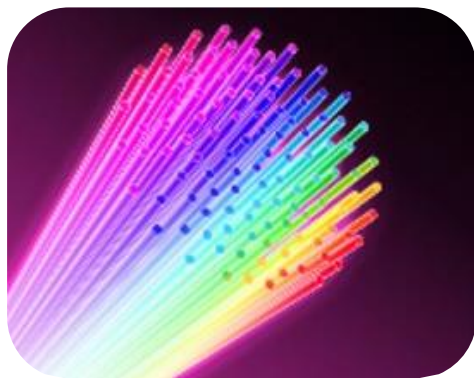


IMMUNOPHENOTYPAGE DU SANG PAR CYTOMETRIE EN FLUX (CMF)



Quelles prescriptions pour quelles informations ?

La technique d'immunophénotypage des lymphocytes s'est progressivement imposée comme la méthode de choix pour la classification et le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs chroniques en testant les antigènes cellulaires présents grâce à un panel d'anticorps spécifique. Cette technique s'est élargie au suivi thérapeutique de pathologies infectieuses et rhumatismales.

Lire la suite en page 2

Les biologistes du groupe Oriade-Noviale et GLBM ont sollicité le Dr Marie-Christine Jacob du laboratoire d'immunologie du CHU Grenoble-Alpes, pour actualiser les cadres de prescription de cet examen.

Dr Jacob, qu'est-ce que l'immunophénotypage par cytométrie en flux?

La CMF est une technique spécialisée non automatisée qui permet d'identifier les cellules grâce à des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes : on parle de clusters de différenciation (CD) et de marqueurs. Par exemple, le marqueur CD45 reconnaît tous les leucocytes, CD3 tous les lymphocytes T...

L'immunophénotypage correspond à l'analyse d'un ensemble de marqueurs.

Dr Jacob, quelles informations biologiques sont fournies par l'immunophénotypage ?

L'immunophénotypage permet de **quantifier les populations cellulaires présentes dans un échantillon** : pour le sang il s'agit essentiellement des lymphocytes T (CD3+) avec les 2 sous-populations principales T CD4 et T CD8, des lymphocytes B (CD19) et des lymphocytes NK (CD56+ CD3-). L'interprétation des résultats se fait sur les valeurs absolues (nombre de cellules par mm³ ou par litre de sang) pour déterminer si une population est quantitativement normale, augmentée ou diminuée. Des valeurs de référence en fonction de l'âge sont précisées dans le compte-rendu.

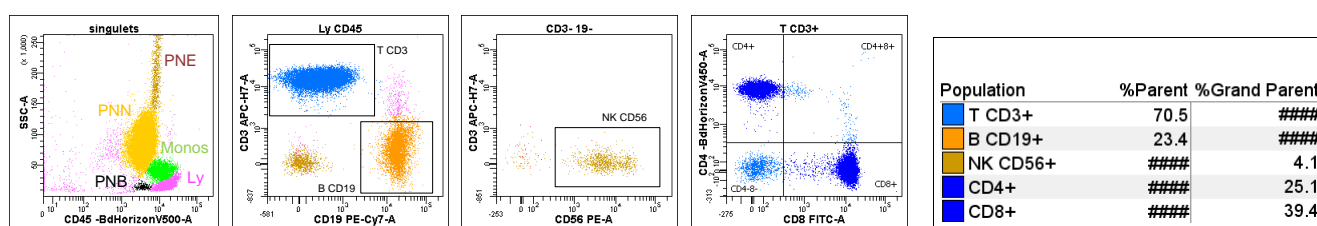


Fig.1 Exemple de numération des lymphocytes T, T CD4, T CD8, B et NK

L'immunophénotypage permet également de **préciser le phénotype immunologique des populations identifiées**, en listant les marqueurs positifs et négatifs. L'objectif est de rechercher et caractériser des cellules anormales dans les hémopathies et les pathologies de l'immunité.

Dr Jacob, quand prescrire un immunophénotypage avec numération de populations lymphocytaires et pour quelles informations ?

Il existe 3 grandes indications :

- ◆ **Suspicion de déficit immunitaire, primitif ou secondaire.** L'objectif est de rechercher une diminution en valeur absolue d'une ou plusieurs populations lymphocytaires T, B et NK.
- ◆ **Recherche d'une immunodépression liée à une diminution des lymphocytes T CD4,** principalement chez les patients porteurs du HIV. Le taux de CD4 en valeur absolue renseigne sur le niveau de l'immunodépression et guide la prophylaxie anti-infectieuse.
- **Suivi de la déplétion des lymphocytes B** chez les patients avec maladie auto-immune traitée par biothérapie anti-CD20 telle que Rituximab (Mabthera®).

Dr Jacob, quand prescrire un immunophénotypage par CMF pour une recherche d'hémopathie ?

La CMF est particulièrement utile dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs (SLP) pour détecter et caractériser immunologiquement des cellules anormales. C'est un maillon obligatoire de la classification des hémopathies dans les entités nosologiques décrites par l'OMS. Les SLP comprennent certaines leucémies dont la LLC, et les lymphomes malins.

L'indication se pose dans 4 situations diagnostiques, principalement chez l'adulte, à fortiori d'âge mûr :

- ◆ **Présence d'une hyperlymphocytose isolée, supérieure à 10 G/L.**

- ◆ **Présence d'une hyperlymphocytose isolée modérée entre 5 et 10 G/L, en fonction de l'analyse du frottis sanguin :**
 - si le frottis retrouve une cause non tumorale évidente (ex syndrome mononucléosique) : pas d'indication d'immunophénotypage ;
 - si le frottis identifie des cellules suspectes de malignité : indication d'immunophénotypage ;
 - dans les autres cas, l'hémogramme est à contrôler au bout de 3 mois environ, et l'immunophénotypage sera prescrit seulement si la lymphocytose persiste.

- ◆ **Présence de signes cliniques pouvant faire évoquer un lymphome malin** quelque soit le taux de lymphocytes : polyadénopathie, splénomégalie, érythrodermie, fièvre prolongée inexpliquée

- ◆ **L'immunophénotypage est aussi discuté devant certains signes biologiques**, quelque soit le taux de lymphocytes : pic IgM à l'immunoélectrophorèse, hypogammaglobulinémie, cytopénies, anémie hémolytique auto-immune, agglutinines froides

- ◆ **L'immunophénotypage est aussi prescrit au cours de la maladie**, le clone lymphoïde circulant représentant une cible permettant de suivre l'efficacité du traitement et la détection d'une rechute.

Dans **les leucémies aiguës**, la recherche initiale de blastes dans le sang n'est pas une indication. Elle est une découverte du cytologiste sur frottis. La CMF peut alors être prescrite par le biologiste pour vérifier qu'il s'agit bien de cellules leucémiques car il est parfois très difficile de faire la différence avec des lymphocytes hyperbasophiles ou des lymphocytes normaux chez l'enfant. La classification précise de ces cellules nécessitera un prélèvement de moelle osseuse.

A titre indicatif, car la prescription est réalisée en milieu spécialisé, les diagnostics d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) et de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) sont aussi posés à l'aide d'analyses sanguines par CMF.

Dr Jacob, comment interpréter les résultats de l'immunophénotypage dans les SLP ?

Dans plus de 90% des cas, les SLP sont développés à partir de la transformation maligne d'un lymphocyte B. Ils sont suspectés en CMF devant le caractère homogène (ou monotypique) d'une population, défini par l'expression d'une seule chaîne légère d'immunoglobuline, kappa ou lambda.

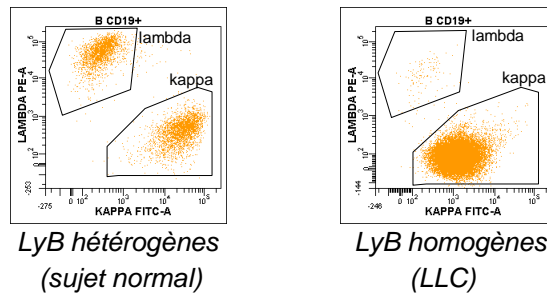


Fig.2 Analyse de l'expression de kappa et lambda par les lymphocytes B

- ◆ **Le diagnostic de LLC** est retenu si le clone de lymphocytes B est supérieur à 5 G/L et grâce au calcul du score de Matutes. Cinq marqueurs sont analysés: 1 point leur est attribué s'ils sont caractéristiques de la LLC et 0 sinon (tableau 2A). La somme des points correspond au score de Matutes et donne la probabilité du diagnostic de LLC (tableau 2B).

Marqueurs	Caractéristiques de la LLC
CD5	Positif
CD23	Positif
Chaînes légères d'Ig	Expression faible
CD22 ou CD79b	Expression faible ou négative
FMC7	Expression faible ou négative

Score de Matutes	Diagnostic
4 ou 5	LLC (98%)
3	LLC (50%) ou lymphome (50%)
0-1-2	LLC exclue

Tableaux 2A et 2B Calcul du score de Matutes

- ◆ **Le diagnostic des autres leucémies (leucémie à tricholeucocytes ...) et des divers lymphomes malins B** est porté, quelque soit le taux de lymphocytes, devant des signes cliniques compatibles et un immunophénotype propre à chaque entité. Dans le cas des lymphomes, la classification nosologique selon l'OMS requiert l'analyse d'une biopsie.
- ◆ **Le diagnostic de « lymphocytose B monoclonale » ou mbl** est retenu lorsque le bilan est négatif, patient asymptomatique et après avoir éliminé une maladie lymphomateuse. Pour une valeur du clone lymphocytaire B <0,5 G/L, le risque d'évolution vers une LLC ou un lymphome est faible et ne nécessite pas de suivi. Pour une valeur >0,5 G/L, ce risque est d'environ 2% par an et requiert un suivi.
- ◆ **Lorsqu'aucune population homogène n'est retrouvée dans le sang**, le diagnostic de SLP n'est pas exclu car les cellules tumorales peuvent n'être présentes que dans la tumeur.

Plus rarement, les SLP sont développés à partir de la transformation d'un lymphocyte T. Les principales entités sont la leucémie à prolymphocytes T, la leucémie à grand lymphocytes à grains (LGL), le syndrome de Sézary et les différents lymphomes malins T. Le caractère homogène d'une population est dans ce cas beaucoup plus difficile à déterminer. Il s'appuie sur l'expression anormale d'antigènes, en plus ou en moins (dans ce cas, on parle de trou antigénique). La preuve de clonalité, si elle est requise, nécessite soit l'étude du répertoire T par CMF, soit l'étude du réarrangement des gènes du TCR par biologie moléculaire.

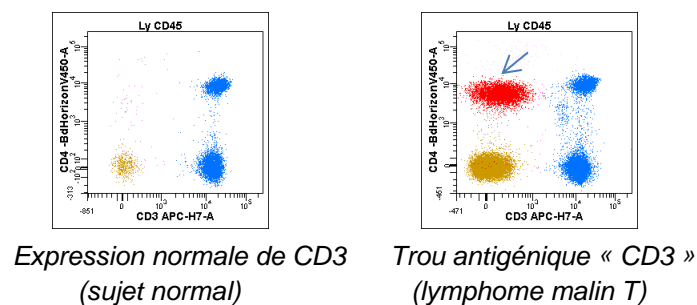


Fig.3 Analyse de l'expression de CD3 par les lymphocytes T CD4

Comment prescrire ?

Les panels de marqueurs étudiés étant orientés par les anomalies recherchées, la réponse peut être inadaptée si la question n'est pas exprimée clairement par le prescripteur. Pour éviter ce problème et optimiser l'apport de la CMF, il est recommandé de se conformer aux prescriptions du tableau 3 ci-dessous.

Il est important de noter que le panel utilisé en dépistage des SLP est adapté à tous les cas, sauf 3 entités. Lorsqu'elles sont évoquées, **il est indispensable qu'elles soient explicitement mentionnées sur la prescription d'immunophénotypage** afin que les marqueurs spécifiques soient ajoutés :

- Leucémie à tricholeucocytes
- Leucémie à LGL (lymphocytes à grains en nombre élevé supérieur à 0,5 G/L),
- Syndrome de Sézary.

Indications / contexte	Libellé des analyses
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recherche d'un déficit en CD4 <p>Suivi de patients porteurs du HIV Chimiothérapie</p>	Numération CD3 CD4 CD8 du sang
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Quantification des lymphocytes B <p>Suivi de patients avec maladie-auto-immune traitée par Rituximab</p>	Numération des lymphocytes B du sang (CD19/CD20/CD45)
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recherche d'un déficit quantitatif en sous-populations lymphocytaires <p>Suspicion de déficit immunitaire primitif ou secondaire</p>	Numération des lymphocytes B, NK et T CD4 CD8 du sang
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recherche d'une hémopathie lymphoïde (syndrome lymphoprolifératif ou SLP) <p>LLC, lymphome malin ...</p>	<p>Immunophénotypage du sang – syndrome lymphoprolifératif</p> <p>Cette analyse inclut la numération des lymphocytes T, CD4 CD8, B et NK</p> <p>Cas particuliers : préciser si recherche spécifique de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - cellules de Sézary, - LGL - tricholeucocytes
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Recherche de blastes leucémiques 	Immunophénotypage du sang – leucémie aiguë

Tableau.3 Aide à la prescription des analyses d'immunophénotypage pour le LABM.

Dr Jacob, quelles sont les précautions pré-analytiques ?

La CMF nécessite de travailler avec des cellules vivantes : le prélèvement doit donc être rapidement envoyé à température ambiante au laboratoire d'immunologie du CHU (dans la journée).

Quand disposer des résultats ?

Les résultats préliminaires sont disponibles par téléphone dans la journée si le prélèvement arrive avant 14h. La mise à disposition informatique demande moins d'une semaine.

L'essentiel à retenir

La cytométrie en flux constitue une étape essentielle dans le diagnostic et le suivi de la majorité des hémopathies malignes, notamment des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. La confirmation d'une monotypie, la perte d'expression d'un marqueur physiologique (ou trou phénotypique) ou l'expression d'un marqueur aberrant permettent de suspecter le caractère anormal de la prolifération. L'immunophénotypage permet l'identification de la lignée à partir de laquelle dérive la prolifération lymphoïde (B, T ou natural killer [NK]), la classification de la pathologie, l'évaluation du pronostic et la vérification de l'efficacité du traitement.

Le taux de CD4 en valeur absolue permet de définir un risque de pathologies infectieuses ou néoplasiques chez le patient porteur du HIV.