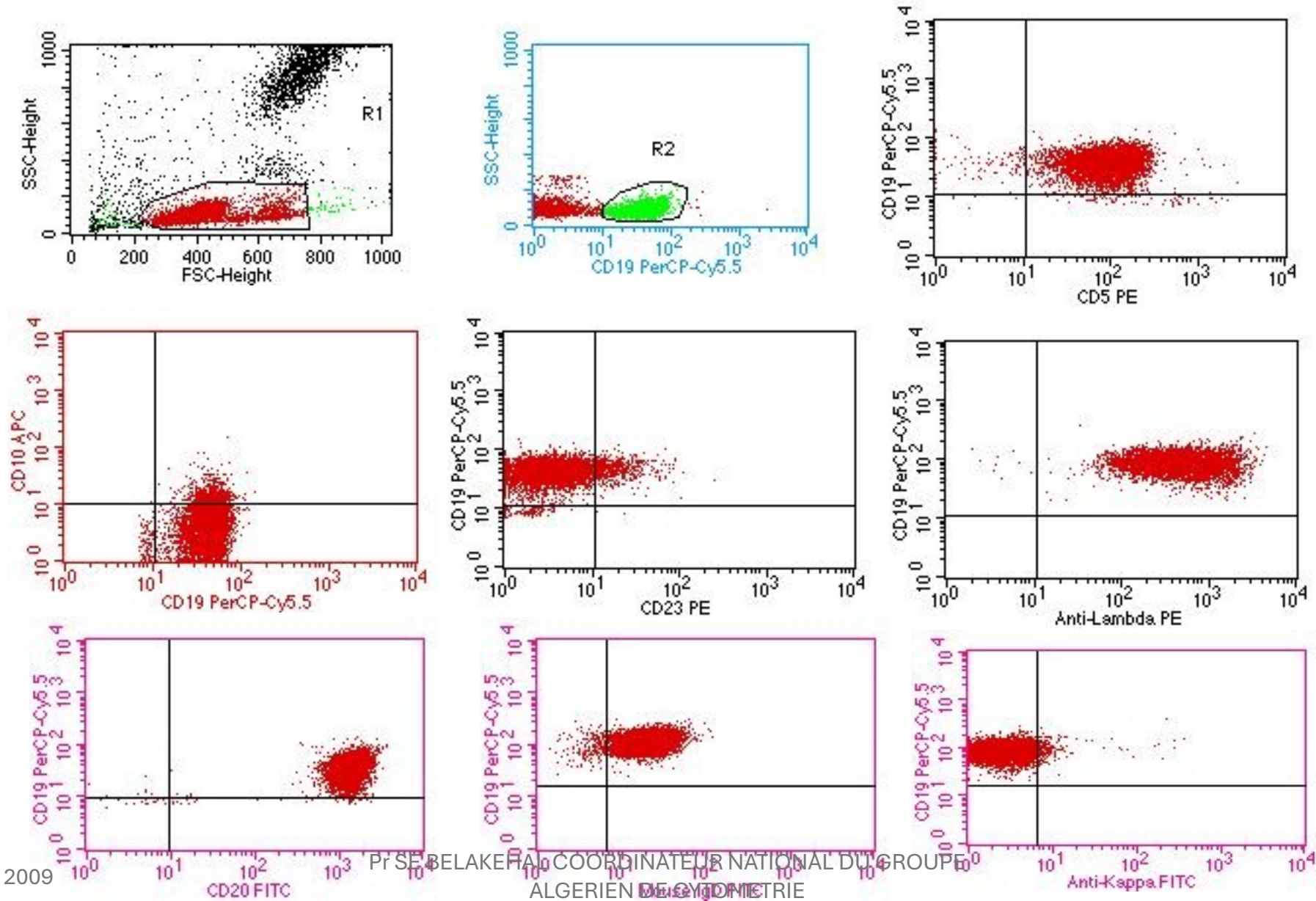
GB 69 727/mm³ (10 000 à 420 000/mm³)

Cytologie:

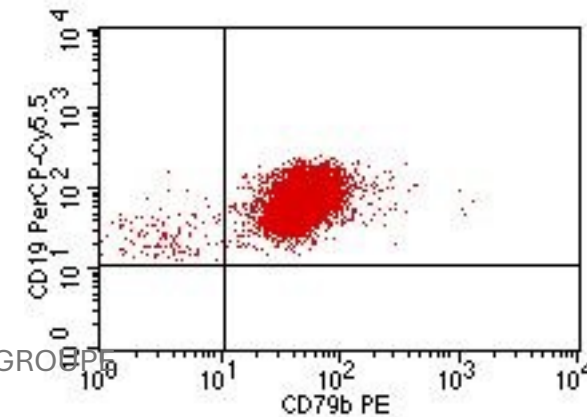
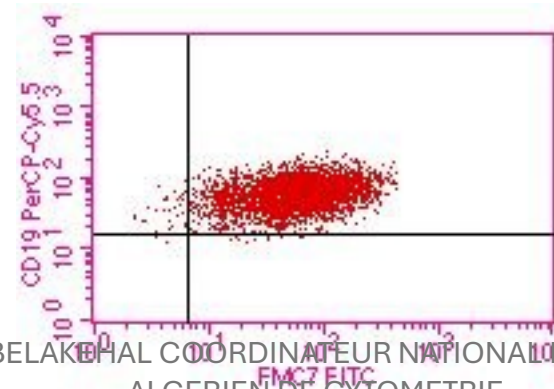
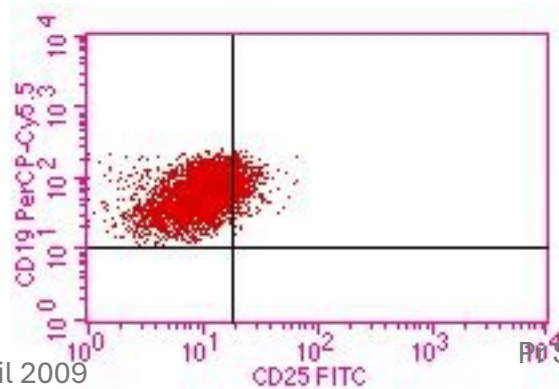
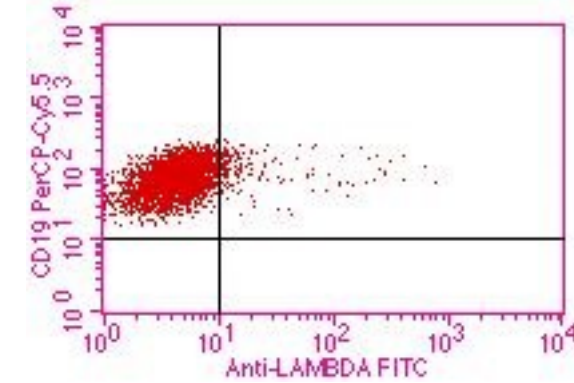
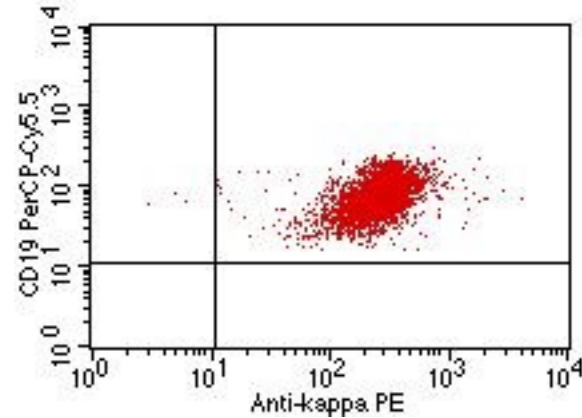
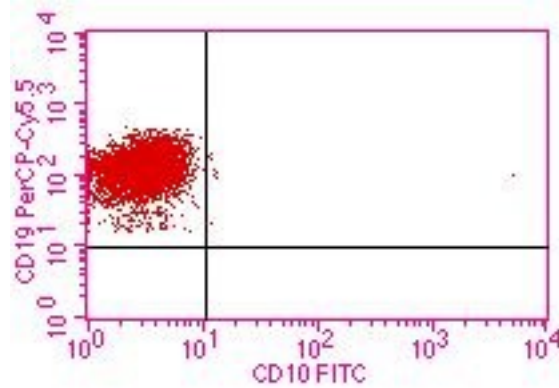
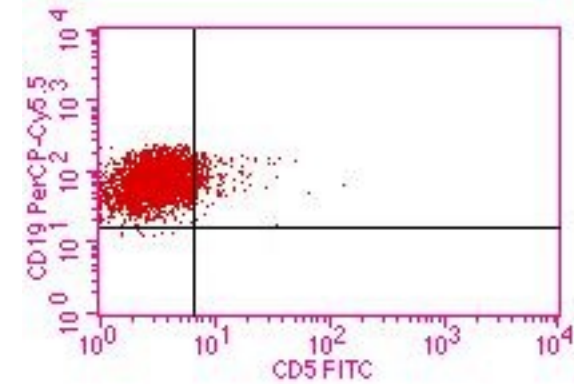
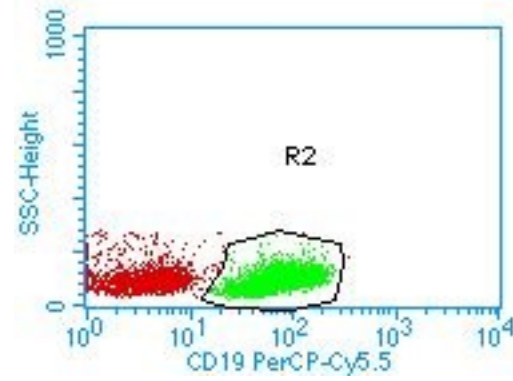
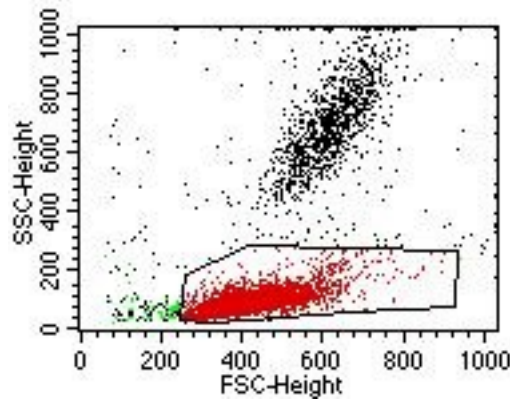
- LLC 12 cas.
- LNH bas grade 18 cas.

Diagnostic final après analyse en cytométrie:

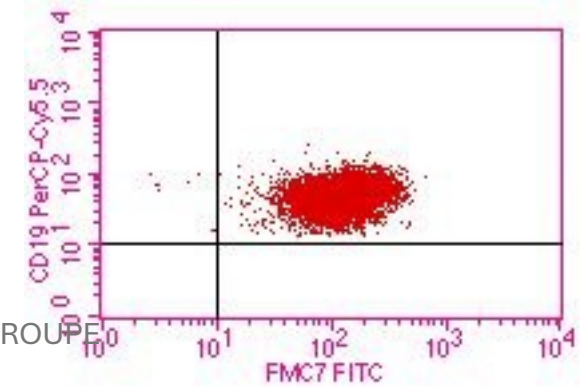
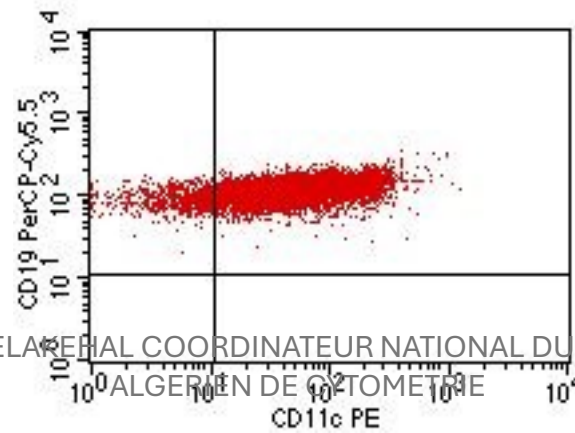
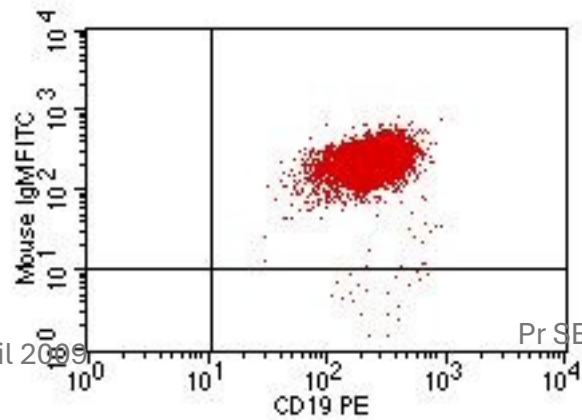
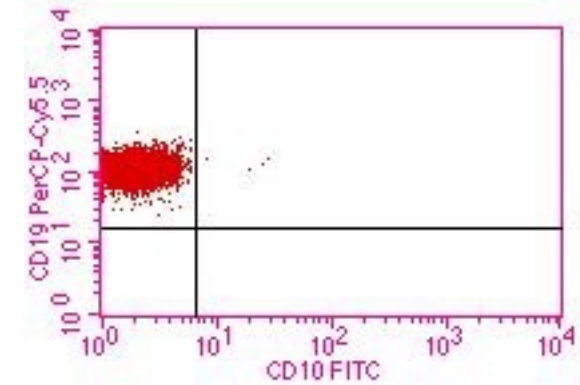
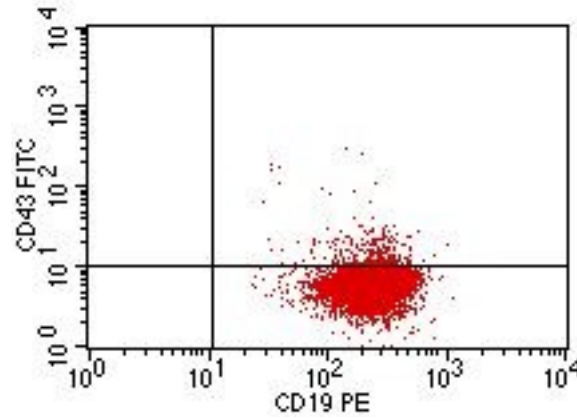
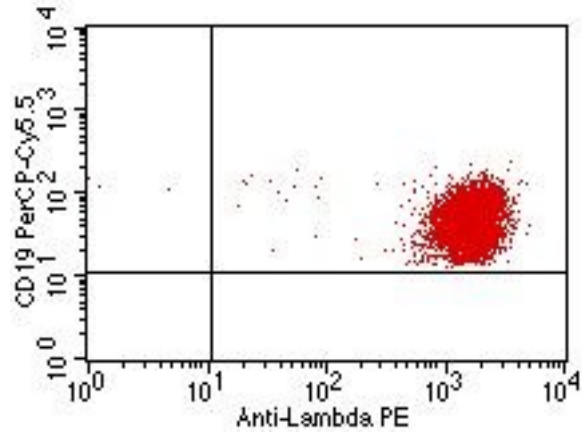
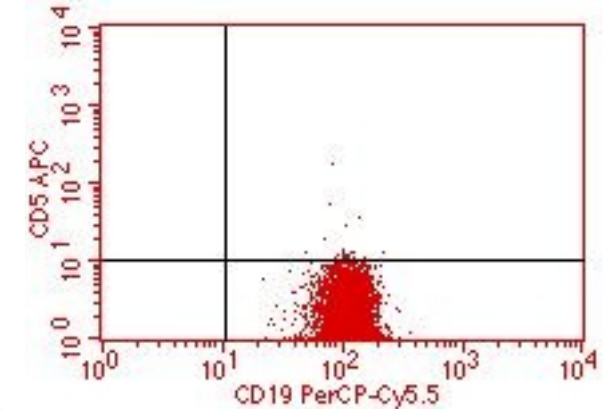
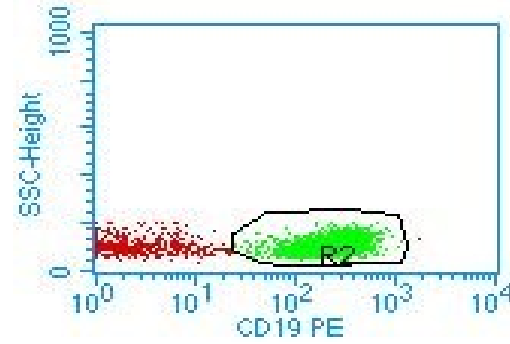
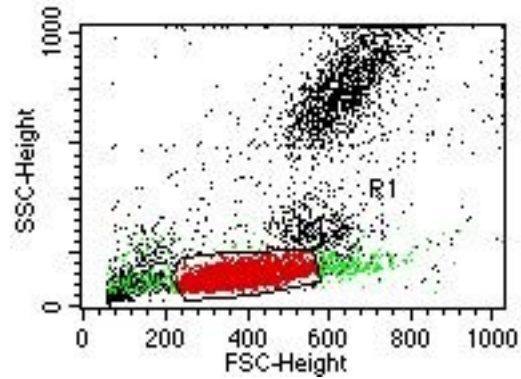
CYTOMETRIE	RESULTATS	LLC	LNH bas grade	Total
	LNH Folliculaire	01	05	06
	LNH Manteau	05	08	13
	LNH Zone marginal	02	02	04
	LNH Splénique Villeux	04	03	07



LNH de la zone marginal



LNH Splénique à lymphocyte villex

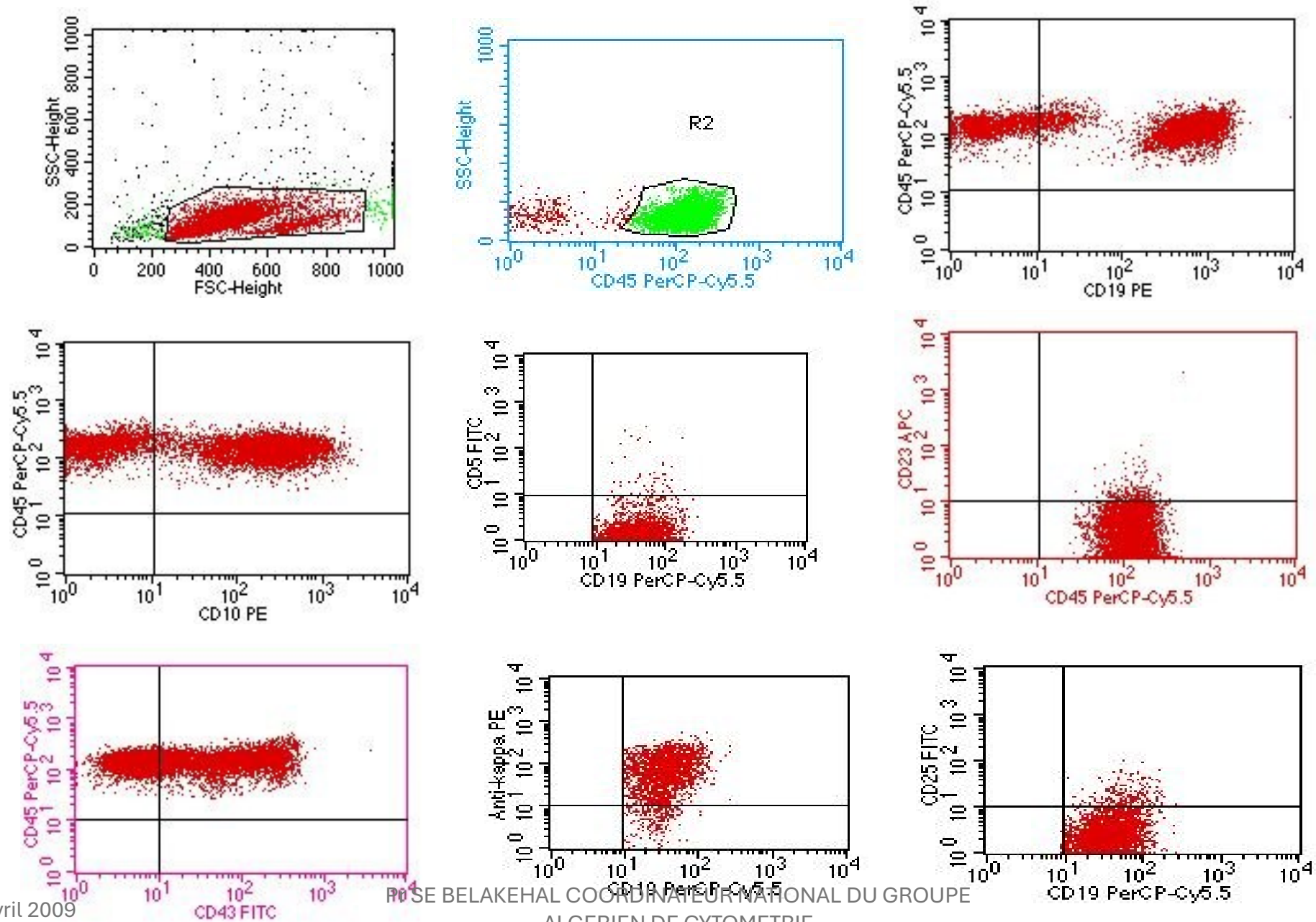


Résultats:

B: Etude sur le liquide pleural et sang :

- 03 patientes (55 – 65 – 79 ans).
- Clinique:
 - ADP et SPMG puis épanchement pleural .
 - SPMG III et épanchement pleural .
 - Signes généraux et épanchement pleural .
- Hyperleucocytose franche dans 02 cas.
- Cytologie du sang et liquide pleural :
 - Lym en grain de café.
 - Lym grande taille Nx encoche nucléole .
 - Lym irrégulier Nx en trèfle nucléole .
- Cytométrie sur sang et liquide pleural:
 - LNH Folliculaire.
 - LNH de la Zone marginal.
 - LNH du Manteau.

LNH folliculaire : liquide pleural



Résultats:

C: Étude sur ponction aspiration ganglionnaire :

- 11 patients typés .
- IL s'agit de 02 femmes et 09 hommes.
- moyenne d'âge de 54,18 ans (22 à 76 ans).

Cytologie:

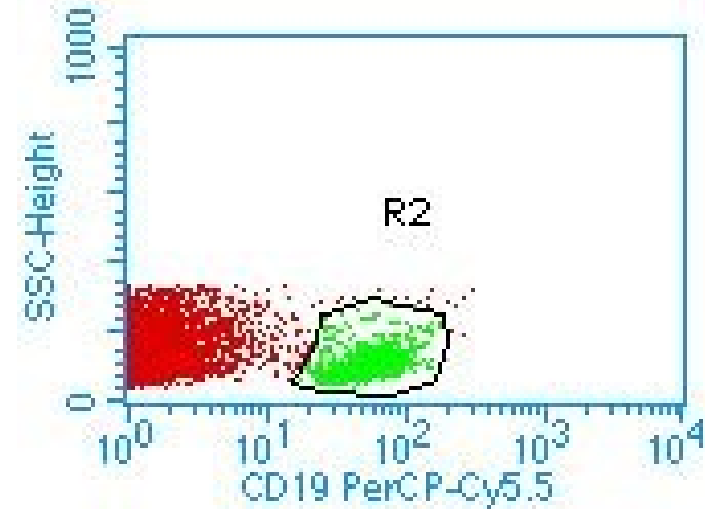
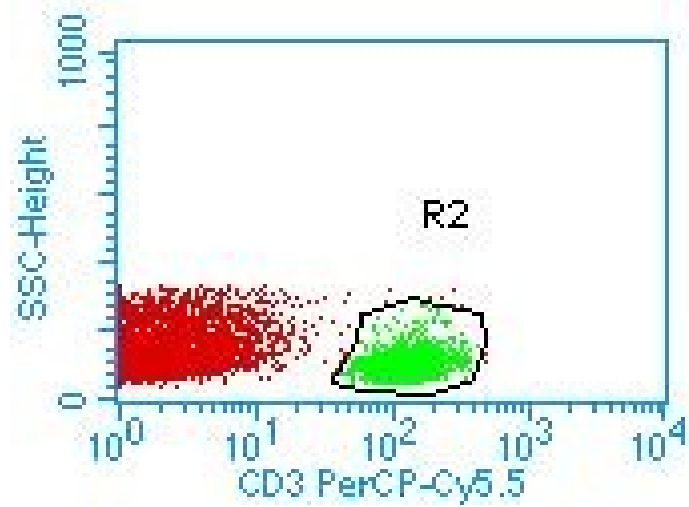
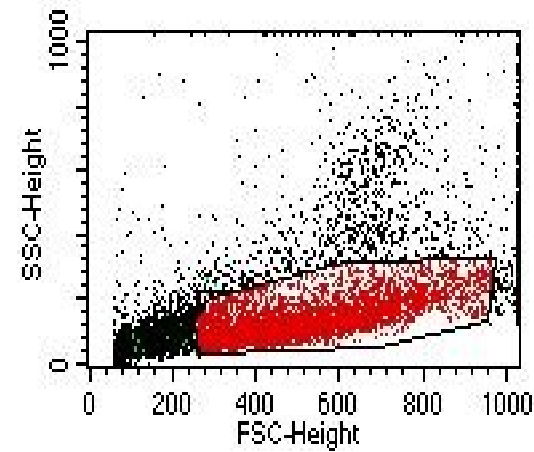
- LNH bas grade : 03 cas.
- LNH de Haut grade : 07cas.
- HDK : 01 cas

Diagnostic en Cytométrie:

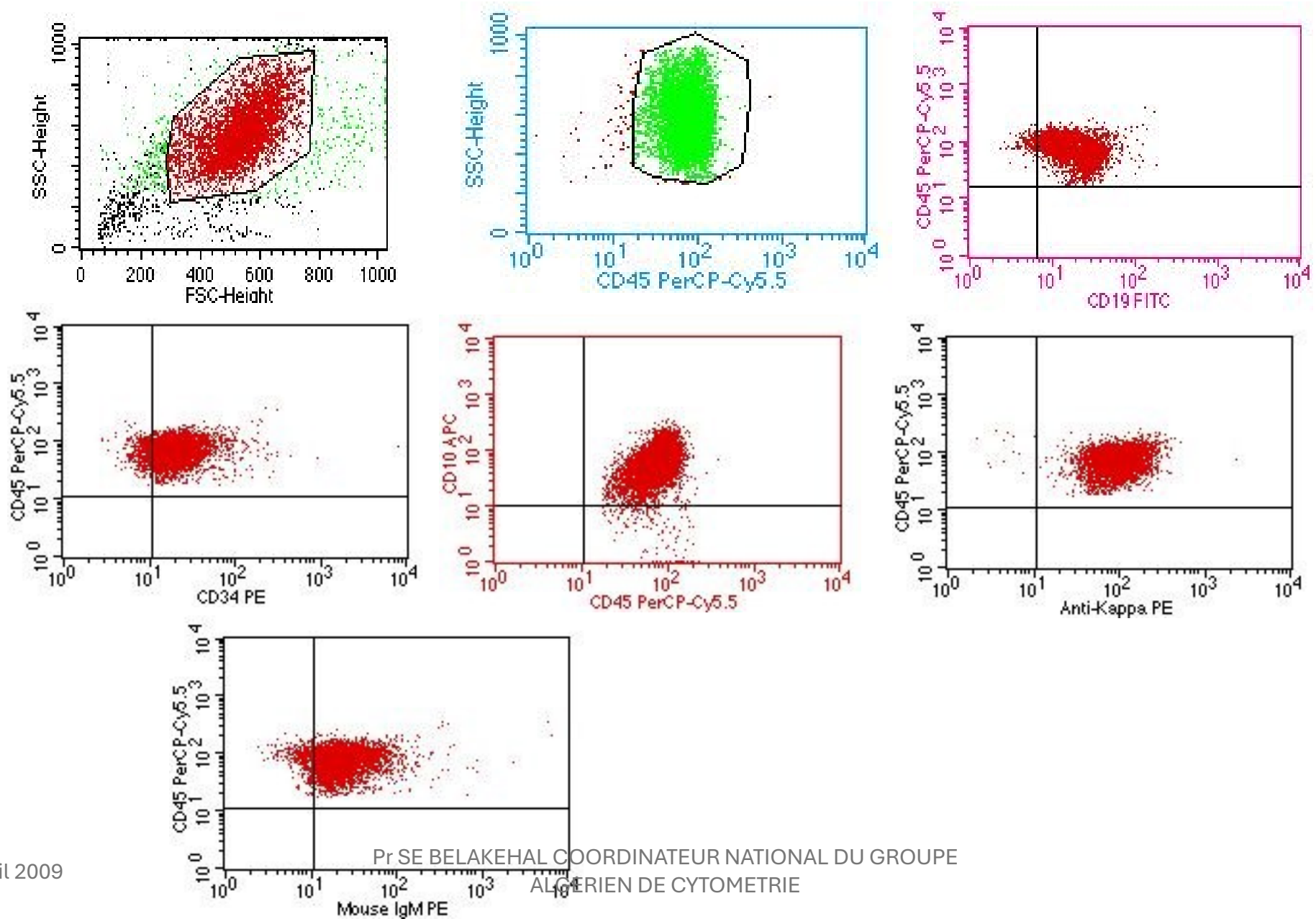
- Métastase : **01 cas**
- LNH Manteau : **02 cas**
- LNH Folliculaire: **01 cas**
- LNH Burkitt: **01 cas**
- LNH Lymphoblastique B: **01 cas**
- LNH à grande cellule B: **04 cas**
- LNH T: **01 cas**

Métastase : sur ganglion

- **R1= 70,89%**
- **R2 CD19/R1= 22%**
- **R2 CD3/R1 = 24,6%**



LNH lymphoblastique B



Pr SE BELAKEHAL COORDINATEUR NATIONAL DU GROUPE
ALGERIEN DE CYTOMETRIE

Commentaire:

- Dans notre population de sang , moelle et ponction aspiration ganglionnaire traitées; la cytométrie en flux a été contributive en précisant le caractère monoclonal lymphomateux de la population typés dans la majorité de cas sauf 02 cas dont l'un s'est avéré une métastase et l'autre initialement considère comme un Hodgkin.
- Les 12 cas considère initialement comme des LLC qui sont avérés des LNH (Manteau, Folliculaire, villeux, Marginal).
- Dans certains situation il était important de précisé si l'atteinte pleural était spécifique (lymphomateuses) ou réactionnel (inflammatoire) : chez 03 patientes la CMF a porte des arguments important (monoclonalité) en faveur d'une atteinte spécifique .

IMMUNOPHENOTYPAGE DES LEUCEMIES AIGUES AU CHU ORAN



Dr SAIDI – Pr TOUHAMI

2^{ème} WORKSHOP DE CYTOMETRIE EN FLUX
Pr S. ZEMAL – Pr S. BOUJAD – Pr S. BOUJAD – Pr S. BOUJAD – Pr S. BOUJAD
ALGERIEN DE CYTOMETRIE
HCA 14 – 15 AVRIL 2009

14 et 15 avril 2009

168

Diagnostic de la leucémie aigue

1- Clinique

2- Cytologique :

Hémogramme

Fsp

Moelle osseuse

Type de leucémie aigue

Cytochimie

Immunophénotypage par
cytométrie en flux

Comment on procède au CHU Oran pour typer une leucémie aigue?

Prélèvement:

Moelle +++

Sang

Tube EDTA

SEPARATION DES CELLULES MONONUCLEES

PRINCIPE : LA SEPARATION DES LYMPHOCYTES EST FAITE SUR GRADIENT DE **FICOLL** ISOPAQUE DE DENSITE : 1,077 INTERMEDIAIRE ENTRE CELLES DES GLOBULES ROUGES ET DES GLOBULES BLANCS,

L'ANNEAU DE LYMPHOCYTES EST OBTENU APRES CENTRIFUGATION A GRANDE VITESSE PENDANT UNE COURTE DUREE DE TEMPS

TECHNIQUE (Ficoll)

EVALUATION DE LA CELLULARITE MEDULLAIRE SUR LAME

SI LA MOELLE EST RICHE ALORS ;

1/ DILUER LE SANG AU 1/2 AU TAMPON PBS PH 7,2(CELL WASH),

2/ DEPOSER DOUCEMENT A LA SURFACE DU MSL CETTE DILUTION, (1/3 MSL POUR 2/3 SANG DILUE) DANS UN TUBE SEC,

3/ CENTRIFUGER A 1800 TPM PENDANT 20 mn A + 18' C,

4/ RECUPERER LA COUCHE LYMPHO-PLAQUETTAIRE A L'INTERFACE ENTRE LE PLASMA ET LE MELANGE MSL,

5/ ASPIRER JUSQU'A CE QUE LA LIMITE ENTRE LES DEUX COUCHES SOIT UN INTERFACE NET,

6/ LAVER UNE FOIS LA SUSPENSION LYMPHOCYTAIRE DANS DU TAMPON 1ml DE CELL WASH PBS PAR CENTRIFUGATION A 2500 TPM PENDANT 10 mn,

7/ RESUSPENDRE LE CULOT EN FONCTION DE SON IMPORTANCE,

8/ REVERIFIER LA CELLULARITE DE L'ALIQUEOT ET LA PURETE DE LA SUSPENSION

1-Protocole de marquage: de surface

LYSE AVEC LAVAGE

1/Préparer les tubes

2/Distribuer 20 µl d'anticorps

3/Distribuer 100 µl de prélèvement

4/Incuber 15 min (température ambiante obscurité)

5/Ajouter 2 m1 de Lyse (lX en eau distillée)

6/Vortexer

7/Incuber 10 min (température ambiante obscurité)

8/Centrifuger 5 min à 1500 tr/mn température ambiante

9/Vider le surnageant par retournement

10/Ajouter 2 m1 de CellWash

11/Vortexer

12/Centrifuger 5 min à 1500 tr/mn température ambiante

13/Vider le surnageant par retournement

14/Ajouter 500 µl de CellWash

15/Lecture sur le Cytomètre

16/Logiciel CellQuestPro

2-Protocole de marquage: intracytoplasmique

LYSE AVEC LAVAGE ET INTRA-CYTOPLASMIQUE

1/Préparer les tubes

2/Distribuer 20 µl d'anticorps de surface

3/Distribuer 100 µl de prélèvement

4/Incuber 15 min température ambiante obscurité

5/Ajouter 2 ml de Lyse (1X en eau distillée)

6/Vortexer

7/Incuber 10 min température ambiante obscurité

8/Centrifuger 5 min à 1500 tr/min Température ambiante

9/Vider le surnageant par retournement

10/Ajouter 500 µl de FACSpermeabilising (1X en eau distillée)

11/Vortexer

12/Incuber 10 min température ambiante obscurité

13/Ajouter 2 ml de CellWash

14/Vortexer

15/Centrifuger 5 min à 1500 tr/min température ambiante

16/Vider le surnageant par retournement (reste environ 100 μ l de volume)

17/Distribuer 20 μ l d'anticorps intra-cytoplasmiques

18/Incuber 30 min température ambiante obscurité

19/Ajouter 2 ml de CellWash

20/Vortexer

21/Centrifuger 5 min à 1500 tr/min température ambiante

22/Vider le surnageant par retournement

23/Ajouter 500 μ l de CellWash

24/Lecture sur le Cytomètre

25/Logiciel CellQuestPro

E.G.I.L
**European Group for Immunological characterization of
Leukemias**

LES ANTICORPS MONOCLONAUX UTILISÉS

ANTICORPS	LIGNEE
CD34 , HLA-DR	Marqueurs d'Immaturité
CyCD79, CD19, CyCD22	Lignée lymphocytaire B
CyCD3,CD3,CD2,CD5,CD7,CD4,CD8	Lignée lymphocytaire T
CyMPO, CD13,CD33,CD117	Lignée myéloïde
CD41, CD42, CD61	Lignée plaquettaire
Glycophorine A,CD36	Lignée érythrocytaire
CD45	Pancellulaire
CD14, CD64	Lignée monocyttaire

LES MARQUEURS LES PLUS SPECIFIQUES POUR DETERMINER
L'APPARTENANCE D'UNE CELLULE A UNE LIGNEE CELLULAIRE

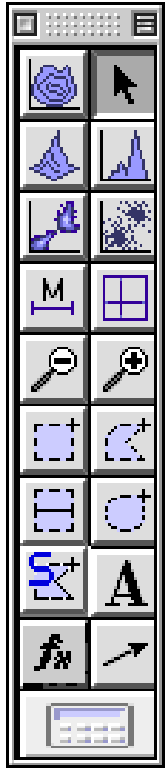
PANEL			
TUBES	FITC	PE	PerCP
1	IgG1	IgG2a	CD45
2	CD19	CD10	CD45
3	CD7	CD33	CD45
4	CD14	CD64	CD45
5	CD41	CD235	CD45
6	CD13	CD117	CD45
7	CD3	CD2	CD45
8	CD42	FL2	CD45
9	CD22	CD34	CD45
10	CD4	CD8	CD45
11	CyMPO	CyCD79a	CD45

ACQUISITION

LOGICIEL: Cell Quest Pro 

10 000 Événements

Réglage Leucémie Aigue



Browser: untitled

Acquisition Analysis

Acquisition Controls

☒ Setup **Acquire** Restart Save Abort

Directory: Hard Drive:BD App...uest Pro Folder: **Change...**

File: Data.001 **Change...**

Sample ID:

Patient ID:

Comments:

Leucogate Parameter Settings

P1: FSC-H

P2: SSC-H

P3: CD45 FITC

P4: CD14 PE

P5:

P6:

P7:

P8:

Time:

Experiment Components	Filename
Global Settings	
Global Acquisition & Storage Settings	
Acquisition Plots	
FSC-H/SSC-H	
FSC-H/SSC-H	
IMK Lymph	
Leucogate	Data.001
Mouse IgG1/Mouse IgG2a	Data.002
CD3/CD19	Data.003
CD3/CD4	Data.004
CD3/CD8	Data.005
CD3/CD16+CD56	Data.006

Inspector: Histogram

Basic Plot

Plot Type: Analysis ☒

File: Norm.001 ☒

Tube: Control ☒

X Parameter: FSC-H 1024 FSC-I ☒

Y Parameter: Gate No Gate ☒

Plot Title: Norm.001

Show Title: ☒

Histogram

Log Y Axis: ☐

Manual Scale: ☒ 200

Show Events: ☐

Smoothing: ☐ 1

Color: Line: ☐ Fill: ☒

Geometry

Location (inches): Top 3.5 Left 0.9

Size (inches): Width 2.3 Height 1.3

Text Style

Font: Geneva ☒

Size: 12 ☒

Style: **B I U @ S C E**

Justification: ☐ ☐ ☐

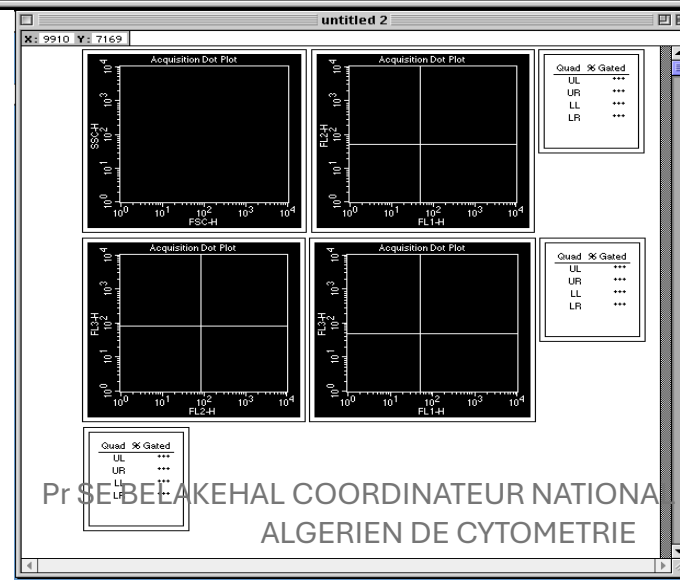
Text Color: ☒

Background: Opaque ☒

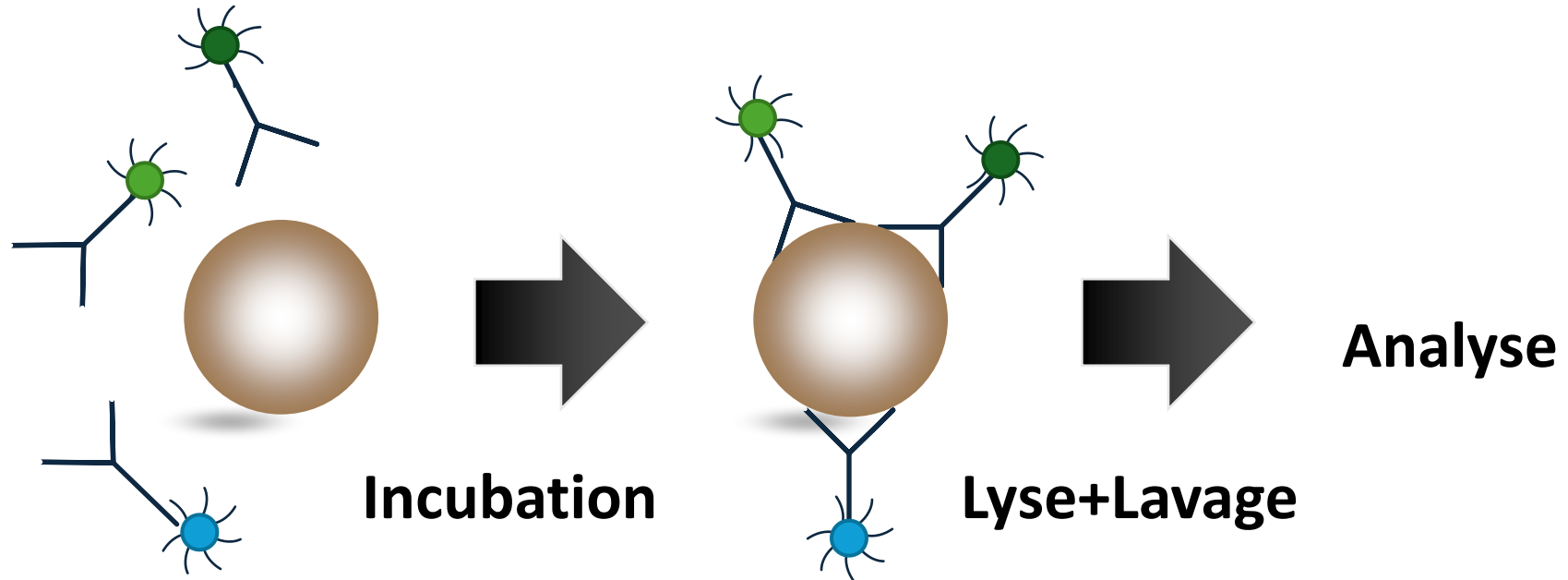
Geometry

Location (inches): Top 2.3 Left 0.7

Size (inches): Width 2.1 Height 0.7



Marquage Direct 3 couleurs

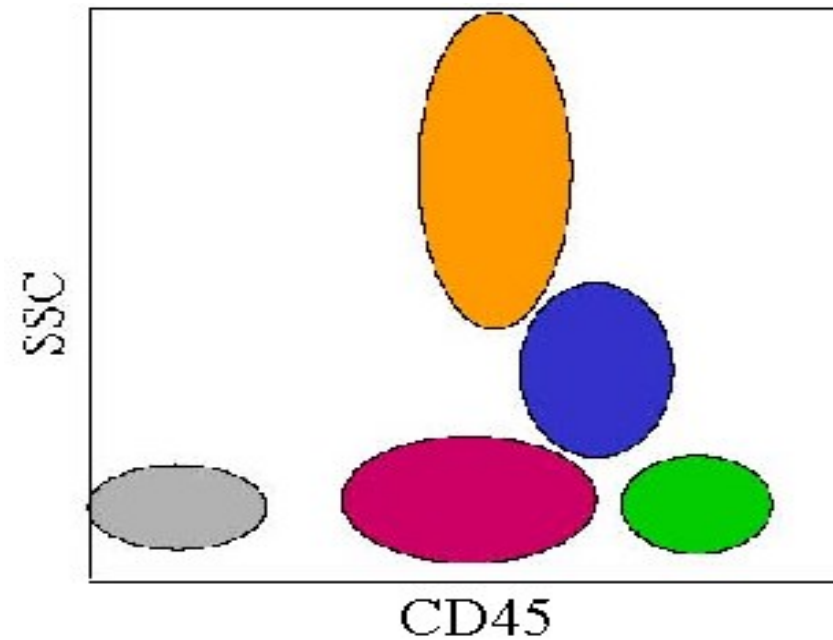
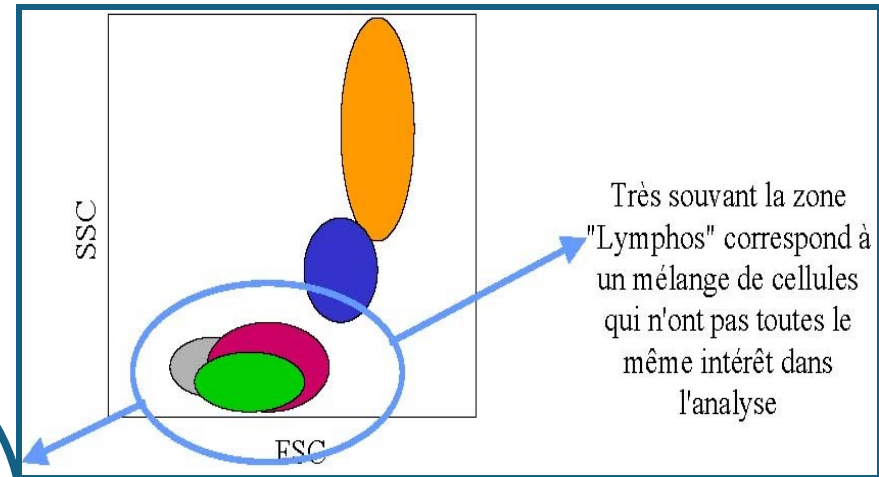
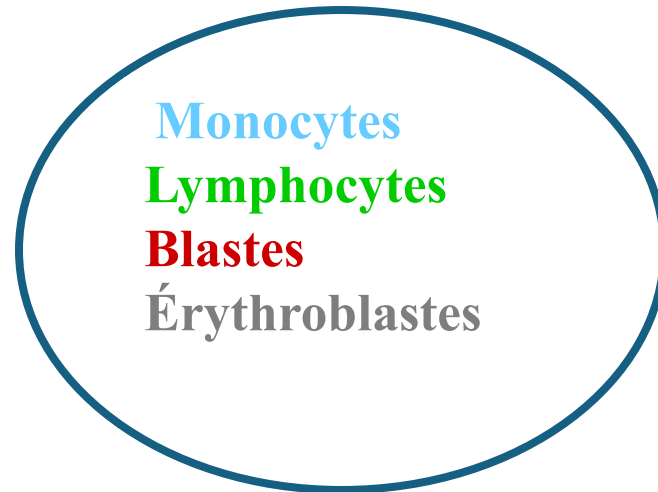


CYTOMETRE FACS CALIBUR 3 COULEURS

FACSCalibu
r



Intérêt du marquage CD45



E.G.I.L

LAL de la lignée lymphoïde B

Est nécessaire:

1-La **positivité** d'au moins deux marqueurs B

CD19/CD22/CyCD79a

2-Et la **négativité** d'au moins trois des marqueurs T:

CyCD3/CD2/CD5/CD7/CD8

3-Et la **négativité** des marqueurs myéloïdes

CD13/CD33/CD117/MPO

E.G.I.L

	cyCD79a, cy ou CD22,CD19	CD10	cy μ	Ig s
BI (Pro-B)	+	-	-	-
BII (B commune)	+	+	-	-
BIII (Pré-B)	+	+/-	+	-
BIV (B mature)	+	+/-	+/-	+

LAL de la lignée lymphoïde T

Est nécessaire:

1-La **positivité** de CyCD3 ou CD3

2-La **négativité** d'au moins deux marqueurs B

CD19/CyCD22/CyCD79a

3-Et la **négativité** d'au moins trois des marqueurs myéloïdes

CD13/CD33/CD117/CyMPO

Lignée T : Sous types de LAL-T

E.G.I.L

	cyCD3	CD1a	CD7	CD3	CD2 _{et/ou} CD5 _{et/ou} CD8
T-I (Pro-T)	+	-	+	-	-
T-II (Pré-T)	+	-	+	-	+ (Au moins un)
T-III cortical	+	+	+/-	+/-	+ (Au moins un)
T-IV mature	+	-	+/-	+	+ (Au moins un)

DETERMINATION DES SOUS TYPES DE LEUCEMIES AIGUES

LE DIAGNOSTIC D'UNE LANL

Est nécessaire:

1-La **positivité** d'au moins deux marqueurs myéloïdes

CD13 / CD33 / CD117 / CyMPO

2-La **négativité** d'au moins trois des marqueurs lymphoïdes T:

CyCD3 / CD2 / CD5 / CD7 / CD8

3-Et la **négativité** d'au moins deux des marqueurs lymphoïdes B:

CD19 /CyCD22 / CyCD79a

LES SOUS TYPES DE LAM

E.G.I.L

Il n'y a pas de classification aussi stricte pour les LAM
mais certains marqueurs sont assez caractéristiques.

E.G.I.L	M0	M1,M2	M3	M4	M5	M6	M7
MPO	-	+	+	+	-/+	+	-
CD2	+/-	+/-	+/-	+/- E _O	-	-	-
CD4	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD7	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD11c	-	-/+	+/-	+/-	+	-	-
CD13	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
CD19	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
CD33	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
CD34	+	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-
CD36	-	-	-	+	+	+	+
CD56	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+/-	+	+	-	-
CD65	-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-
CD71	+	+	+	+	+	++/+	+/-
CD117	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-
Glyco-A	-	-	-	-	-	+	-
HLA-DR	++	+	-	+	+	+/-	-/+

LEUCEMIES AIGUES BIPHENOTYPIQUES

E.G.I.L

	LIGNEE LYMPHOIDE B	LIGNEE LYMPHOIDE T	LIGNEE MYELOIDE
2Pts	CyCD79a,Cyμ, CyCD22	CD3,TCR	CyMPO, (lysozyme)
1Pt	CD19,CD10,CD20	CD2,CD5,CD8,CD10	CD13,CD33,CD65,CD117
0.5Pt	TdT, CD24	TdT,CD7,CD1a	CD14, CD15, CD64

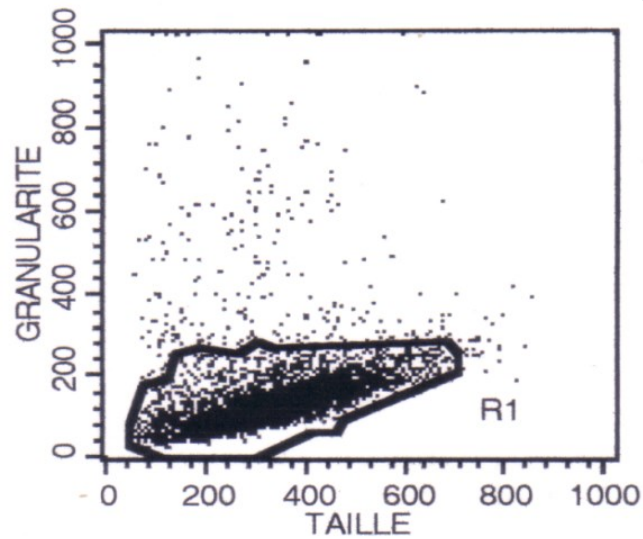
La BAL est définie quand le score est **supérieur à 2** pour les marqueurs Myéloïdes et **supérieur à 2** pour les marqueurs lymphoïdes B ou T

Non classables ni par la cytologie ni par la cytochimie.

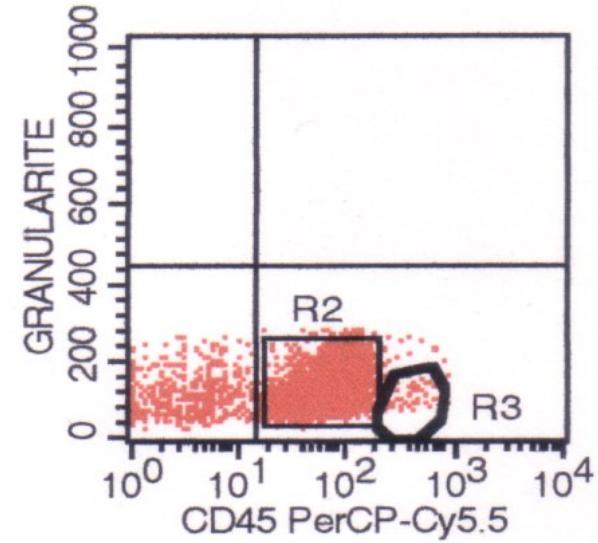
Les blastes sont CD45 positifs, sans remplir les critères de classification lymphoïde T, B ou myéloïde.

HLA-DR, TdT, et CD34 peuvent être chacun positif ou négatif.

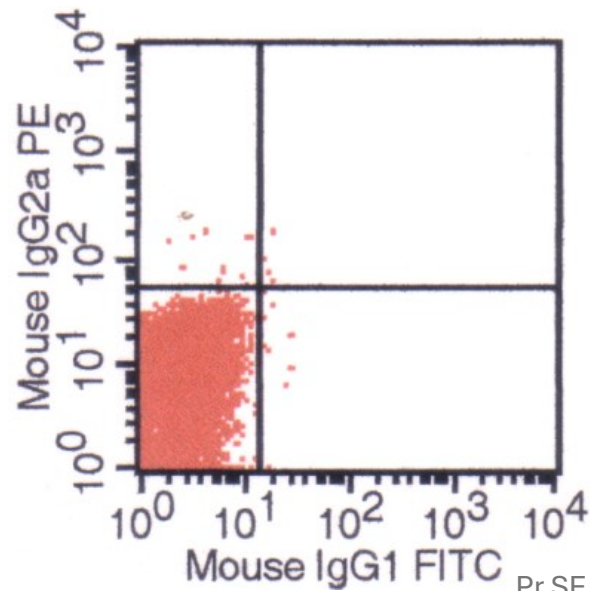
Patient n° 1



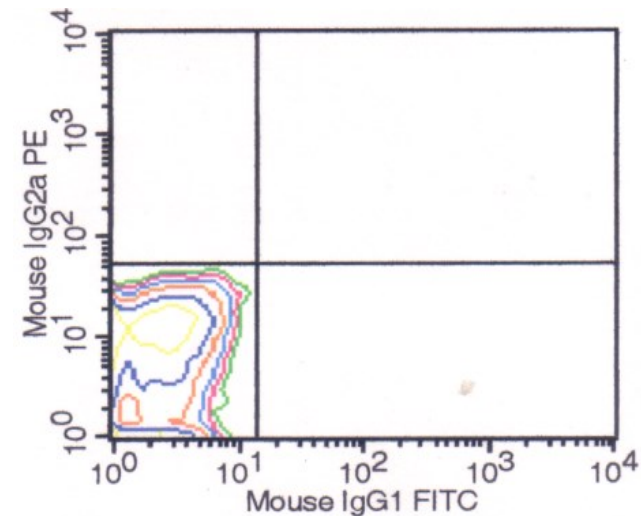
Region	% Gated
R2	90.96
R3	0.52
R1	96.96



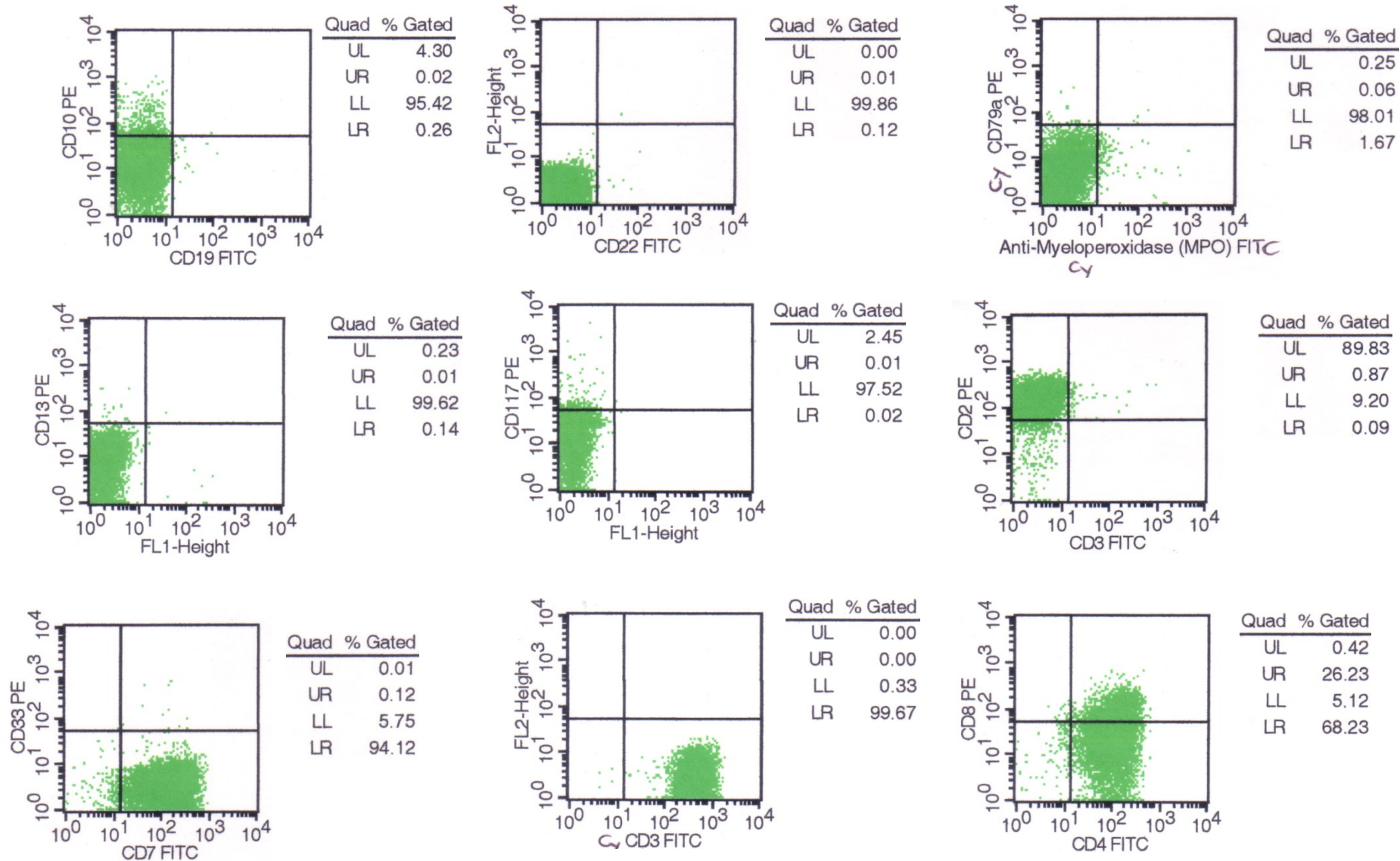
Quad	% Gated
UL	0.00
UR	0.00
LL	4.79
LR	95.21



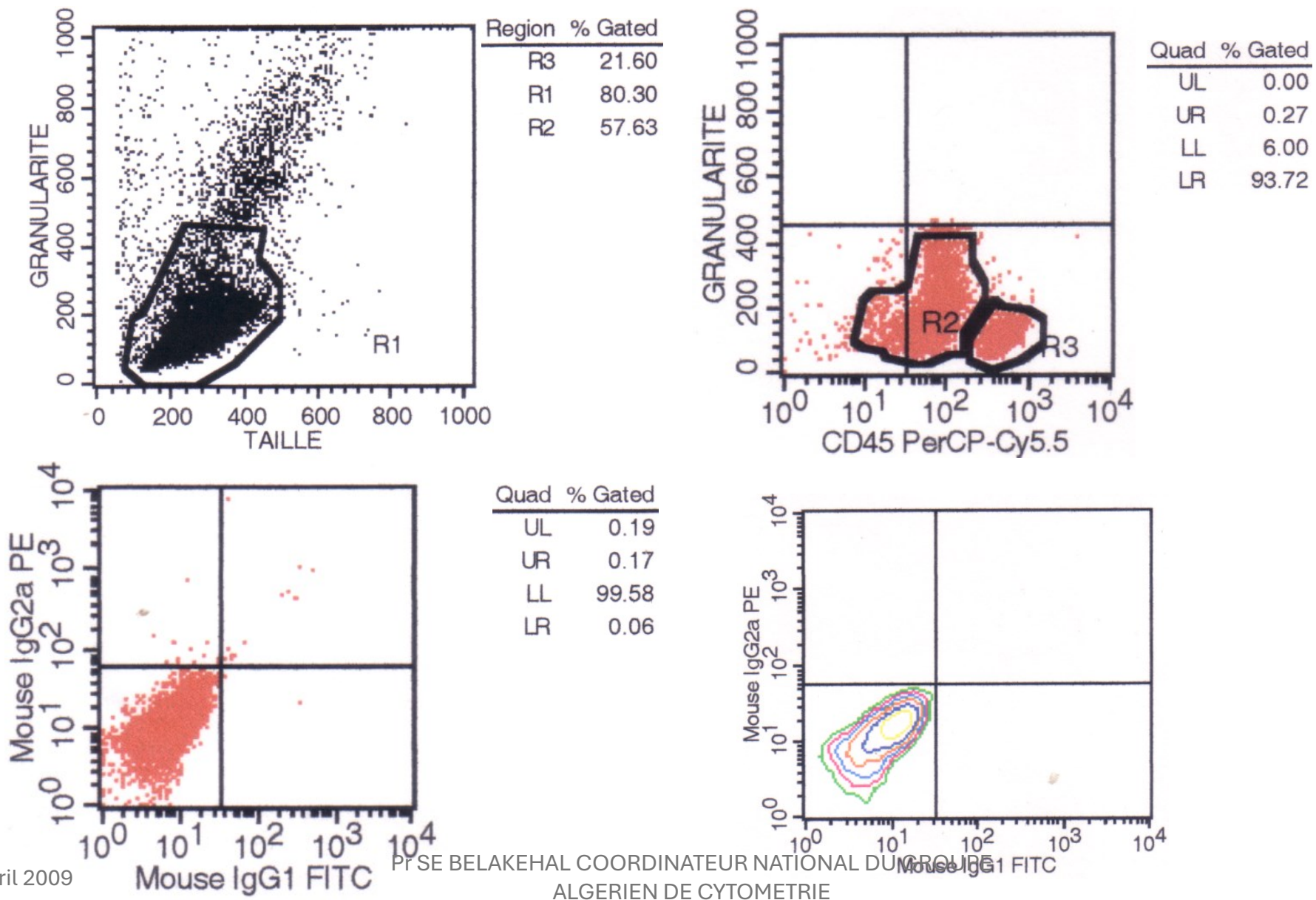
Quad	% Gated
UL	0.10
UR	0.05
LL	99.72
LR	0.12



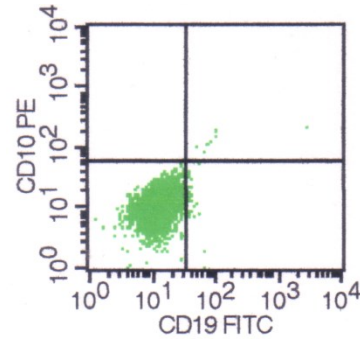
Patient n° 1



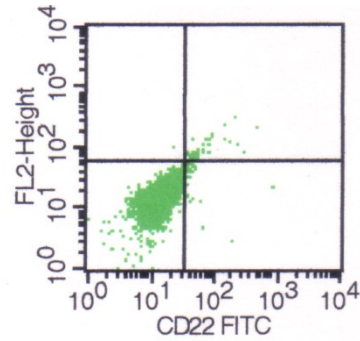
Patient n° 2



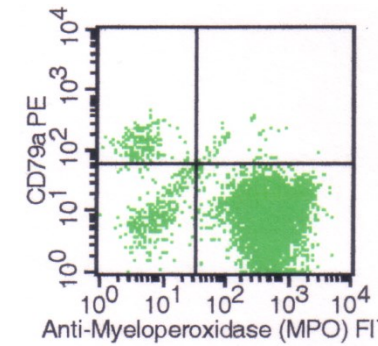
Patient n° 2



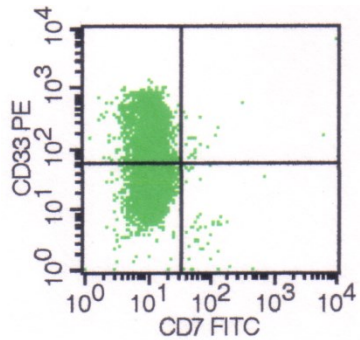
Quad	% Gated
UL	0.03
UR	0.15
LL	99.20
LR	0.62



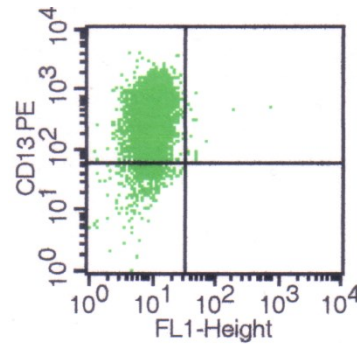
Quad	% Gated
UL	0.05
UR	0.86
LL	98.03
LR	1.06



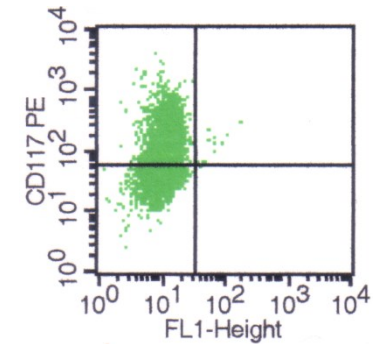
Quad	% Gated
UL	2.73
UR	0.85
LL	4.49
LR	91.93



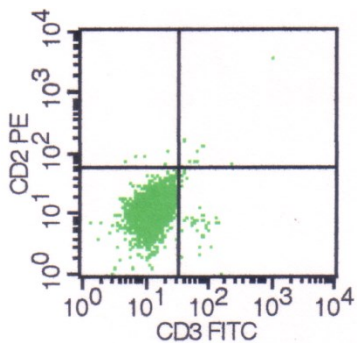
Quad	% Gated
UL	33.79
UR	0.42
LL	65.13
LR	0.66



Quad	% Gated
UL	92.81
UR	0.26
LL	6.93
LR	0.00

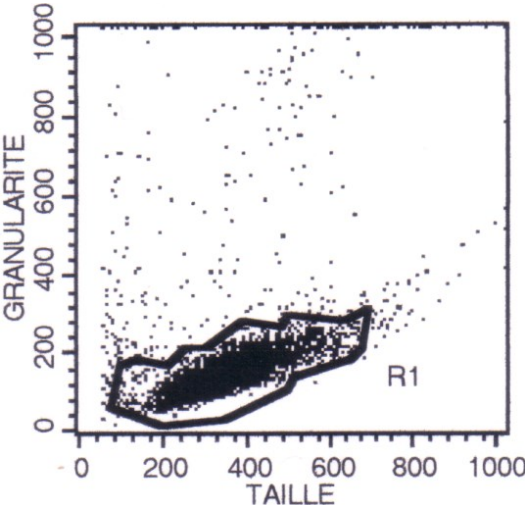


Quad	% Gated
UL	58.28
UR	0.21
LL	41.50
LR	0.01

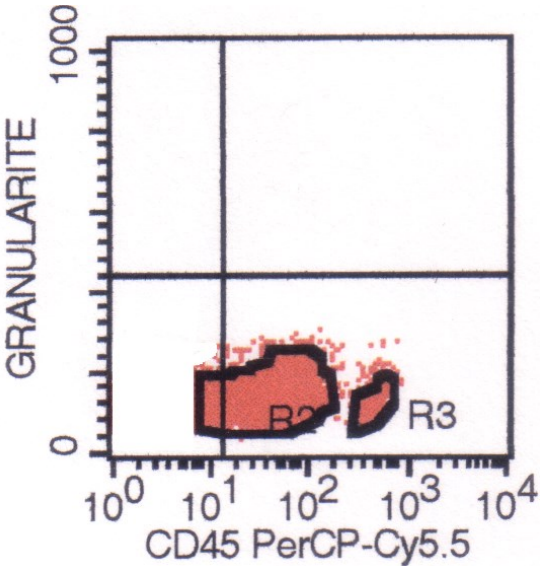


Quad	% Gated
UL	0.10
UR	0.15
LL	99.13
LR	0.62

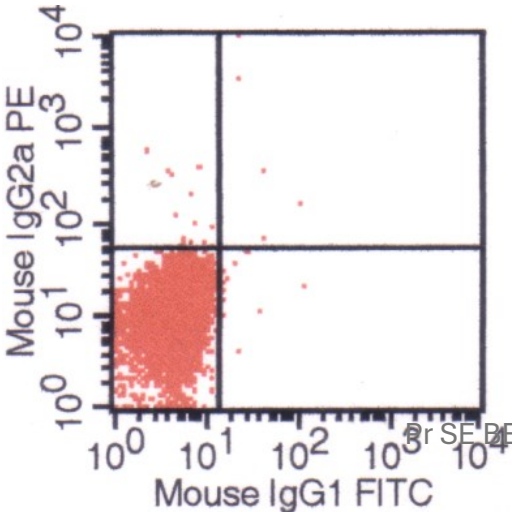
Patient n° 3



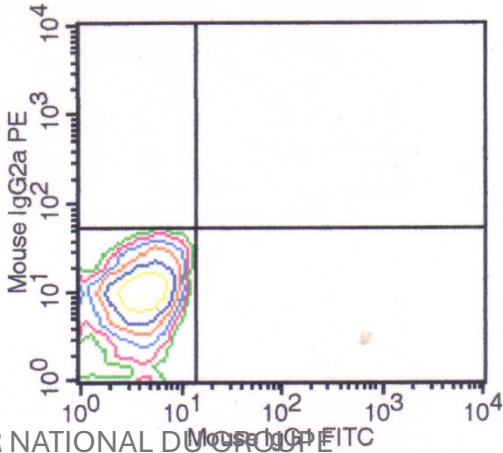
Region	% Gated
R3	2.84
R1	95.92
R2	71.83



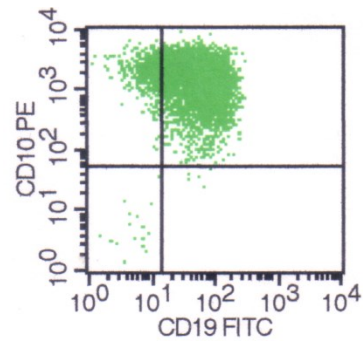
Quad	% Gated
UL	0.00
UR	0.00
LL	27.60
LR	72.40



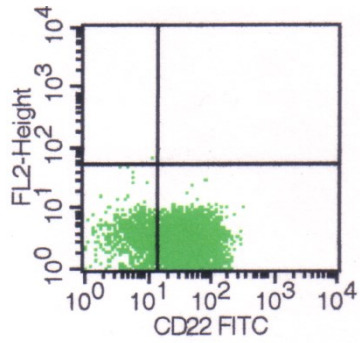
Quad	% Gated
UL	0.14
UR	0.05
LL	99.65
LR	0.17



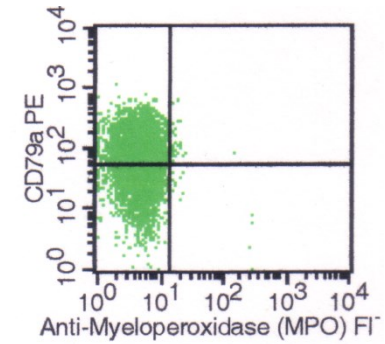
Patient n° 3



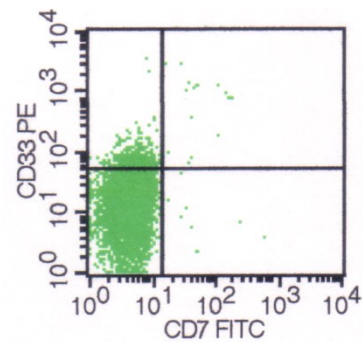
Quad	% Gated
UL	9.05
UR	90.61
LL	0.27
LR	0.07



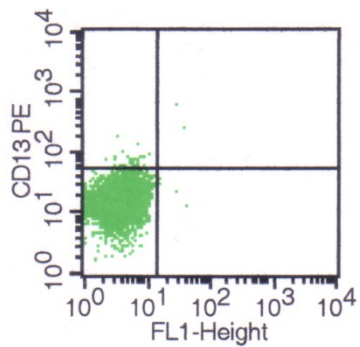
Quad	% Gated
UL	0.01
UR	0.00
LL	13.70
LR	86.28



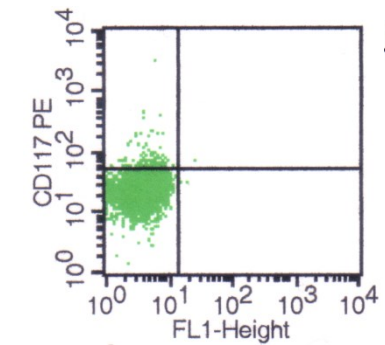
Quad	% Gated
UL	58.09
UR	0.62
LL	41.02
LR	0.26



Quad	% Gated
UL	6.45
UR	0.24
LL	93.18
LR	0.13

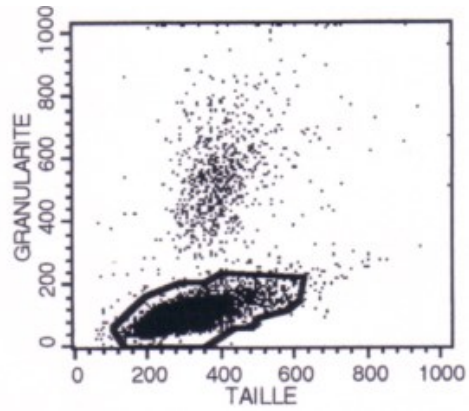


Quad	% Gated
UL	0.53
UR	0.06
LL	99.36
LR	0.06

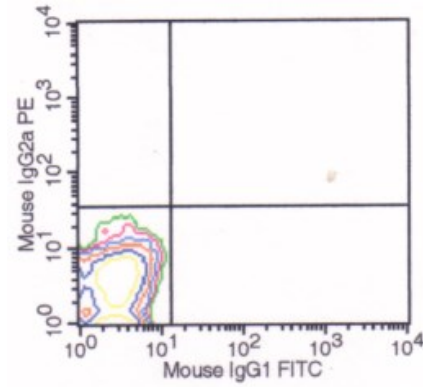


Quad	% Gated
UL	2.46
UR	0.01
LL	97.50
LR	0.03

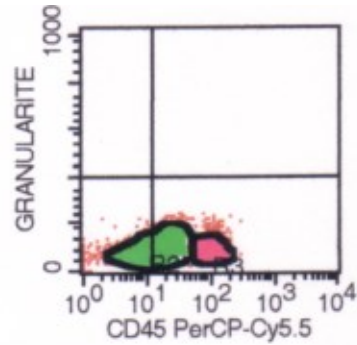
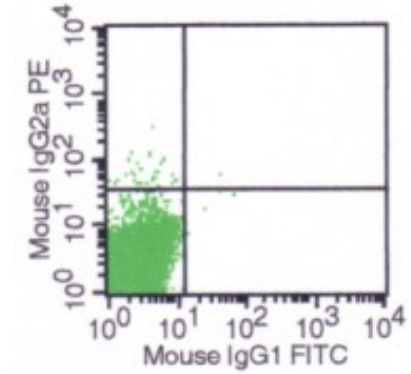
Patient n° 4



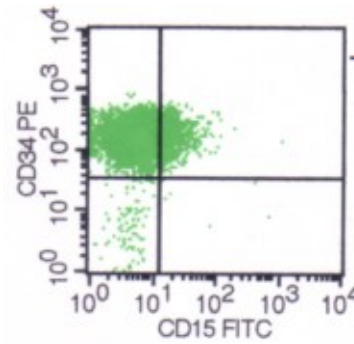
Region	% Gated
R1	91.37
R2	80.38
R3	8.36



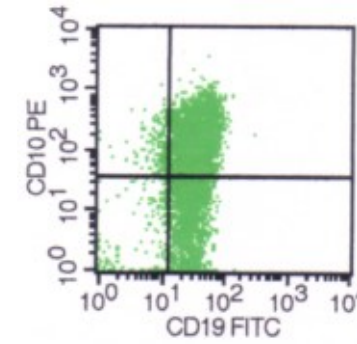
Quad	% Gated
UL	0.51
UR	0.00
LL	99.41
LR	0.08



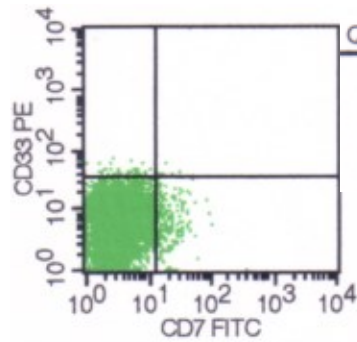
Quad	% Gated
UL	0.00
UR	0.00
LL	40.46
LR	59.54



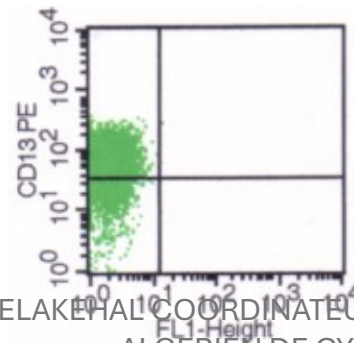
Quad	% Gated
UL	76.65
UR	13.28
LL	9.79
LR	0.28



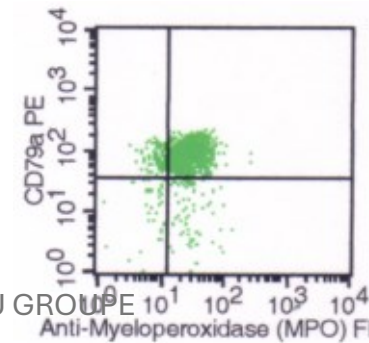
Quad	% Gated
UL	2.67
UR	62.31
LL	2.67
LR	32.34



Quad	% Gated
UL	0.71
UR	0.08
LL	89.08
LR	10.14

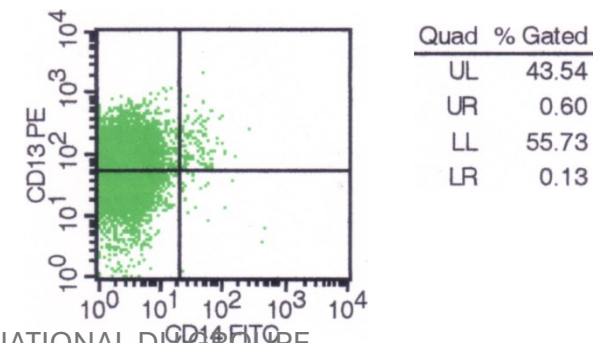
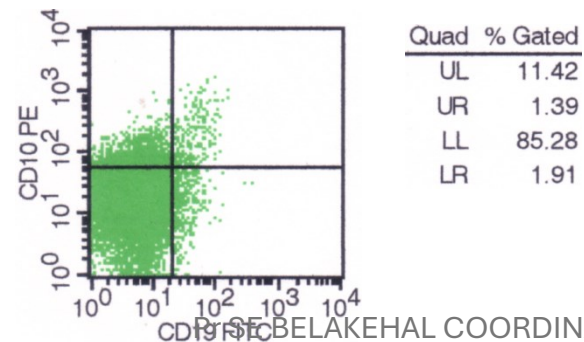
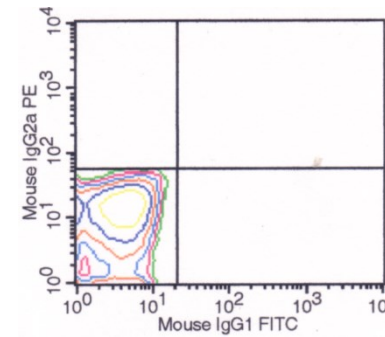
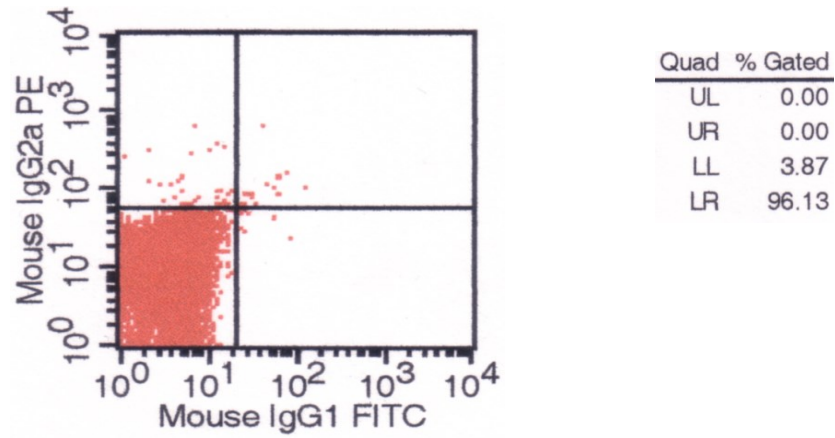
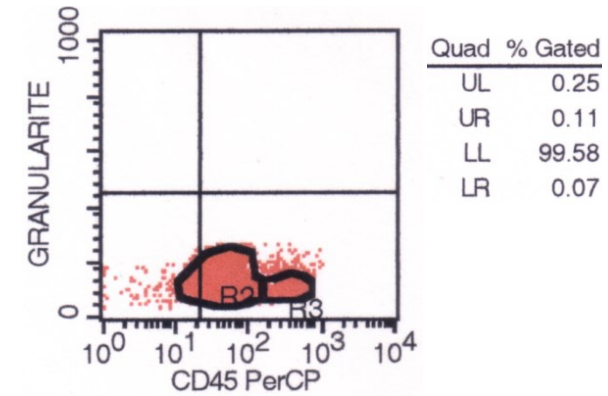
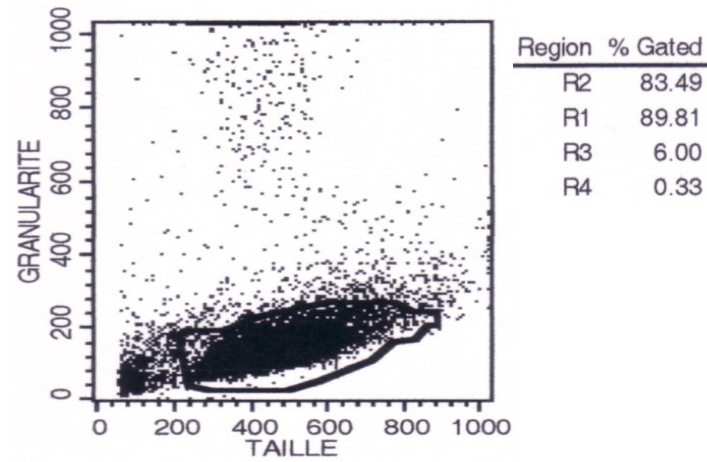


Quad	% Gated
UL	72.09
UR	0.01
LL	27.90
LR	0.00

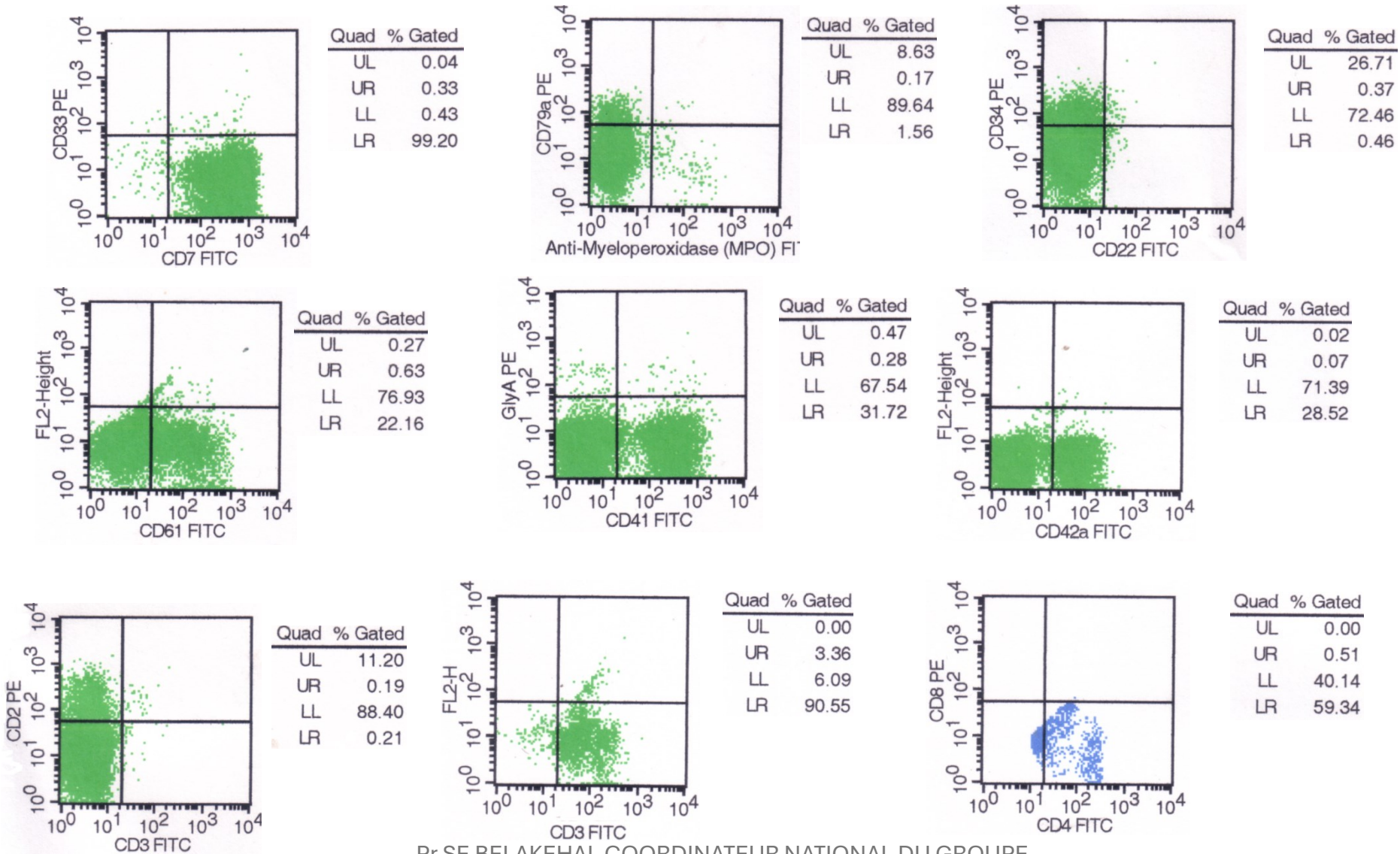


Quad	% Gated
UL	5.53
UR	85.71
LL	5.83
LR	2.92

Patient n° 5



Patient n° 5



224 LEUCEMIES AIGUES

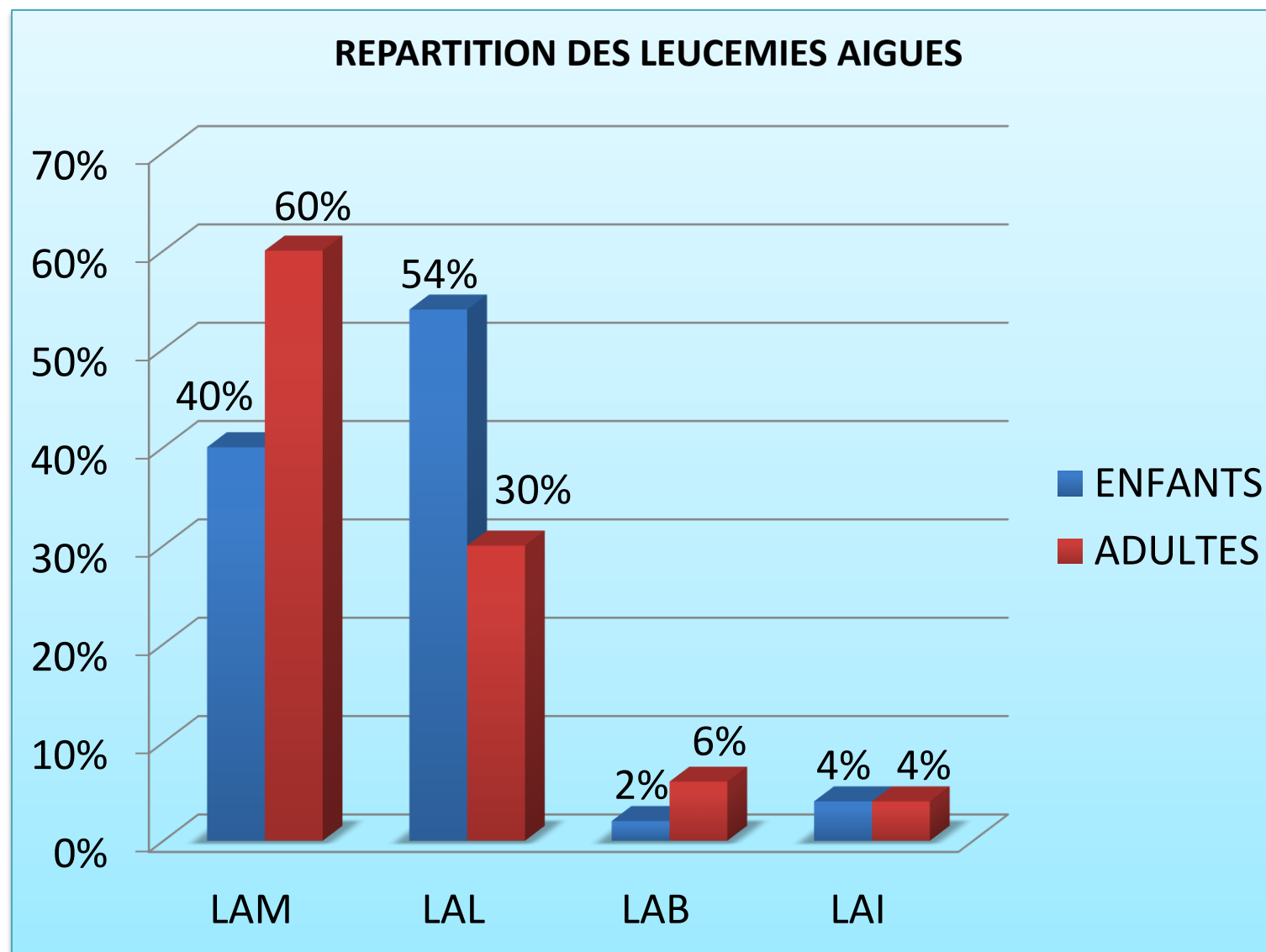
*AGE: > 15 ANS = 188 PATIENTS

< 15 ANS = 36 PATIENTS

*SEXE: M= 127 PATIENTS

F = 81 PATIENTS

*SEX RATIO : 1.56



CONCLUSION

Diagnostic de leucémies aiguës = cytologie + cytochimie

La cytométrie en flux , Offre un apport considérable :

Informations complémentaires pour:

- *Mieux définir les entités de leucémies aiguës

LAL B – LAL T – LAM 6 – LAM 7 – LA BIPHENOTYPIQUE

Variants myéloïdes – Variants lymphoïdes

- *Définir l'agressivité de la leucémie aiguë (Pronostic)

- *Indiquer la stratégie thérapeutique la plus adéquate

- *Suivre l'évolution de la maladie au cours du traitement

- *Maladie résiduelle (la CMF permet de détecter de faible proportion de cellules leucémiques entre **0,001 et 0,01%** au sein d'un échantillon)



Cytometrie En Flux Et Leucémie Lymphoïde Chronique

S. Taoussi, S. Oukid, M.T. Abad

Service Hématologie, EHS CAC Blida

2ème Workshop sur la Cytométrie en flux, Hôtel militaire Ain Naadja, 14-15 Avril 2009

Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Hémopathie maligne d'évolution indolente.

La LLC est définie par :

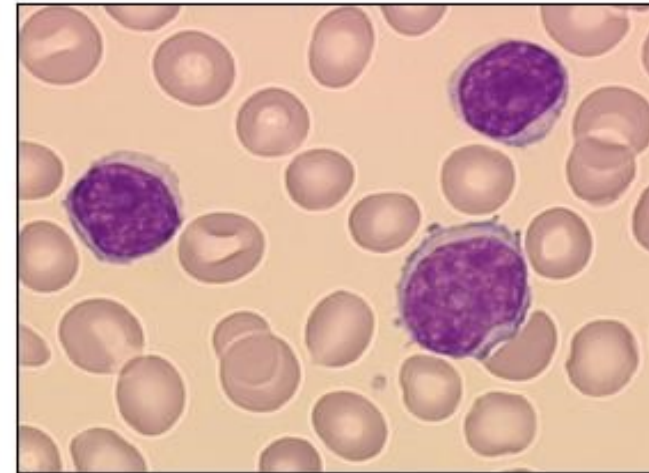
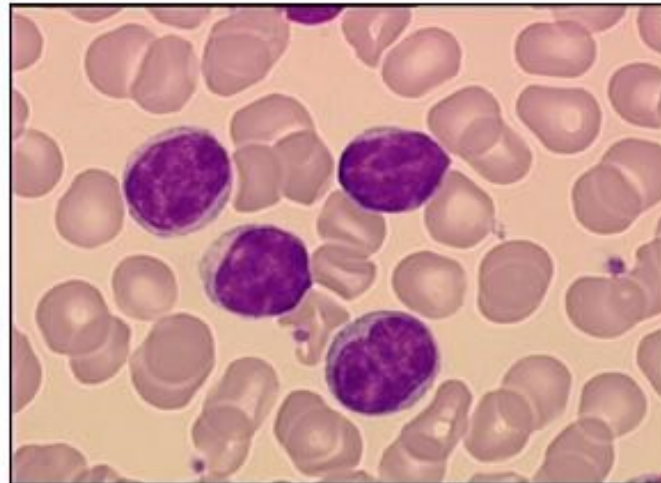
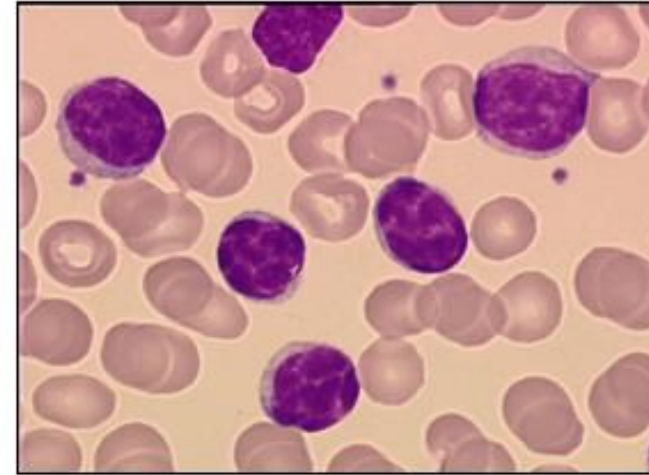
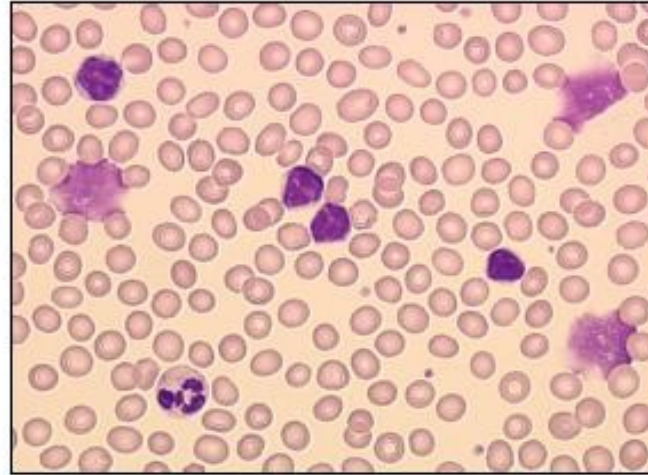
- une lymphocytose sanguine supérieure à $4.10^9/l$
- un profil immunologique caractéristique avec coexpression des CD5 et CD23 à la surface des lymphocytes tumoraux.

Au niveau du frottis sanguin :

- population lymphoïde monomorphe de petits lymphocytes à noyau arrondi chromatine compacte mottée ; nucléole non visible, cytoplasme peu abondant faiblement basophile agranulaire.
- On peut observer quelques cellules nucléolées dispersées, de taille moyenne ou grande et des ombres de Gumprecht

Une LLC atypique est caractérisée par un nombre de prolymphocytes supérieur à 10 % (mais inférieur à 55%).

Illustration de quelques aspects cytologiques caractéristiques de LLC



Immunophénotype

Les lymphocytes de LLC expriment:

- les antigènes associés aux cellules B (CD19, CD20)
- le CD5, marqueur d'activation non spécifique
- le CD23, dont la coexpression avec le CD5 est pratiquement spécifique de la LLC.
- Expression faible des IgS, le plus souvent de type IgM, +/-IgD,
- Expression faible ou absente du CD22 ou du CD79b,
- Absence d'expression du FMC7

Le diagnostic de LLC peut être parfois difficile sur la seule étude morphologique

Certains syndromes lymphoprolifératifs en conversion leucémique peuvent simuler une LLC

Dans ce contexte, la CMF peut s'avérer utile au diagnostic de certitude de LLC

Le système de score de Matutes permet une discrimination entre LLC et les autres syndromes lympho prolifératifs .

Il est particulièrement utile en cas d'atypies cytologiques : 98 % des LLC (typiques et atypiques) ont un score supérieur à 3 tandis que 94.6 % des SLP non-LLC ont un score inférieur à 3.

Système de score de Matutes

Etude des hémolymphopathies chroniques B

Cibler sur la population CD19+ !

● → Restriction de la chaîne légère de l' Ig

● → Score LLC (Matutes / Catovsky / Moreau)

Marqueurs	1 point	0 point
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
SIg	Intensité faible	Normale à forte
CD22 / CD79b	Intensité faible	Normale à forte

Score = 4 ou 5 ==> presque toujours LLC !

20

Score = 3,4,5 compatible avec diagnostic de LLC

Leucémie prolymphocytaire (LPL)

La LPL associe une hyperleucocytose majeure et une splénomégalie « isolée » le plus souvent sans adénopathies superficielles

Les prolymphocytes prédominent sur le frottis sanguin (> 55%).

Morphologie

Cellules de grande taille, noyau arrondi, volumineux nucléole bien visible. La chromatine nucléaire est dense et le rapport nucléocytoplasmique bas.

Immunophénotype

Forte intensité des Ig de membrane, Expression de toutes les molécules de différenciation de la lignée B, et l'absence dans la plupart des cas du CD5, du CD23 et du CD25.

Lymphome folliculaire (LF)

Morphologie

Au niveau du sang, cellules ayant l'aspect de centrocytes :

- noyau plus grand que celui d'un lymphocyte normal, présentant une encoche étroite et profonde et une chromatine épaisse mais non mottée, sans nucléole visible

- cytoplasme peu abondant faiblement basophile qui n'est parfois visible que dans l'échancrure du noyau.

Immunophénotype

- expression d'une immunoglobuline de surface le plus souvent faiblement une IgM, + parfois une IgG, plus rarement une IgA, les marqueurs pan-B, CD19, CD22, CD20, CD79b et dans 2/3 des cas le CD1 CD5-, CD23-/+ et CD43-/+.

Lymphome à cellules du manteau (MCL)

Morphologie

Au niveau du sang, les cellules sont homogènes, de petite à moyenne taille mais un peu plus grande que le lymphocyte normal, avec des noyaux irréguliers, une chromatine lâche, un nucléole de petite taille bien visible, un cytoplasme faiblement basophile et peu étendu.

Le diagnostic différentiel peut être parfois difficile sur la seule morphologie avec une LLC atypique, ou un lymphome des cellules marginales, parfois l'aspect cytologique oriente à tort vers une leucémie aigue . .

Immunophénotype

Les cellules du manteau expriment une immunoglobuline de surface IgM souvent associée à une IgD, plus souvent λ que κ ; Elles expriment les marqueurs B CD19, CD20, CD22, CD79b, de même que le CD5 et le CD43. L'absence d'expression du CD23 et la présence du CD79b permettent de les distinguer de la LLC.

Les lymphomes des cellules de la zone marginale

Morphologie

La population cellulaire est homogène, avec des noyaux un peu plus grands que celui d'un lymphocyte normal, à chromatine condensée en blocs laissant parfois apparaître un petit nucléole, et dont le cytoplasme abondant nettement basophile présente des villosités peu nombreuses, réparties de façon polaire .

Immunophénotype

Les cellules sont

- IgS + de type IgG ou IgM,
- CD5-, CD23-, CD43- ou +faible, mais différent des LZM non villeux par la positivité fréquente des CD11c et CD103.

LZM non villeux (splénique ou ganglionnaire)

Morphologie

Au niveau du sang, aspect cytologique hétérogène : cellules au noyau arrondi et au cytoplasme abondant et clair.

Le plus souvent, aspect d'une LLC mixte associant petites cellules lymphoïdes souvent légèrement atypiques (chromatine dense mais non mottée, petit nucléole, petites irrégularités du contour nucléaire), cellules lymphoplasmocytoides, lymphoplasmocytaires, voire plasmocytaires à un nombre variable de cellules plus grandes et plus franchement atypiques de type prolymphocytes ou grandes cellules nucléolées irrégulières parfois bilobées. De rares formes sont plus homogènes simulant une LLC ou une leucémie prolymphocytaire.

Immunophénotype

Les cellules tumorales expriment une immunoglobuline de surface le plus souvent IgM+, IgD+/-, parfois IgG ou IgA, les antigènes associés aux cellules B (CD19, CD20, CD22, CD79b). Il n'a pas été identifié de marqueur spécifique des LZM, et le phénotype est défini de façon négative, CD5-, CD10-, CD23-. Néanmoins, certains cas sont CD5+, CD23-, la négativité (ou la positivité faible et partielle) du CD43 permettant de les distinguer des lymphomes à cellules du manteau.

ETUDE MORPHOLOGIQUE DES CELLULES LYMPHOIDES

Classification FAB

	Taille des Lc	Chromatine	Nucléole	Cytoplasme	Autres
LLC typique	< 2GR	Condensée en mottes	Absent	Peu abondant Rapport N/C ↗	Contour nucléaire régulier
LLC atyp. (CLL/PL)	LLC typique avec 10 – 55% de prolymphocytes				
LLC atypique (mixte)	Mélange de petits et grands lymphocytes. < 10% de prolymphocytes				
Leucémie prolymphocytaire	> 2 GR	Condensée de manière diffuse	1 apparent	Rapport N/C bas	Taille variable
Leucémie à tricholeucocytes	> 2 GR	Modérément condensée		Rapport N/C très bas, villosités	Noyau excentr., ovalaire ou réniforme
Leucémie à tricholeucocytes var.	> 2 GR	Fine	1 volumineux	Rapport N/C très bas, villosités, basophile	
SLVL	> 2 GR	Condensée		Variable, courtes villosités unipolaires	Noyau rond ou ovoïde
FCL	1 – 2 GR	Grossièrement condensée		Peu ou pas visible	1 ou 2 clivages marqués
MCL	Moyenne	Condensée		Rapport N/C ↗	Noyau pfs clivé ou indenté
LPL	Variable	Condensée en mottes	1 petit	Parfois basophile	Pfs excentrique
Leuc. à plasmocytes	Cellules lymphocytaires avec cytopl. basophile, voire plasmocytes ou cellules blastiques				

CMF

- Evaluer et caractériser des cellules en suspension
- Technique sensible, précision des mesures
- Information sur une population de cellules
- Utilise les statistiques pour comparer des données
- Technique en évolution

Applications de la CMF en Hématologie:

Concernent aussi bien l'étude fonctionnelle de cellules saines que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées :

- La numération des cellules souches CD 34+ ;
- Le diagnostic de l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) ;
- Le diagnostic et la classification des leucémies aigues , des syndromes lymphoprolifératifs.
- La recherche d'agglutinines irrégulières chez les sujets polytransfusés ;
- La numération des leucocytes résiduels dans les concentrés érythrocytaires et plaquettaires ;
- La numération des réticulocytes ;
- La mise en évidence des hématies foetales dans la circulation maternelle à l'aide d'anticorps anti-CD71, anti-D ou anti-Hb fœtale.
- L'Évaluation de la MRD dans la LLC nécessaire pour l'évaluation des traitements et la surveillance des patients ;
- La PCR quantitative et la Cytométrie de flux 4 couleurs ont quasiment la même sensibilité (10^{-4})

Intérêt de la CMF dans les hémopathies malignes

- 1- Rechercher, confirmer ou infirmer un diagnostic d'hémopathie maligne
- 2- Caractériser la lignée impliquée et son stade de différenciation
- 3- Définir les sites atteints par les cellules malignes
- 4- Rechercher des marqueurs pronostiques, thérapeutiques ou de progression tumorale
- 5- Suivre l'efficacité d'un traitement et/ou dépister précocément une rechute
- 6- Évaluer la maladie résiduelle lorsque des marqueurs spécifiques sont disponibles

Marqueurs le plus souvent exprimés dans les différents syndromes lymphoprolifératifs B.

	LLC-B	LPL-B	MCL	LFC	LSLV	HCL	HCLv	
CD19	+	+	+	+	+	+	+	
CD5	+	+/-	+	-	-	-/+	-/+	
CD10	-	-/+	-/+	+	-	-	-	
CD11c	-/+	-	-	-	+ /-	++	+/-	
CD20	+/-	+	++	+	+	++	+	
CD22	Faible	++	+	+	++	++	++	
CD23	+/-	-/+	-/+	-/+	- /+	-/+	-/+	
CD24	+	+	+	+	+	-	-	
CD25	-/+	-	-	-	-/+	+	-	
CD38	-/+	++	-/+	-/+	-	-	-	
FMC7	-/+	++	+	+	+	+	+	
CD43	++	+/-	+/-	+/-	-	-	-	
CD79b	Faible	++	+	+ /++	+ /++	+	+	
CD103	-	-	-	-	-/+	+	+	
K-L	Faible	++	+	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++	
CH.L.	M, DM, D	M, DM	M, DM, G	M, DM, G	M, DM, G	M, DM, G, A	G	

Stratégie d'analyse des cellules tumorales dans la LLC

Cibler la population lymphoïde CD19+/CD5+
pour évaluer les autres marqueurs du score de
Matutes : CD 23 CD 22 FMC7 CD 79b les
chaînes légères K / L

• Expression des resultats

- Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives ; on considère q'un marqueur est positif si au moins 20 % à 30 % de cellules l'expriment.
- L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à l'expression antigénique ou charge antigénique, elle est dite :
 - - faible : entre les décades 10^1 et 10^2
 - - moyenne : entre les décades 10^2 et 10^3
 - - forte : supérieure à 10^3

PANORAMA DES PROLIFERATIONS LYMPHOIDES MALIGNES

PROLIFERATIONS B

Leucémie lymphoïde chronique classique

Leucémie prolymphocytaire

Forme leucémique des lymphomes folliculaires

Forme leucémique des lymphomes du manteau

Leucémie à tricholeucocytes

Lymphome splénique à lymphocytes villeux

Macroglobulinémie de Waldenström

Leucémie à plasmocytes.

PROLIFERATIONS T

Leucémie / lymphome T de l'adulte

Leucémie prolymphocytaire

Lymphocytose à LGL

Syndrome de Sézary.

Nous rapportons une série de 77 leucémies lymphoïdes chroniques diagnostiquées et typés à Blida.

Matériel et méthodes

C'est une étude prospective qui a débuté en novembre 2006.

Elle a concerné 57 hommes et 20 femmes.

L'âge moyen est de 62 ans (37-86).

Il s'agit de : stade A = 4 cas stade B = 32 cas stade C = 41 cas

L'étude morphologique a comporté systématiquement l'analyse d'un frottis sanguin et d'un frottis médullaire pour chaque patient.

Immunomarquage

L'immunomarquage est réalisé sur prélèvement sanguin périphérique sur EDTA

Le panel d'anticorps systématiquement utilisé a comporté: CD19,CD20,CD22,CD23,CD5,CD10,CD3, CD2,CD79b, FMC7, Chaînes légères kappa et lambda, CD38.

L'acquisition et l'analyse sont réalisées sur un Cytometre Facs calibur BD 4 couleurs.

Pour individualiser les LLC B nous avons appliqué le scoring de Matutes.

Pour individualiser les LLC B nous avons appliqué le scoring de Matutes.

CD5, CD23, CD79b ou CD22, FMC7, κ/λ

➔ **Score LLC (Matutes / Catovsky / Moreau)**

Marqueurs	1 point	0 point
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
Slg	Intensité faible	Normale à forte
CD22 / CD79b	Intensité faible	Normale à forte

Score de Matutes = 3,4,5 compatible diagnostic LLC

Résultats

Score de Matutes

- score = 5 : 30 cas
- score = 4 : 42 cas
- score = 3 : 5 cas

Résultats

Concordance morphologie/cytometrie

- LLC confirmée : 77 (cytométrie)

- LLC non confirmée : 12

FL : 01

MCL : 06

Zone marginale :02

LNH spléniques villeux :03

Résultats

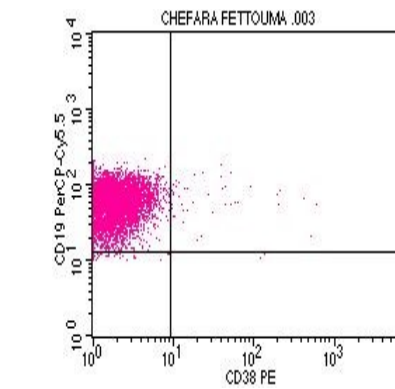
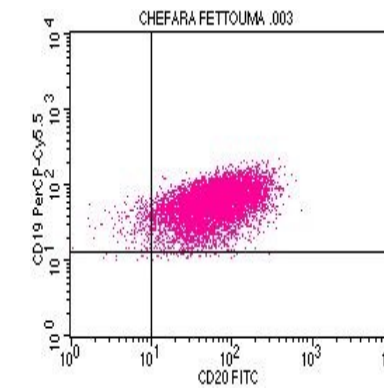
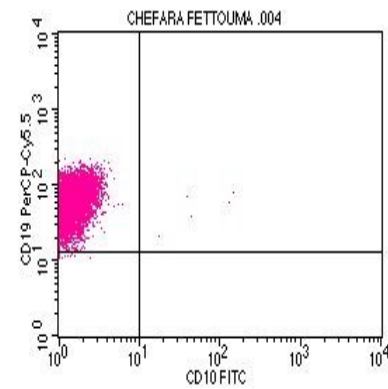
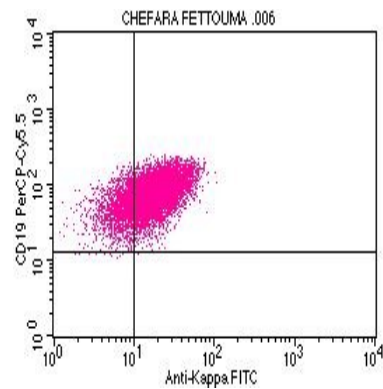
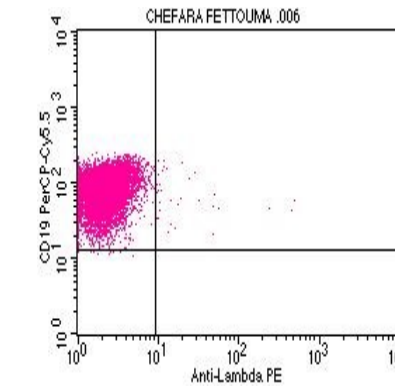
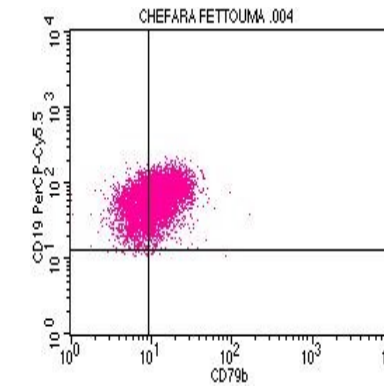
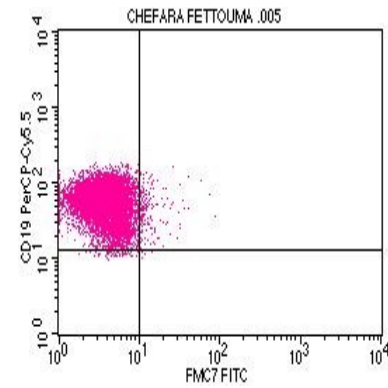
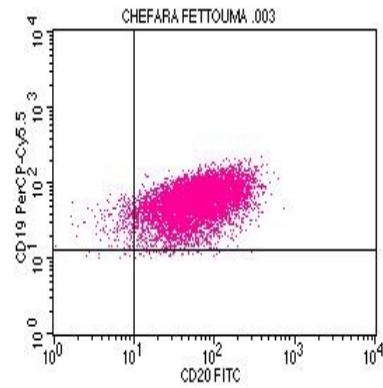
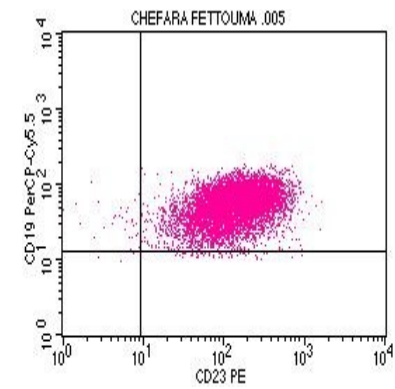
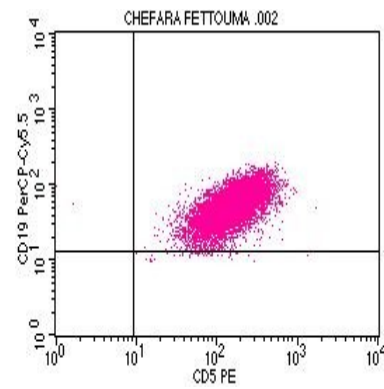
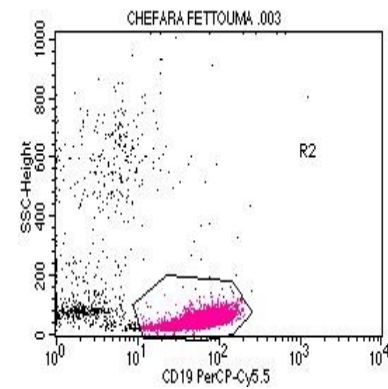
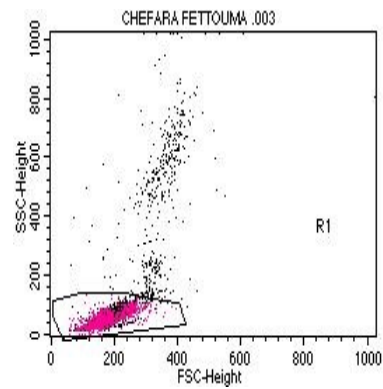
Le CD 38 a été retrouvé positif dans 34 cas:

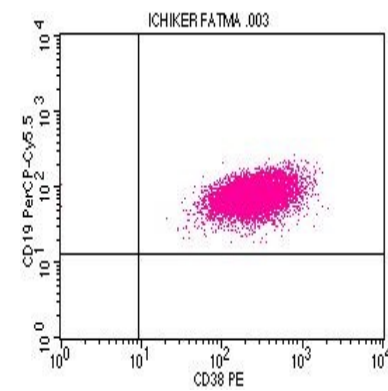
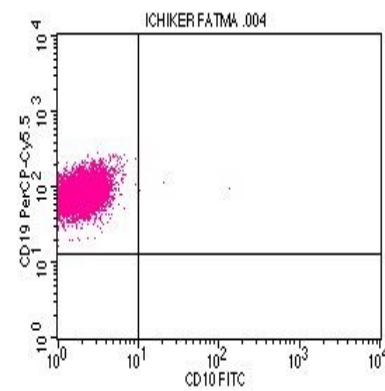
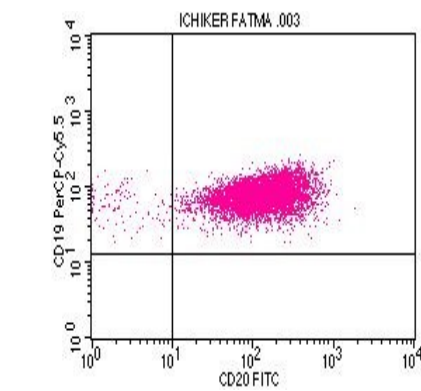
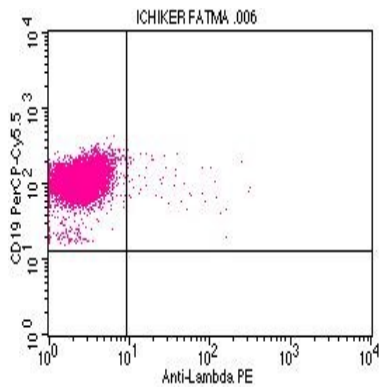
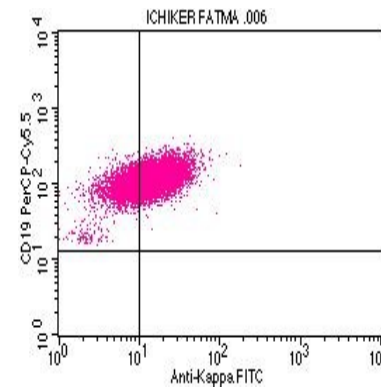
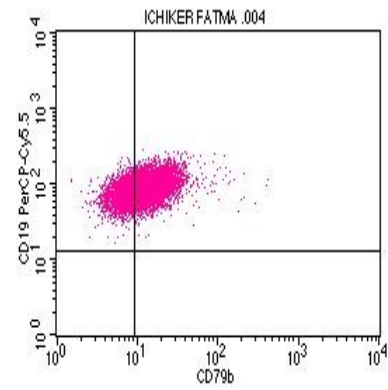
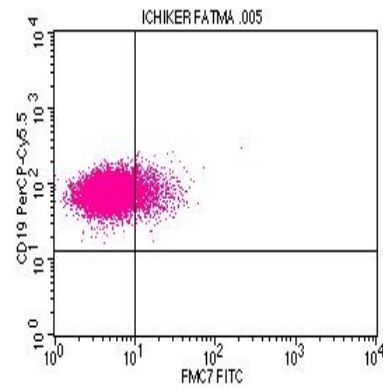
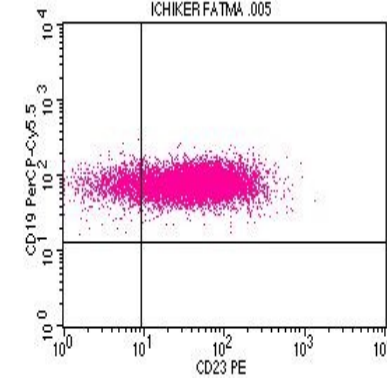
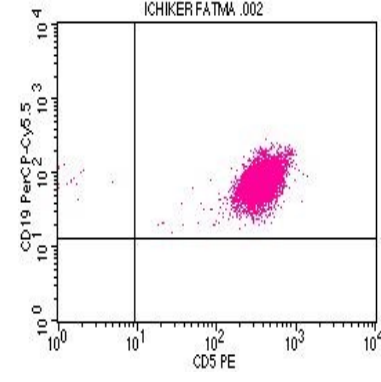
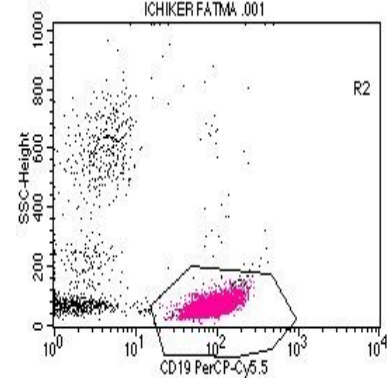
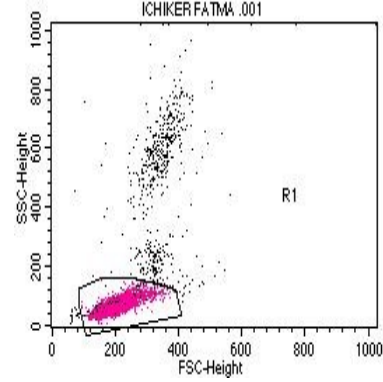
- stade A : 1
- stade B : 11
- stade C : 22

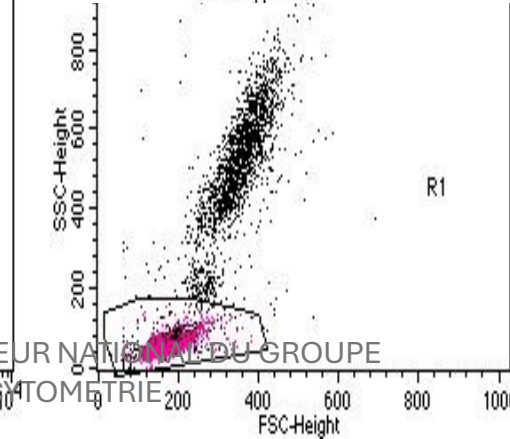
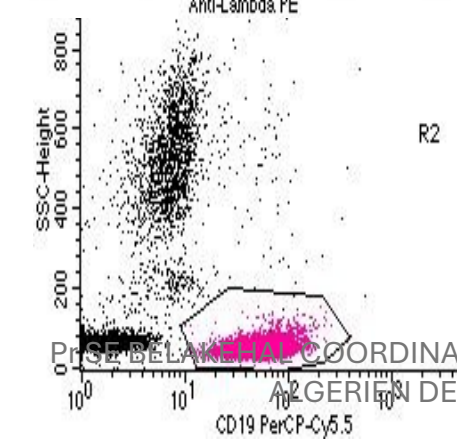
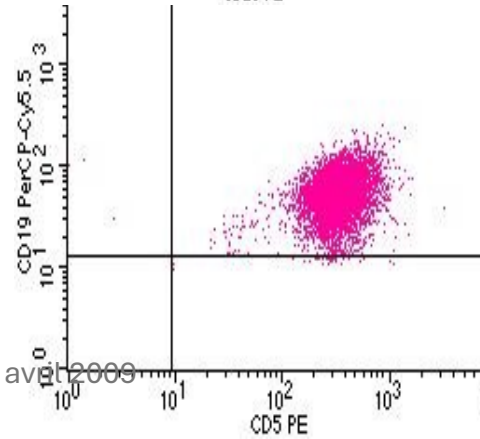
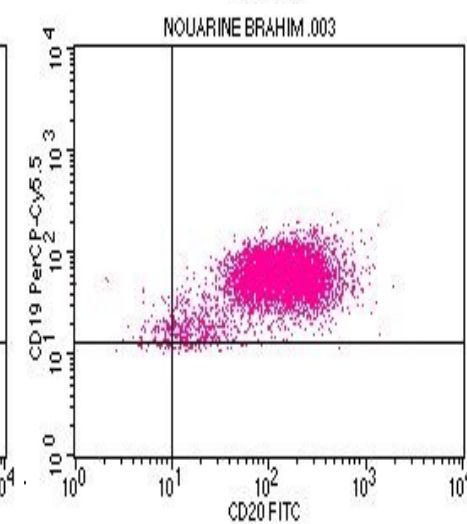
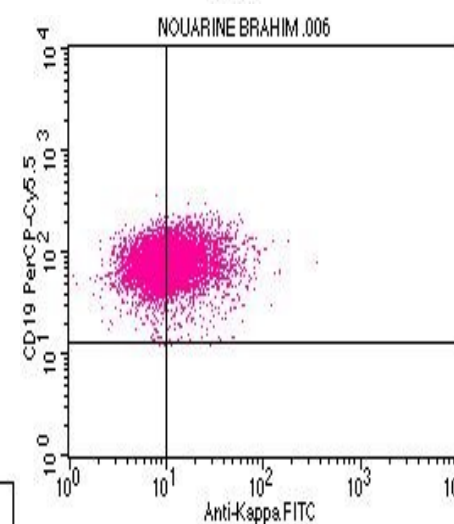
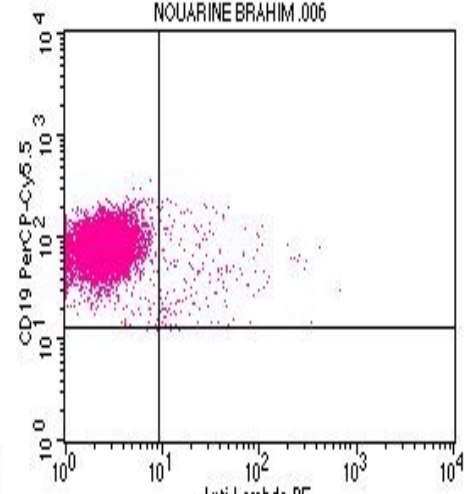
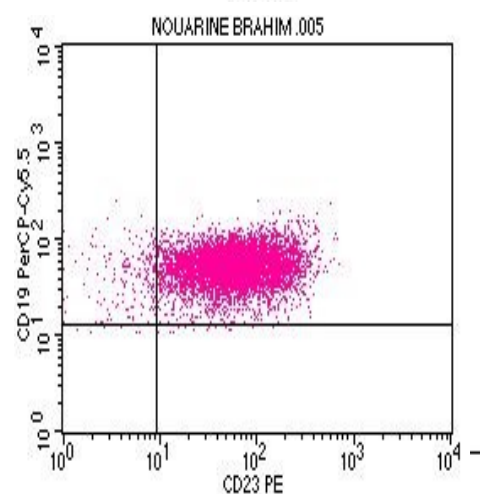
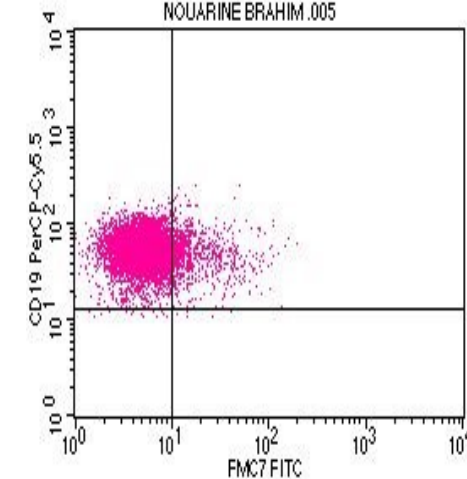
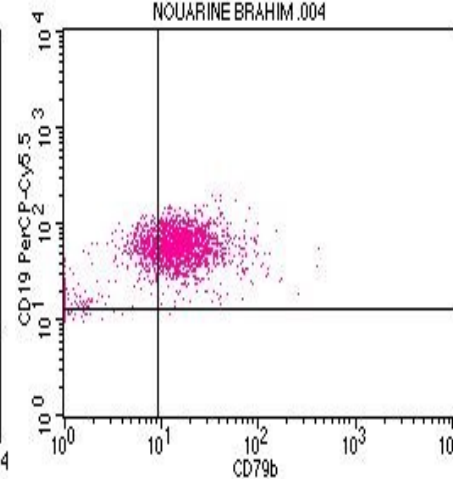
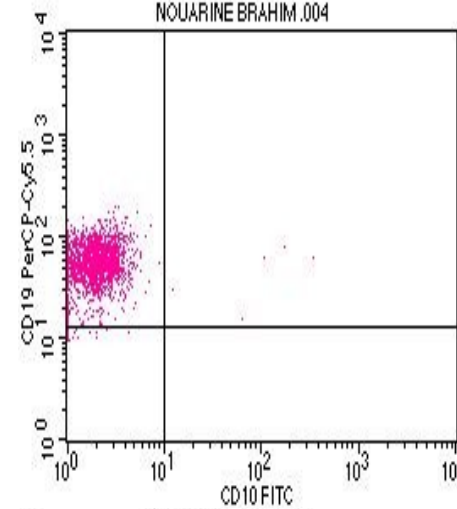
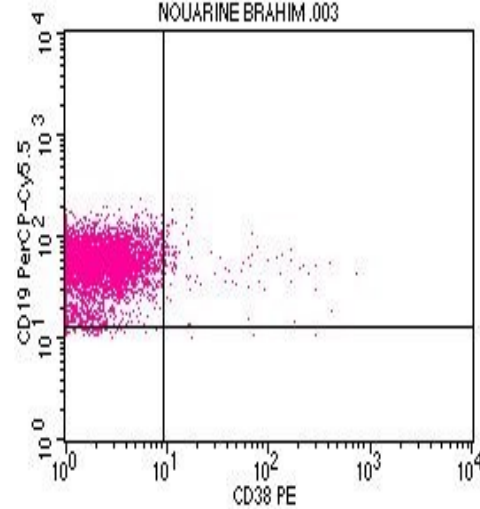
Il a été retrouvé négatif dans 43 cas

- stade A : 3
- stade B : 21
- stade C : 19

Vu le recul de temps trop court, aucun score pronostique ne peut être exprimé dans l'immédiat.







Commentaires

L'immunomarquage constitue un outil très performant pour affirmer ou infirmer une LLC.

Il ne remplace pas l'étude morphologique

C'est un complément indispensable à l'étude morphologique dans les syndromes lymphoprolifératifs chroniques.

Son utilité a été établie dans l'évaluation diagnostique des hémopathies malignes.

Il pourrait contribuer à l'analyse de facteurs pronostiques au cours des hémopathies malignes.

Commentaires

La PCR quantitative et la Cytométrie de flux 4 couleurs ont quasiment la même sensibilité (10^{-4})

Très bonne corrélation entre le sang et la moelle

Le sang devrait être le premier site à analyser

Questions

- standardisation ?
- réglages ?
- Consensus pour association de cytométrie
- Consensus sur l'interprétation

EXPERIENCE TUNISIENNE EN CYTOMETRIE DE FLUX

Dr Emna Gouider Belhadjati

CHU Aziza Othmana

Tunis - Tunisie



162 155 Km²
10,126 millions
habitants

Tunis et
banlieues 1,6M

- Cytométrie en flux:
 - Institut Pasteur de Tunis depuis les années (1990)
Déficits immunitaire
 - Centre National de Transfusion Sanguine de Tunis
(2000) Hémopathies malignes
 - Centres régionaux de transfusion sanguine de Sousse et
Sfax (2000)
 - Faculté de Pharmacie de Monastir
 - Faculté des Sciences de Bizerte
- Avril 2005: Hôpital Aziza Othmana de Tunis



Cytométrie de flux à l'hôpital Aziza Othmana

- Diagnostic des leucémies aiguës
- Suivie de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant
- Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques
- Recherche des clones HPN
- Thrombopathies

DIAGNOSTIC DES LEUCEMIES AIGUES

- 1- Lecture cytologique+++++
- 2- Prélèvement de moelle osseuse sur EDTA rapidement acheminé au laboratoire
- 3- Panel avec Ac monoclonaux

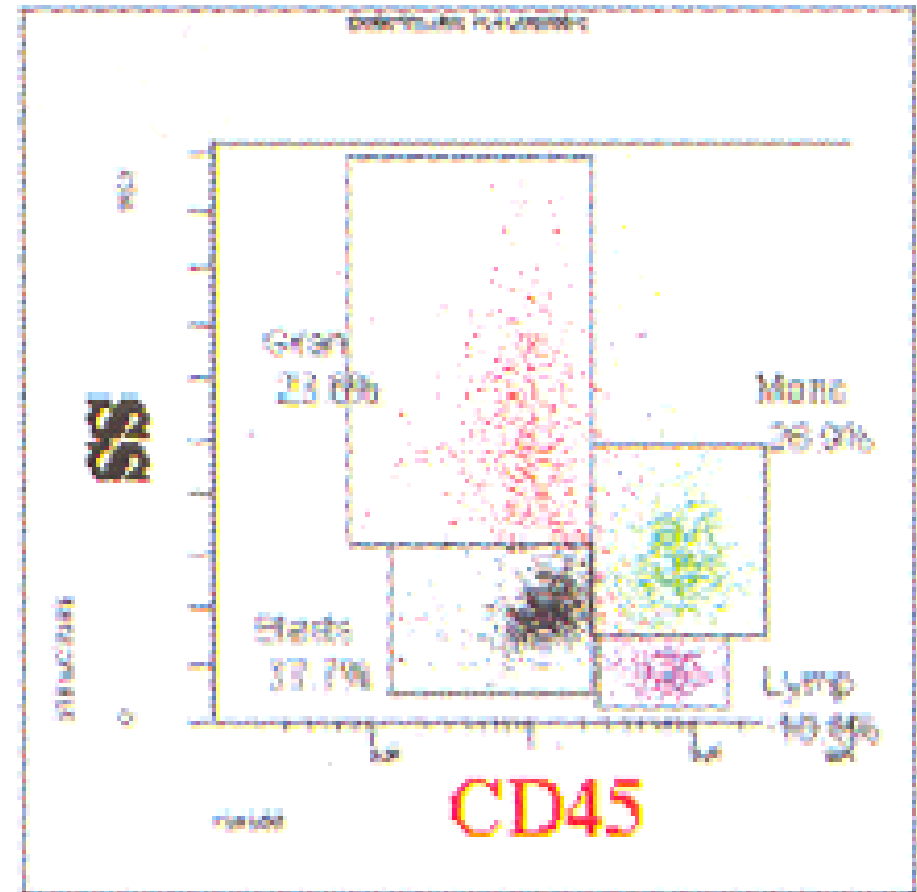
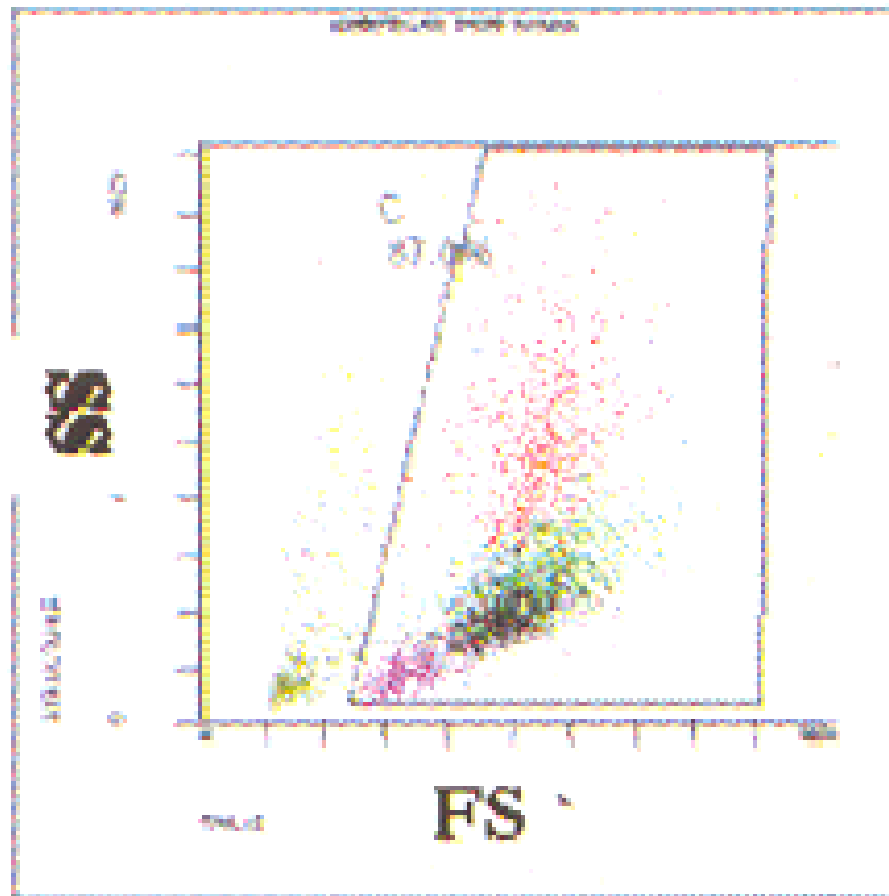
Cytologie $\Rightarrow$

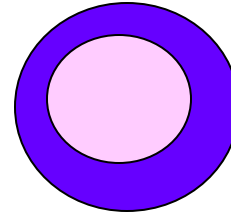
- LAM₁, LAM₂, LAM₃, LAM₆
- LAL ?

Cytométrie en flux $\Rightarrow$

- LAL B/T
- LAM₀, LAM_{3v}, LAM₇, LAM₄₋₅, LAM₆
- LA biphénotypiques
- LA indifférenciées
- Etude la maladie résiduelle

- Gating des blastes sur l'intensité du CD45
- Triple marquage (FITC PE PCy5)
- **Panel Ac :**
 - Ac immaturité
 - Ac myéloïdes,
 - Ac lymphoïdes B et T
 - Contrôles isotypiques+++
 - « Contrôles positifs »



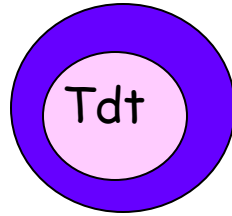


CD34, HLA-DR

Lignée T

Lignée B

Lignée myéloïde



CD3

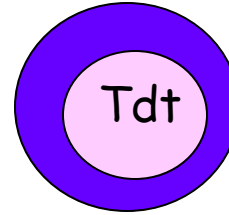
CD7

CD2

CD4

CD8

CD5, CD1,
TCR $\alpha\beta$



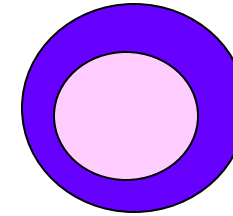
CD79 α

CD19

CD22

CD10

μ cyt, CD20
IgS



MPO

CD33

CD13

CD14/CD11c/CD16

CD15

CD65

CD117

CD41, CD42, CD61,
antiglycophorine A

Score d'EGIL

	lignée B	lignée T	lignée myéloïde
2	CD22(s/c) CD79a(s/c)μ (s/c)	CD3(s/c) TCR	MPO (s/c)
1	CD19,CD10, CD20	CD2,CD5,CD8, CD10	CD13,CD33, CD117,CD65
0,5	Tdt,CD24	TdT,CD7,CD1a	CD14,CD15, CD64

Il faut au moins un score de deux dans une lignée pour affirmer l'appartenance des cellules à cette lignée

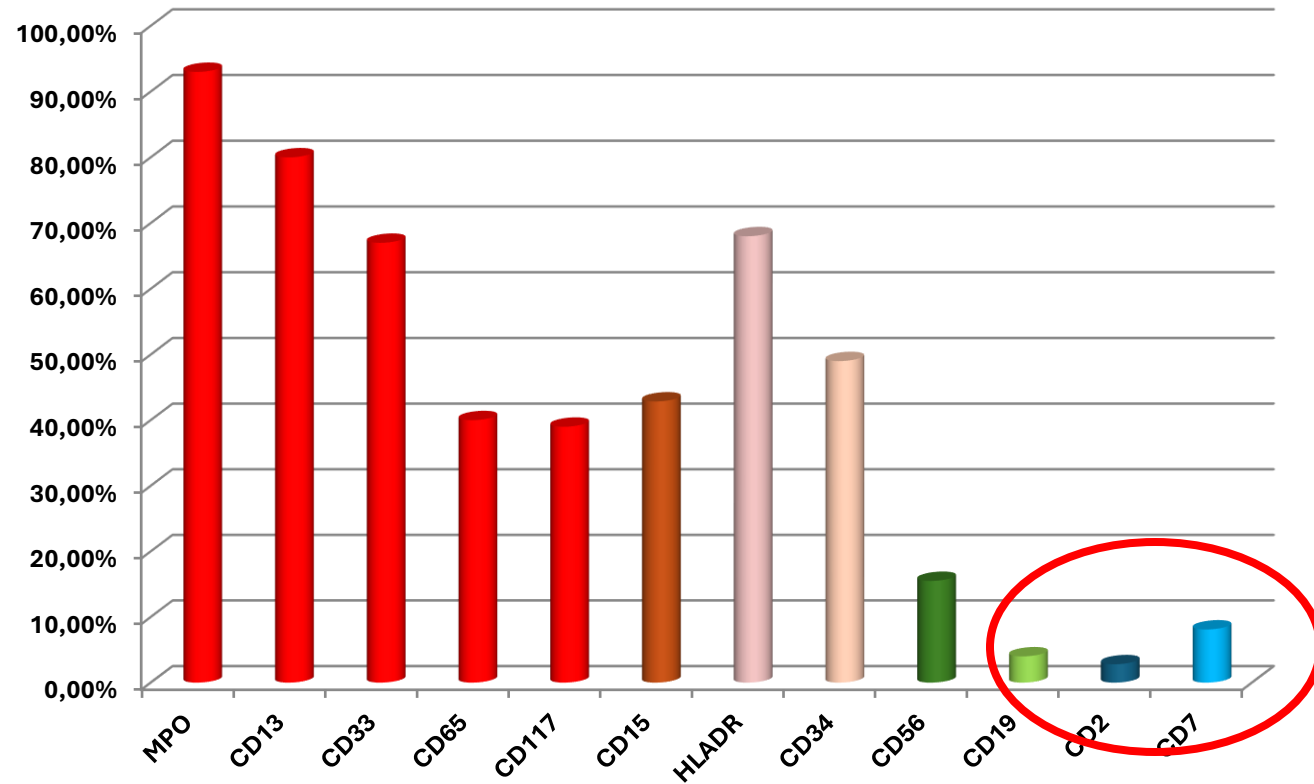
- Sept 2005 à Sept 2008
- 200 LAM
- 100 LAL
- 10 LA biphénotypiques
- 3 LA indifférenciées

RESULTATS LAM

RESULTATS LAM

- Fréquence des différents marqueurs:

- MPO 93%
- CD13 80%
- CD33 67%
- CD15 42%
- CD65 40%
- CD117 39%
- HLA DR 68%
- CD34 49%



- Expression panmyéloïde : 8,5%
- Coexpression CD56 15,5%
- Expression marqueurs lymphoïdes: T>B

	Notre série	Série SA	Littérature
MPO	93%	77,2%	75-85%
CD13	80	57,2	70-95
CD33	67	84,3	70-90
CD15	42	15	
CD65	40	-	50
CD117	<u>39</u>	77,6	75
HLA-DR	68	67,2	70-80
CD34	49	48,5	60

RESULTATS LAL (HAO)

- 22 LAL de l'adulte
 - 68% B (BIII+++, littérature BII)
 - 31,2% T (littérature 25%)
-
- 70 LAL enfant
 - 83,8% B (BIII+++)
 - 16,2% T (littérature 15%)

RESULTATS LA biphénotypiques

- 10 LA biphénotypiques
- Cytologie non concluante

- 6 My+ LyB+
- 3 My+ LyT+
- 1 LyB+ LyT+

Cytométrie de flux à l'hôpital Aziza Othmana

- Diagnostic des leucémies aiguës
- Suivie de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant
- Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques
- Recherche des clones HPN
- Thrombopathies

Leucémie aiguë lymphoblastique

- **Prolifération clonale maligne de cellules hématopoïétique malignes de type lymphoblastique.**
- **> 30% de lymphoblastes au myélogramme**
 - **LAL- B**
 - **LAL-T**

- Rémission: <5% de blastes au myélogramme
 - Rechutes fréquentes
 - Au dg: 10^{12} cellules leucémiques
- ⇒ Chimiothérapie induction
- =Persistance de 10^{10} cellules leucémiques
 - Limites de la cytologie: seuil de 1 à 5%

- **Développement de la PCR et de la CMF**
- **Seuil de détection est de 10^{-4} à 10^{-6}**
- **100 fois plus sensible que la cytologie**

Maladie résiduelle en CMF

- **Sensibilité équivalente à la bio mol**
- **Moindre coût**
- **Disponibilité de la technique dans plusieurs laboratoires**
- **Rapidité de résultats**
- **Ne dépend pas de l'existence d'un transcrit**
- **Corrélations avec le pronostic**
- **Meilleur ajustement du traitement**

Comparaison

Biologie moléculaire/Cytométrie en flux

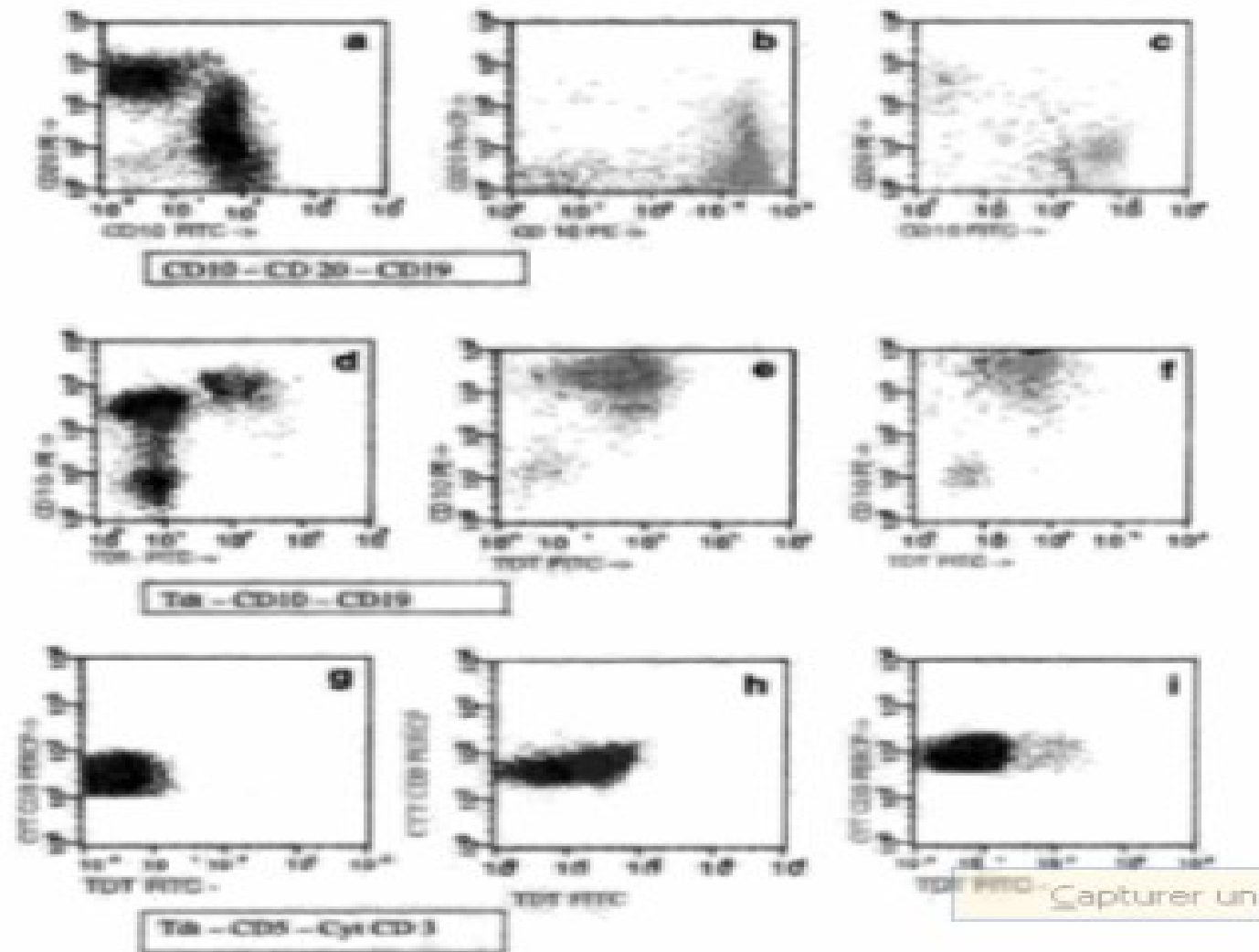
	Biologie moléculaire	Cytométrie en flux
Rapidité	2-3 jours	1-2 heures
Cible	ADN/ARN	Cellules
Application	TCR, recept Ig Transcrit de fusion	Large
Technique	Complexe	Simple
Laboratoire	Spécialisé	Standard
Cellules	Purification	Toutes les cellules

CMF & MDR

- **Au diagnostic: Panel aussi complet que possible**
- **Acquisition de 5000 à 10000 évènements**
- **MDR: Choix d'une combinaison d'Ac en fonction du phénotype aberrant**
- **Acquisition pour la MDR doit se faire sur un grand nombre d'évènements**

Etude de la MRD en CMF

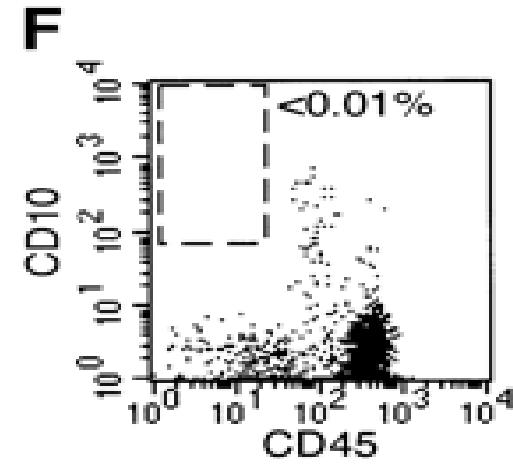
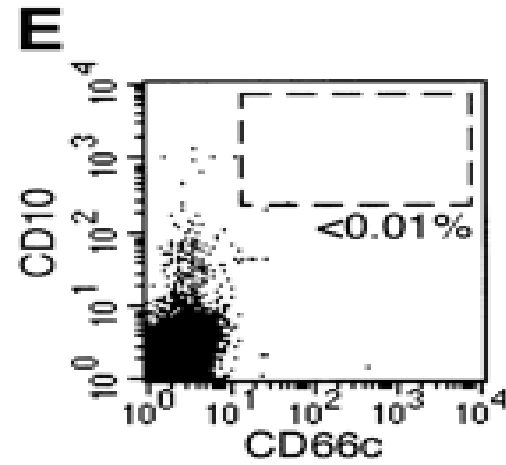
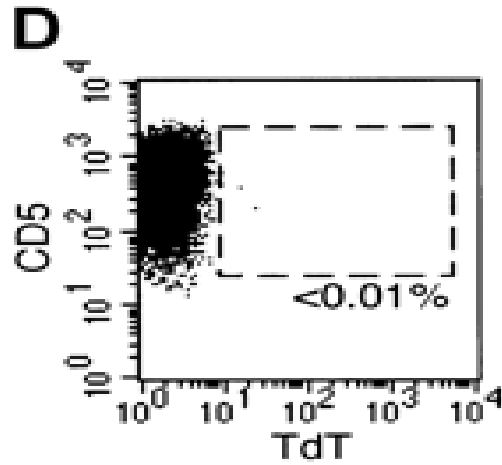
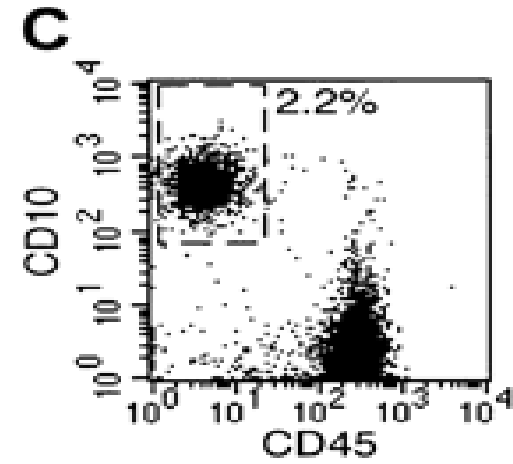
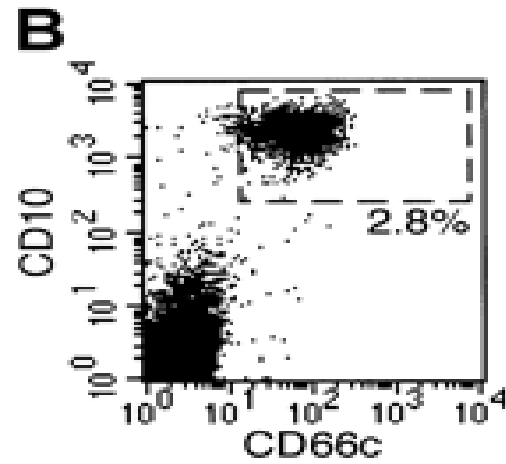
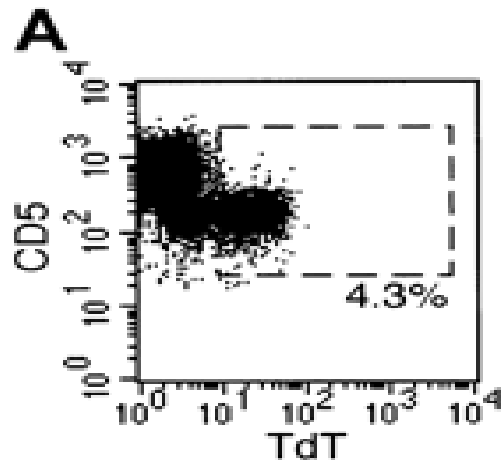
- **Détection d'un phénotype aberrant au diagnostic:**
 - Expression de marqueurs my au cours d'une LAL
 - Asynchronisme d'expression antigénique
 - Intensité anormale

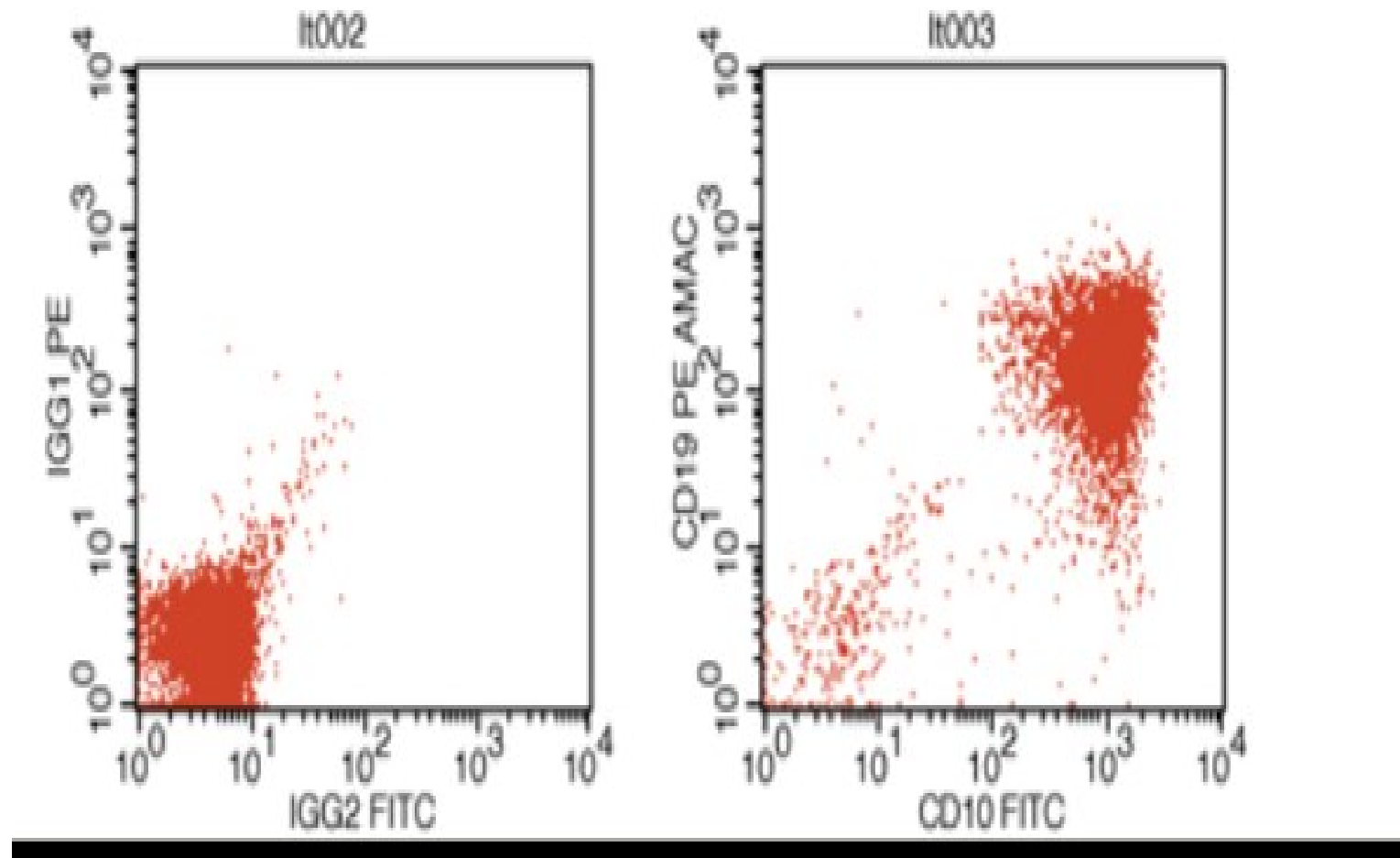


Gating cCD3+

CD19+

CD19+



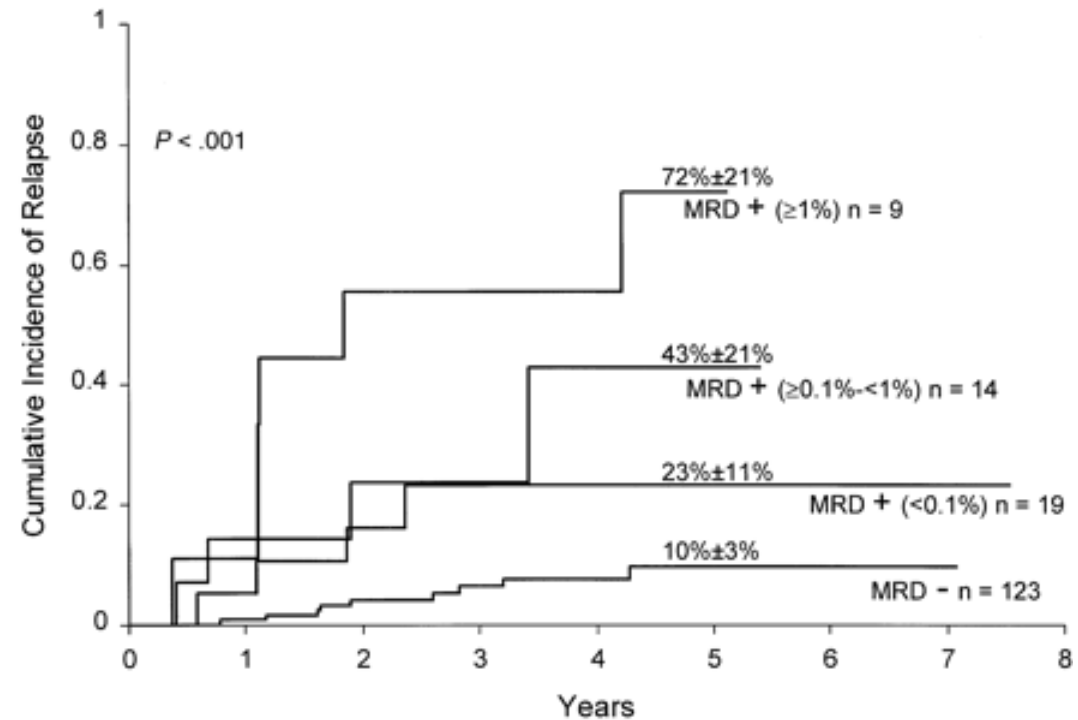


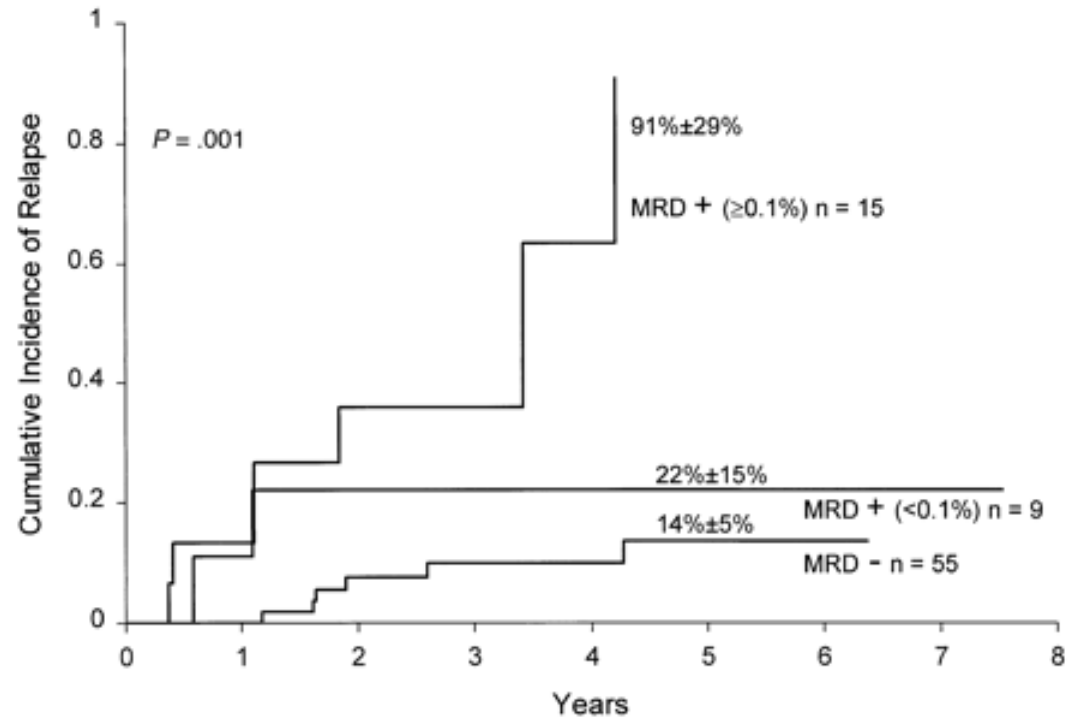
CORRELATIONS PRONOSTIQUES

- La MRD en fin d'induction est corrélée au risque de rechute
- La MDR en cours d'induction
- Cinétique de clearance blastique

Blood, Vol. 96, Issue 8, 2691-2696, October 15, 2000

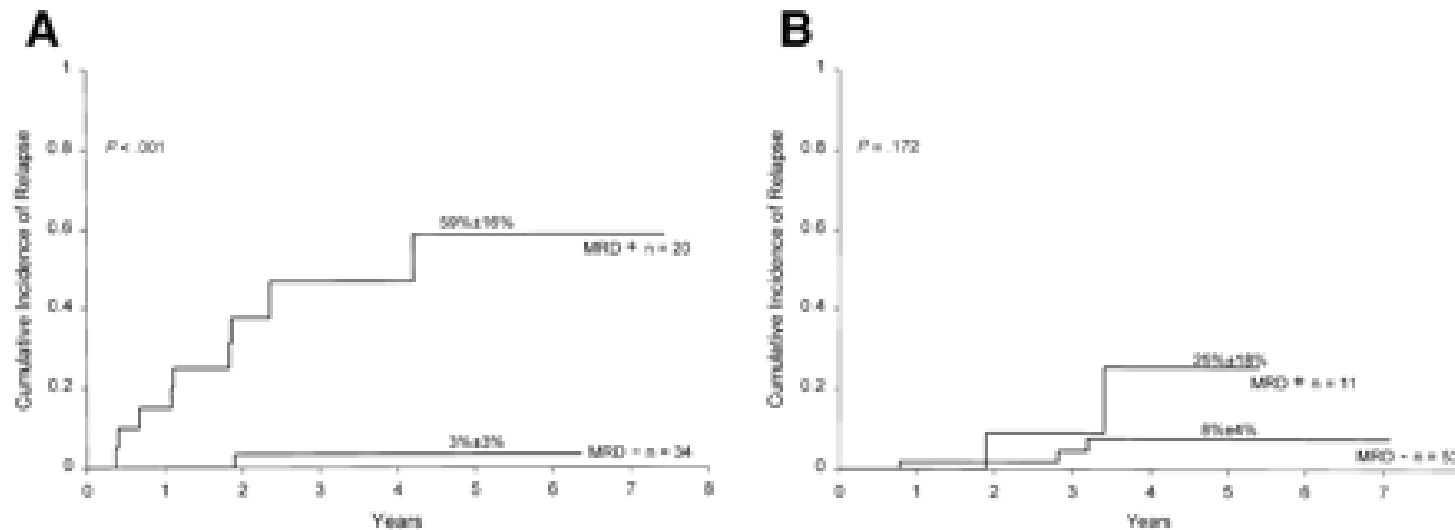
Cumulative incidence of relapse in children with ALL according to MRD levels at the end of remission induction. All patients were in complete morphologic remission at the time of the MRD studies. Levels of MRD were defined by the percentage of mononuclear cells expressing leukemia-specific immunophenotypes.





Blood, Vol. 96, Issue 8, 2691-2696, October 15, 2000

Cumulative incidence of relapse in children with standard-risk ALL according to MRD levels at the end of remission induction. All patients were in complete morphologic remission at the time of the MRD studies. Levels of MRD were defined by the percentage of mononuclear cells expressing leukemia-specific immunophenotypes.



Blood, Vol. 96, Issue 8, 2691-2696, October 15, 2000

Cumulative incidence of relapse in children with high-risk (A) and low-risk (B) ALL according to MRD studies at the end of remission induction. Risk was defined by NCI criteria (see text for definition). All patients were in complete morphologic remission at the time of the MRD studies. MRD positivity is defined as 0.01% of mononuclear cells expressing leukemia-specific immunophenotypes.

- 70 LAL de l'enfant
- 52 ont bénéficié d'une étude de la maladie résiduelle
- 30,7% MRD $<10^{-4}$
- 34,6% MRD 10^{-4} - 10^{-3}
- 23% MRD 10^{-3} - 10^{-2}
- 7,6% MRD $>10^{-2}$

- Etude de la MRD permet une stratification thérapeutique
- Améliorer le taux de survie

Cytométrie de flux à l'hôpital Aziza Othmana

- Diagnostic des leucémies aiguës
- Suivie de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant
- Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques
- Recherche des clones HPN
- Thrombopathies

SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS

SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS B

- Leucémie lymphoïde chronique
- Leucémie à prolymphocytes
- Leucémie à tricholeucocytes et variante
- Leucémie à plasmocytes
- Lymphome splénique de la zone marginale à Lc villeux
- Lymphome folliculaire
- Lymphome du manteau
- Lymphome lymphoplasmocytaire
- Lymphome B à grandes cellules

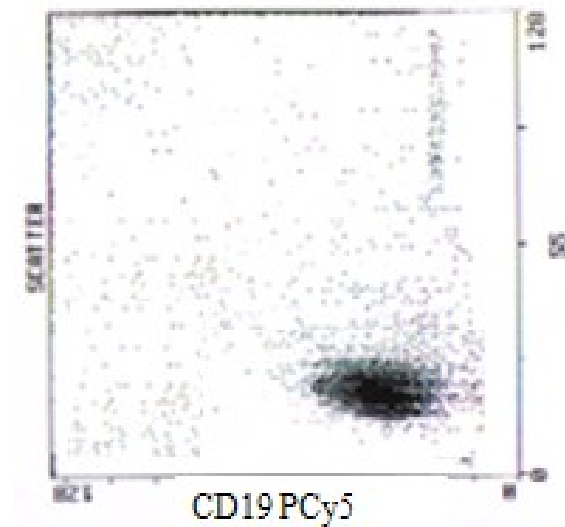
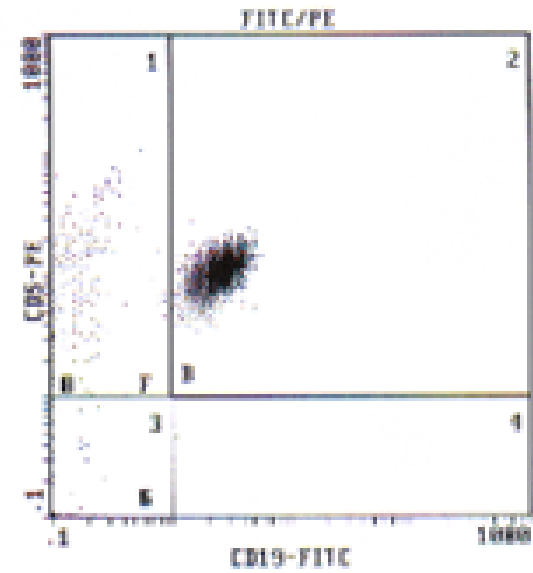
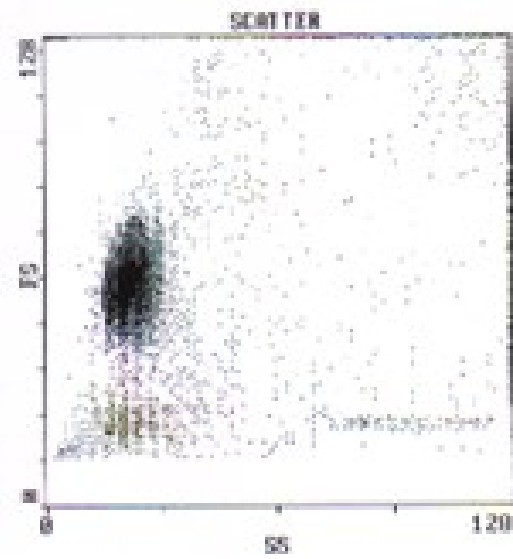
SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS T

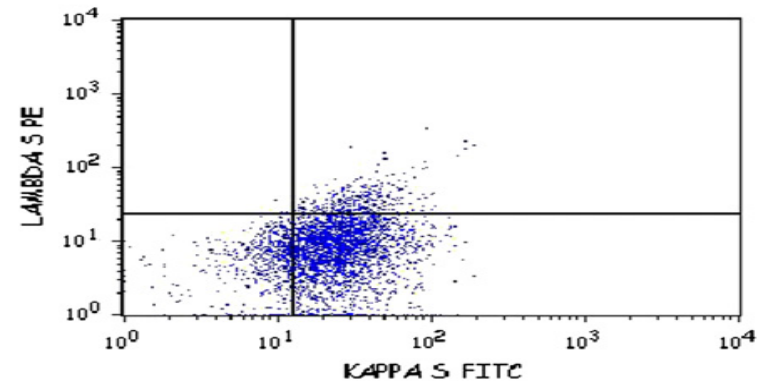
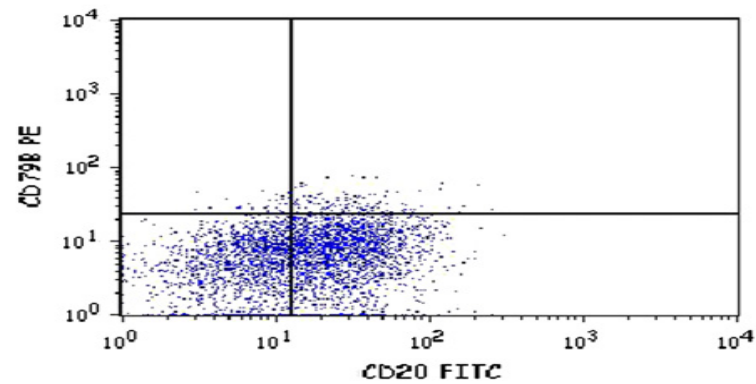
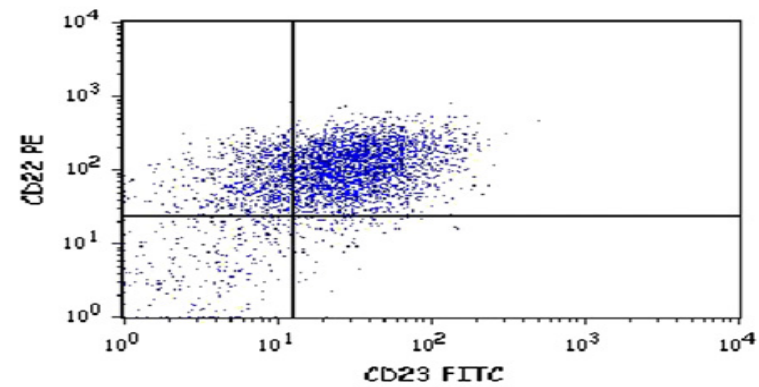
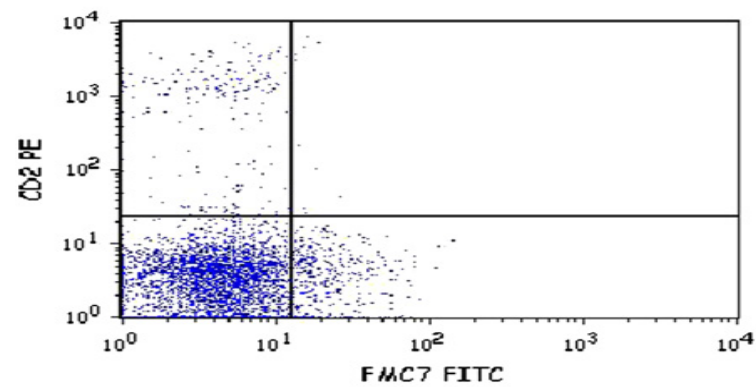
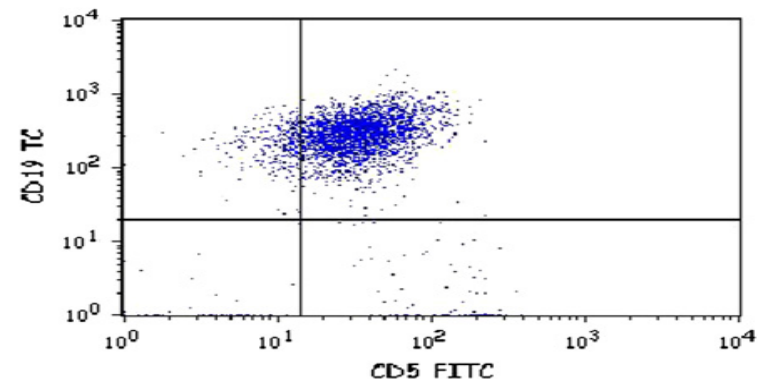
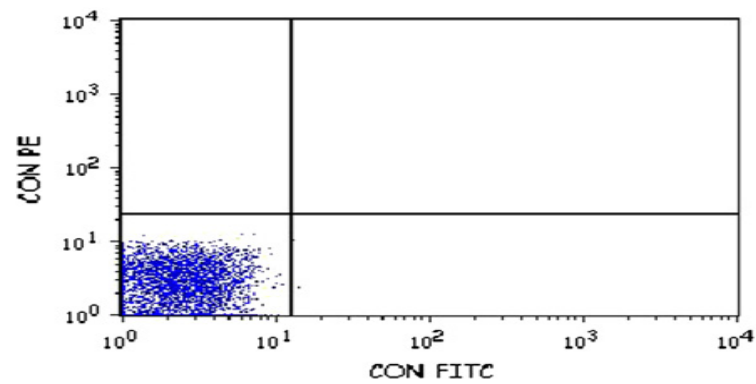
- Leucémie à prolymphocytes T
- Leucémie à LGL
- Syndrome de Sézary
- ATLL
- Lymphomes à grandes cellules T
- Lymphome T pléiomorphe

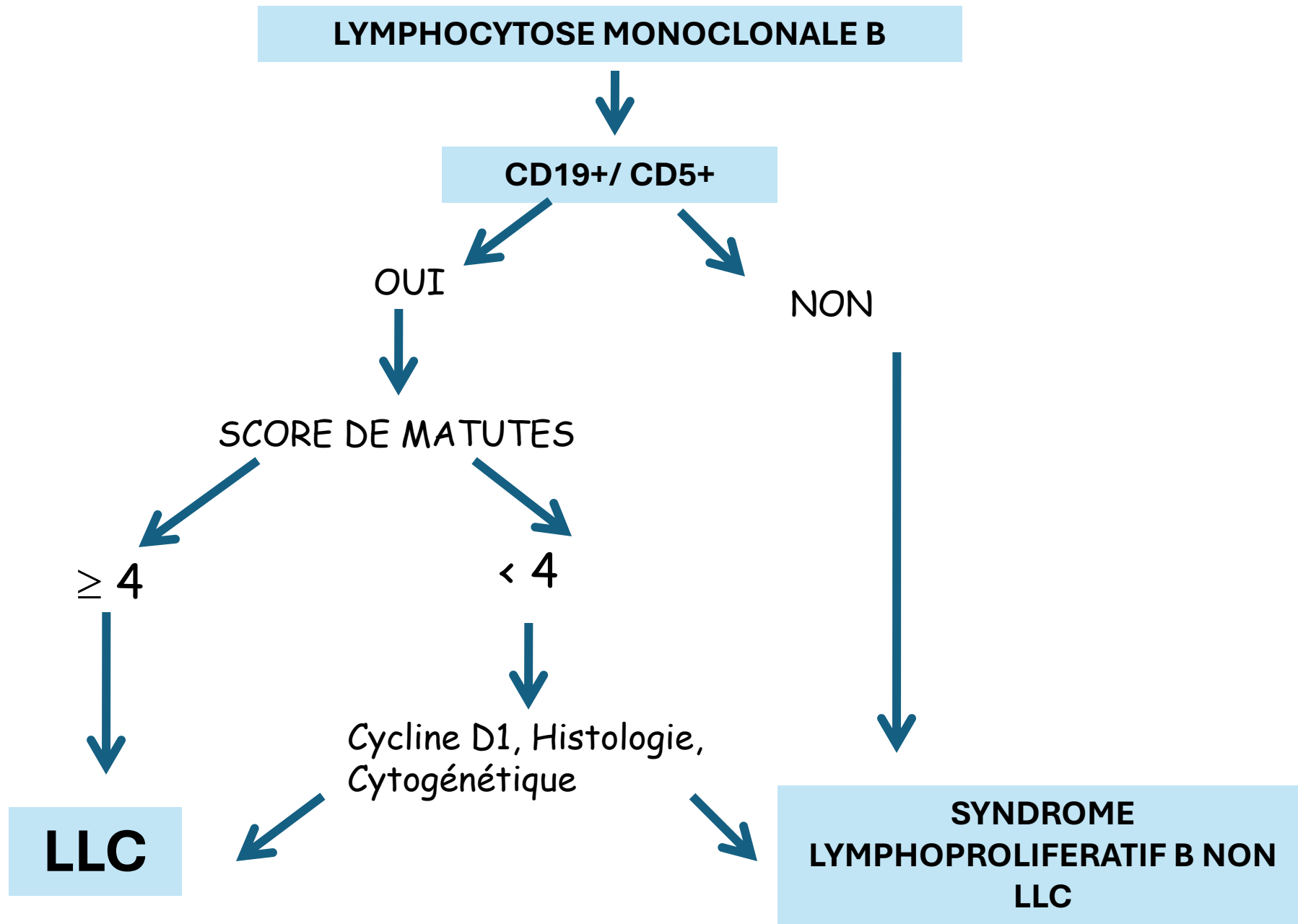
- **Lymphocytose > 5000/mm³**
- **Examen du frottis sanguin**
- **Immunophénotypage des Lc circulants**
CD19/CD5
FM C7/CD23/CD19
κ/λ/CD19
CD20/CD38/CD19
- **Différencier les LLC des autres SLPC B**

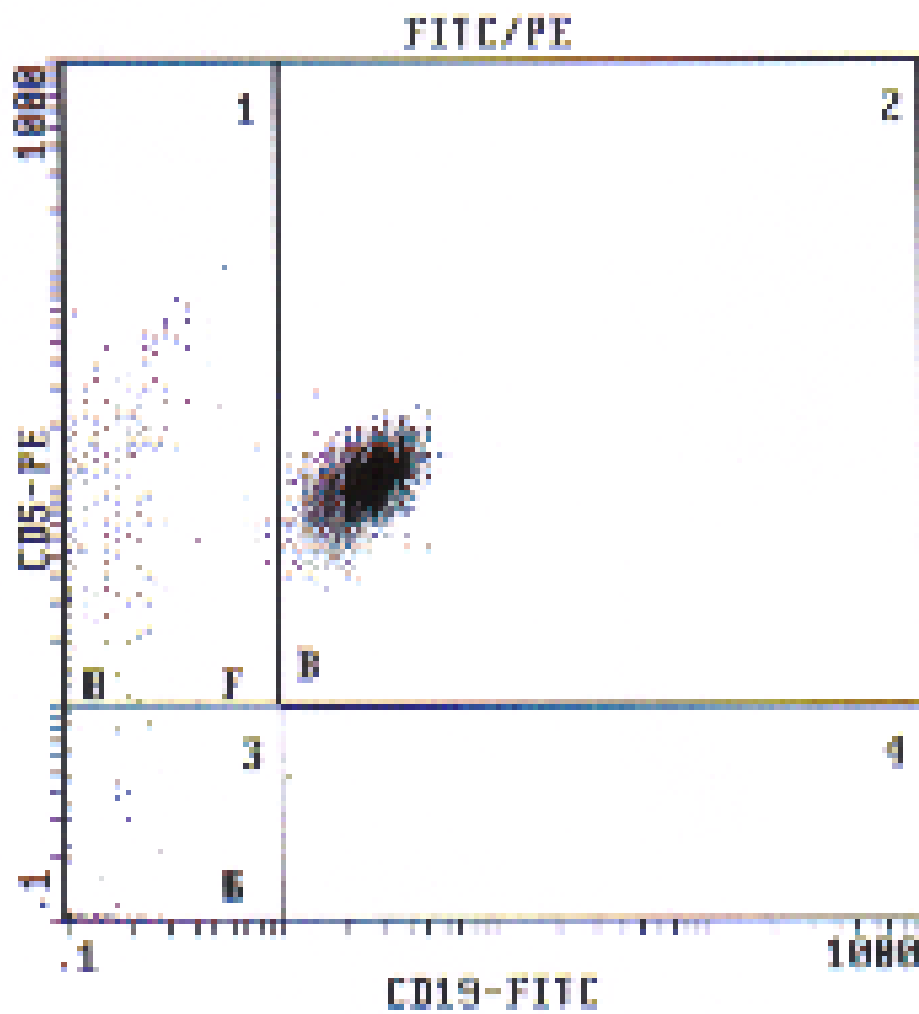
Calcul du score de Matutes

Marqueurs	Résultats	
	1	0
Intensité Ig de surface	Faible	Modérée/Forte
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22	Faible/Négative	Modéré/Forte

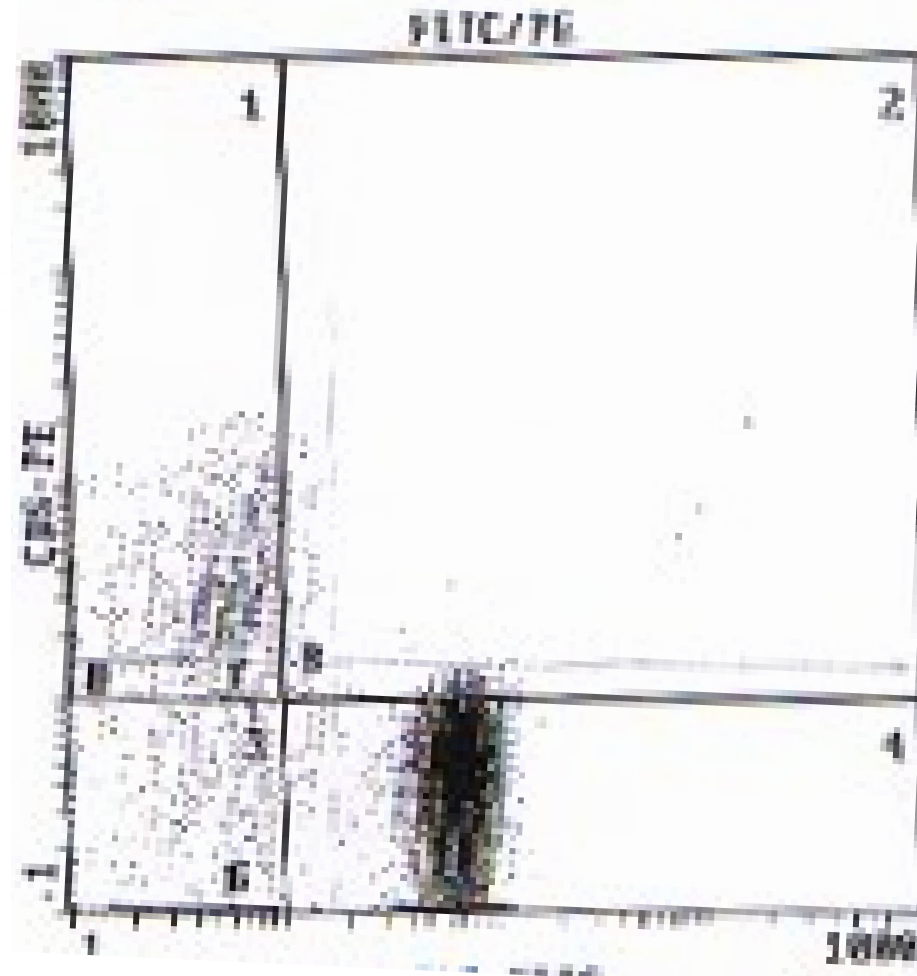






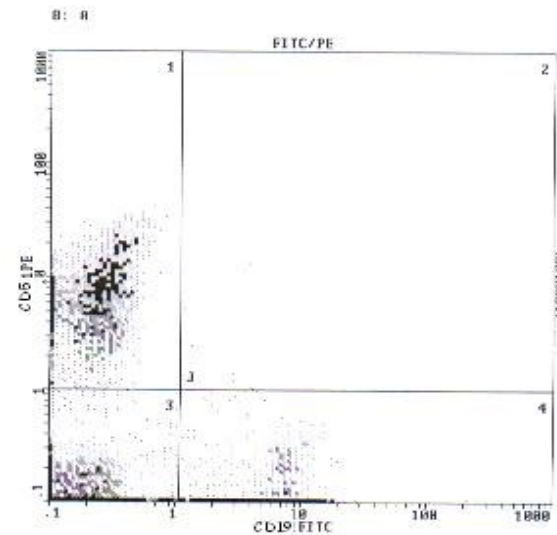


CD19+CD5+



CD19+CD5-

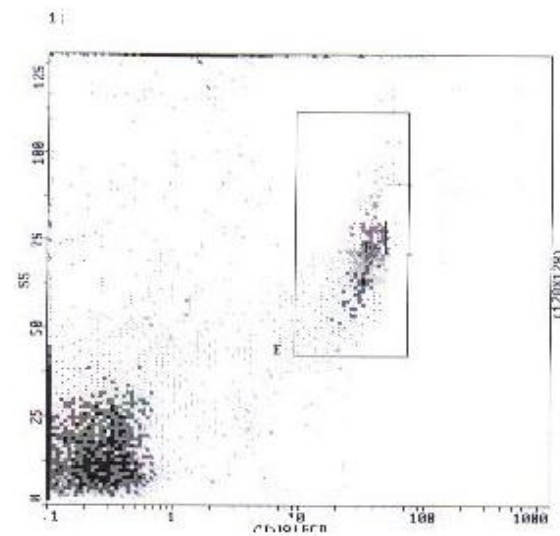
Fenêtrage sur 100%
des cellules mononuclées



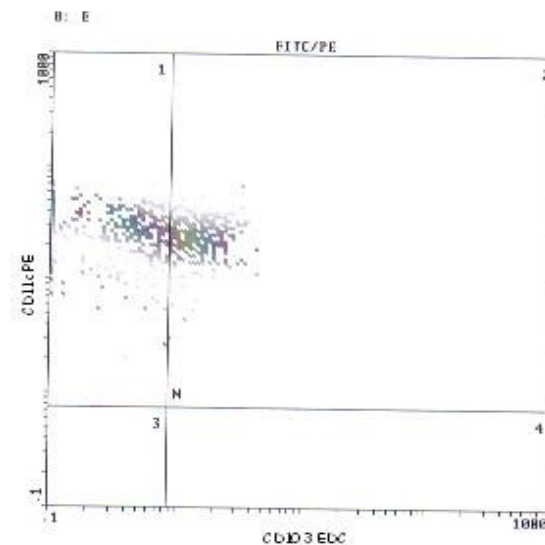
Immunophénotypage:
Intensité SSC élevée
CD103
Intensité CD11c, CD25

La population CD19+ est CD5 nég

Fenêtrage sur la population CD19+



Signal SSC important



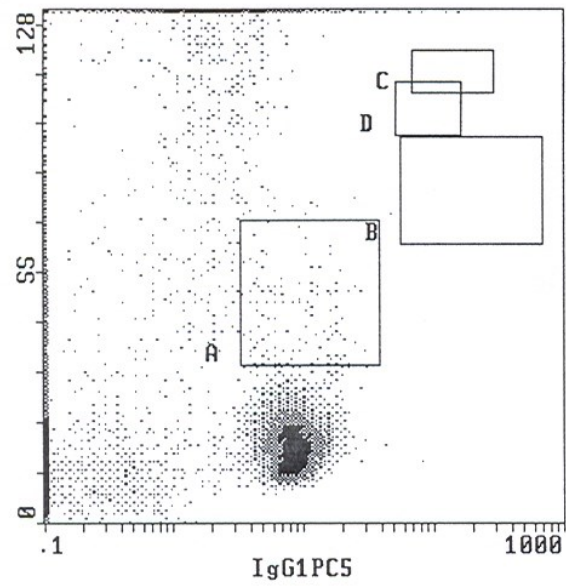
CD103+, CD11c+++

- 269 SLPC B
- 72,18% LLC
- 27,8% non LLC

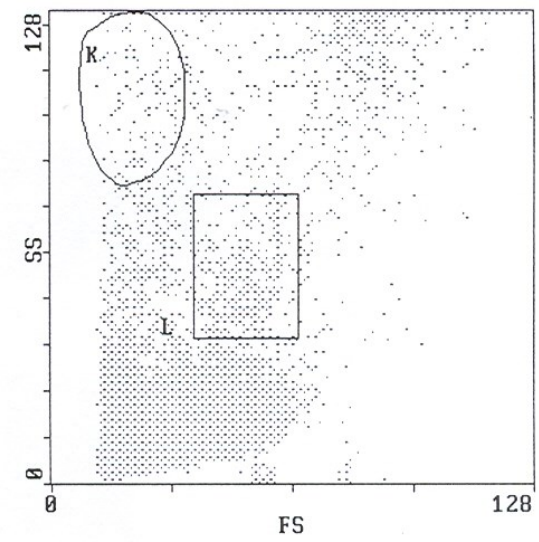
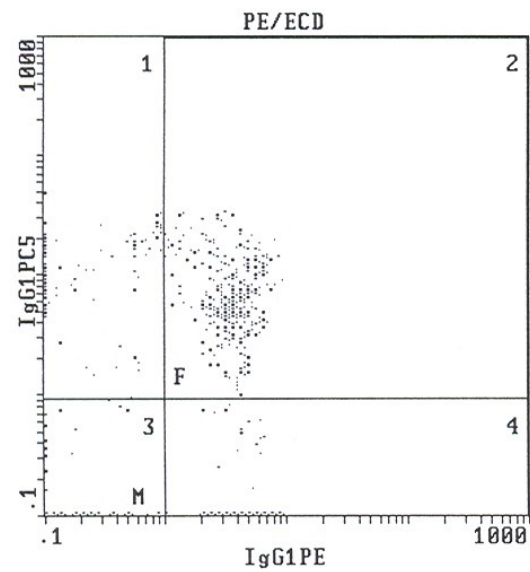
Cytométrie de flux à l'hôpital Aziza Othmana

- Diagnostic des leucémies aiguës
- Suivie de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant
- Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques
- Recherche des clones HPN
- Thrombopathies

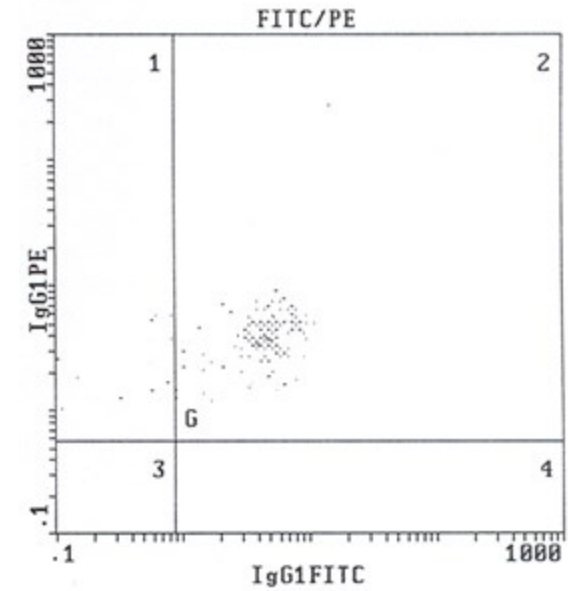
- Expression des molécules ancrées GPI
 - CD16, CD66, CD14
 - CD55, CD59
-
- Prélèvement de sang périphérique sur EDTA
 - Gating CD45/CD13 ou CD33 sur les granuleux

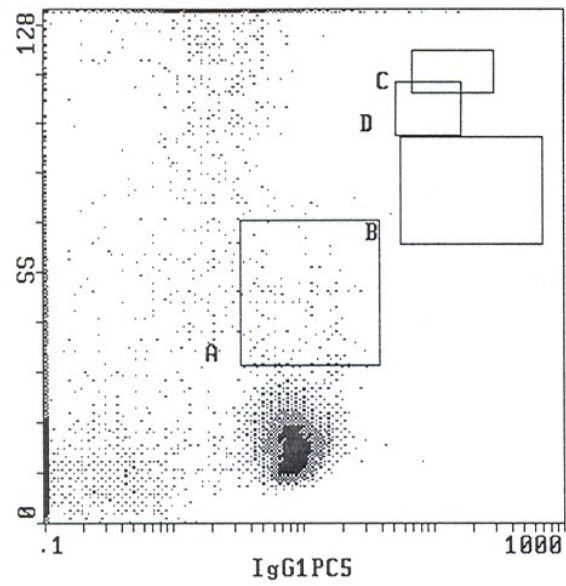


4: L

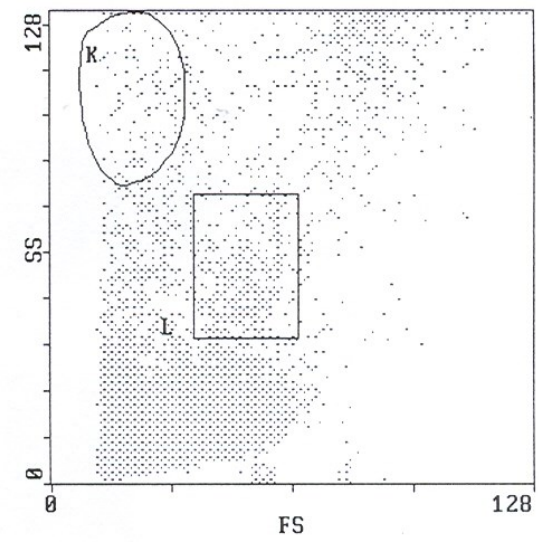


5: ALM

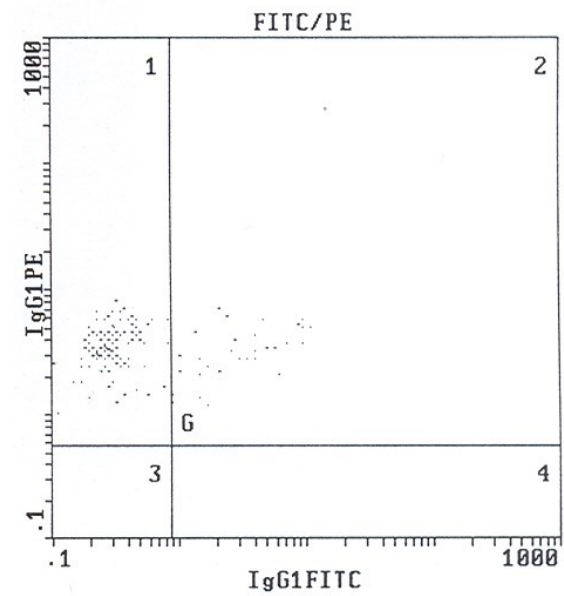
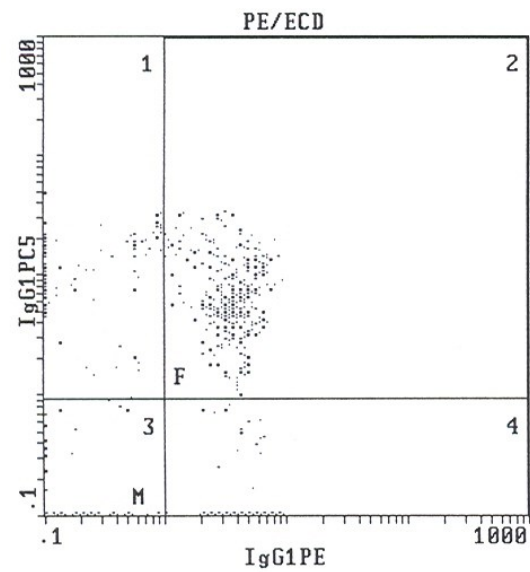




4: L



5: A L M



- 67 AMA
 - Clone HPN dans 26,19% des cas
 - (littérature 25-88%)
 - Intérêt pronostic?
- 8 maladie de Marchiafava Michelli

Cytométrie de flux à l'hôpital Aziza Othmana

- Diagnostic des leucémies aiguës
- Suivie de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant
- Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques
- Recherche des clones HPN
- Thrombopathies

- Thrombasthénie de Glanzmann
- Plaquettes
- Prélèvement EDTA
- CD41, CD61
- 20 thrombasthénies de Glanzmann

CONCLUSION

- Outil diagnostique indispensable en hématologie.....



**Exploration des déficits
immunitaires héréditaires
et cytométrie de flux**

**C. Picard
Centre d'étude des déficits immunitaires,
Hôpital Necker-Enfants Malades
capucine.picard@in**

Classification des déficits immunitaires héréditaires (DIH)

- **Déficits immunitaires combinés (T et B)**
 - **Déficits immunitaires humoraux (B)**
 - **Déficits de la phagocytose et de l'opsonisation**
 - **Déficits de l'immunité innée**
 - **Déficits de l'homéostasie du système immunitaire**
 - **Pathologies auto-inflammatoires**
- (Geha et al. J allergy clin Immunol,2007)**

Conclusions

- **Les examens biologiques pour le diagnostic des DIH sont :**
 - **Numération formule sanguine,**
 - **le dosage pondéral des immunoglobulines,**
 - **les sérologies post-vaccinales et post-infectieuses.**
- **Ils permettent d'orienter le diagnostic.**
 - **L'analyse conjointe des antécédents infectieux, de l'examen clinique et des résultats des examens de première intention, permet de guider la prescription des examens de deuxième intention qui dépendront du type de DIH suspecté.**
 - **Parmi ces examens la cytométrie en flux a une place importante.**