

Immunophénotypisation par cytométrie de flux des lymphocytoses et néoplasies lymphoïdes

J. Lovey, M.-J. Menétray, P.-Y. Lovey, Institut Central des Hôpitaux, Hôpital du Valais, Sion

Dans les lymphomes malins, la classification de l'OMS a une énorme importance clinique. Elle est basée sur la morphologie, l'immunophénotype, les anomalies génétiques et les éléments cliniques. L'immunophénotype peut être obtenu par immunohistochimie et/ou cytométrie de flux (CF).

La CF permet d'analyser les caractéristiques morphologiques et de fluorescence d'une suspension cellulaire qui provient du sang périphérique, d'une aspiration médullaire, d'une suspension de cellules ganglionnaires ou spléniques, ou encore du liquide céphalorachidien ou d'un liquide d'épanchement pleural ou d'ascite.

Technique et analyse

Les leucocytes sont isolés, mis en suspension puis marqués avec des anticorps monoclonaux (classifiés en fonction de l'appartenance de l'antigène qu'ils reconnaissent à un cluster de différenciation (CD)), couplés à des fluorochromes. Dans le cytomètre, les cellules marquées sont amenées une à une par un courant laminaire à travers la cellule de lecture. Elles sont alors exposées à plusieurs lasers. L'analyse de l'angle de dispersion lumineuse du laser permet de distinguer (figure 1) les cellules selon leur taille (déviation dans le sens du rayon laser : forward-angle light scatter-FS) et leur complexité cellulaire (déviation dans un certain angle du rayon laser : side-angle light scatter-SC). La lumière émise par les fluorochromes couplés aux anticorps, après excitation et retour à leur état de repos, est collectée sur différents photomultiplicateurs grâce à un jeu de filtres et de miroirs puis analysée par le système informatique. L'intensité de la fluorescence renseignée sur la densité antigénique. Les informations obtenues sont représentées sous forme de diagrammes bidimensionnels.

En confrontant les différentes informations obtenues, il est possible de :

- Cibler (gating) les populations d'intérêt. Exemple : lymphocytes : FSfaible, SSfaible (figure 1)

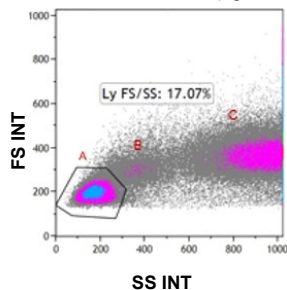


Figure 1. Distinction des différentes populations de leucocytes sur le diagramme FS/SS et gating des lymphocytes. A. lymphocytes, B. monocytes, C. neutrophiles

- Etablir l'absence ou la présence et la densité des antigènes recherchés à la surface ou de manière intracytoplasmique des cellules analysées (figures 2, 3 et 4).

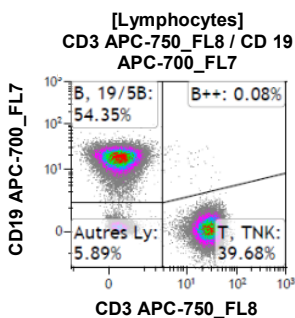


Figure 2: Analyse de l'expression d'antigènes spécifiques des lymphocytes T et B, par les marqueurs respectivement CD3 et CD19 : ratio B/T = 40/54, anormalement inversé

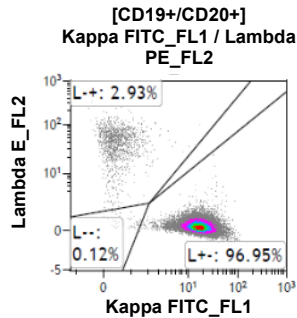


Figure 3: Analyses des chaînes légères kappa et lambda à la surface des lymphocytes B CD19+ : ratio kappa/lambda = 97/3 anormal, indicatif d'une monoclonalité des lymphocytes B

Un premier panel d'anticorps de « dépistage » permet d'évaluer les différentes populations lymphocytaires normalement présentes (figure 2). Si des anomalies sont détectées (ex : déséquilibre entre proportion de lymphocytes B et T, augmentation de l'expression d'une des 2 chaînes légères (ratio kappa/lambda >4.0 ou <0.25) (figure 3)), différents panels de « 2ème ligne » sont testés et permettent d'affiner le diagnostic (figure 4).

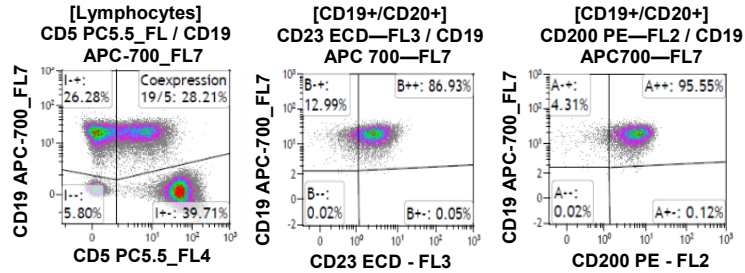


Figure 4: Leucémie lymphoïde chronique B kappa. A. Coexpression aberrante du marqueur lymphocytaire T CD5. B Expression du CD23. C. Expression du marqueur CD200

Les cellules lymphomateuses B expriment fréquemment à leur surface des antigènes (CD) n'appartenant pas à leur lignée cellulaire ou des marqueurs n'appartenant pas à leur stade de différenciation. C'est, par exemple, le cas de la coexpression du marqueur lymphocytaire T CD5 dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (fig. 4). Cette combinaison particulière d'antigènes et l'intensité d'expression de certains marqueurs (tableau 1) permettent d'établir un diagnostic précis, expliquant le rôle central que tient la CF dans la classification des lymphomes B.

	LLC	LP-B	LF	LZMS/LZM	LTL	MCL	LLP
CD19	+	+	+	+	+	+	+
CD20	+faible	+fort	+fort	+/(-)	+fort	+fort	+
CD5	+	-/+	-	-/(+)	-	+	-
CD23	+	-/+	-	-	-	-	-/+
CD10	-	-	+	-	-/(+)	-/+	-
CD103	-	-	-	-/(+)	+	-	-
CD25	-/(+)	-/(+)	-	±	+fort	-	-
CD11c	-/+faible	-	-	+/-	+fort	-	-/+
FMC7	-	-	+/-	+	+	+/(-)	-
slg	+faible	+fort	+fort	+	+	+fort	+modéré

Tableau 1: Immunophénotype des syndromes lymphoprolifératifs B.

+ : >90% des cas, +/- : >50% des cas, +/- : <50% des cas, - : <10% des cas. Intensité d'expression : faible, modérée, forte

LLC: leucémie lymphoïde chronique; LP-B: leucémie proliférative B; LF: lymphome folliculaire; LZMS: lymphome de la zone marginale splénique; LZM: lymphome de la zone marginale; LTL: leucémie à tricholeucocytes; MCL: lymphome de manteau; LLP: lymphome lymphoplasmocytaire.

Indications à l'immunophénotypisation

L'immunophénotypisation des lymphocytes est indiquée pour évaluer une lymphocytose d'origine indéterminée, pour rechercher une néoplasie lymphoproliférative B ou T dans le sang ou la moelle osseuse, notamment en présence d'adénopathies, de splénomégalie ou de cytopénie(s), pour distinguer une lymphocytose ou une hyperplasie lymphoïde réactionnelle d'un lymphome malin, pour distinguer un lymphome malin d'une leucémie aiguë, pour sous-classifier les néoplasies lymphoproliférative B (par exemple la leucémie lymphoïde chronique, le lymphome du manteau ou la leucémie à tricholeucocytes) ou T, pour rechercher des plasmocytes monoclonaux (myélome), ou encore pour évaluer la maladie résiduelle d'un lymphome traité.

Toutes les lymphocytoses malignes sont clonales, mais toutes les expansions clonales ne sont pas malignes; certaines causes infectieuses ou inflammatoires de lymphocytose peuvent être associées à une expansion oligoclonale des lymphocytes (par exemple, deux à cinq clones distincts de faible abondance). Inversement, les troubles pré-malins (par exemple, la lymphocytose monoclonale B) ou les stades précoces de certaines leucémies peuvent présenter seulement de faibles niveaux de lymphocytes clonaux parmi une plus grande population de lymphocytes polyclonaux normaux; dans de tels cas, le diagnostic peut n'être révélé qu'avec un suivi (p. ex., observation clinique, suivi de la formule sanguine et/ou répétition de la cytométrie en flux ou des tests moléculaires).

Référence

- 1) Craig FE and Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008;111:3941-3967

Personne de contact

Dr Pierre-Yves Lovey

pyves.lovey@hopitalvs.ch

Immunphänotypisierung durch Durchflusszytometrie der Lymphozytosen und lymphatischen Neoplasien

J. Lovey, M.-J. Menétray, P.-Y. Lovey, Zentralinstitut der Spitäler, Spital Wallis, Sitten

Bei den malignen Lymphomen ist die Klassifikation der WHO von enormer klinischer Bedeutung. Sie basiert auf der Morphologie, dem Immunphänotyp, den genetischen Anomalien und den klinischen Elementen. Den Immunphänotyp erhält man mittels Immunhistochemie und/oder Durchflusszytometrie (DZ).

Die DZ ermöglicht die Analyse der Eigenschaften der Morphologie und der Fluoreszenz einer Zellsuspension, die aus peripherem Blut, einer Knochenmarksabsaugung, einer Suspension von Ganglienzellen oder splenogenen Zellen, aus Liquor, aus der Flüssigkeit eines Pleuraergusses oder eines Aszites stammt.

Technik und Analyse

Die Leukozyten werden isoliert, suspendiert und anschliessend mit an Fluorochrome gebundenen monoklonalen Antikörpern markiert (klassiert entsprechend der Zugehörigkeit des Antigens, das sie an einem Differenzierungscluster (CD) erkennen). Im Zytometer werden die markierten Zellen durch eine laminare Strömung einzeln hintereinander durch die Messkammer geführt. Dabei werden sie von mehreren Lasern angestrahlt. Die Analyse des Winkels des Streulichts des Lasers ermöglicht die Unterscheidung der Zellen (Abbildung 1) anhand ihrer Grösse (Brechung in Richtung des Laserstrahls: forward-angle light scatter -FS) und ihrer Zellkomplexität (Brechung in einem gewissen Winkel des Laserstrahls: side-angle light scatter-SC). Das von den an die Antikörper gebundenen Fluorochromen ausgestrahlte Licht wird nach ihrer Erregung und Rückkehr in den Ruhezustand auf verschiedenen Fotomultipliern gesammelt. Dies erfolgt mittels eines Sets von Filtern und Spiegeln. Die anschliessende Analyse erfolgt durch das Informatiksystem. Die Intensität der Fluoreszenz zeigt die antigene Dichte an. Die erhaltenen Informationen werden in Form von zweidimensionalen Diagrammen dargestellt.

Mit der Gegenüberstellung der verschiedenen Informationen kann man:

- die gewünschten Populationen isolieren (Gating). Beispiel: Lymphozyten: FSschwach, SSSchwach (Abbildung 1)

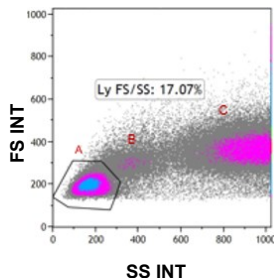


Abbildung 1: Unterscheidung der verschiedenen Leukozytenpopulationen auf dem Diagramm FS/SS und Gating der Lymphozyten. A. Lymphozyten, B. Monozyten, C. Neutrophile

- die Anwesenheit oder Abwesenheit sowie die Dichte der gesuchten Antigene auf der Oberfläche oder innerhalb des Zytoplasmas der analysierten Zellen feststellen (Abbildungen 2, 3 und 4).

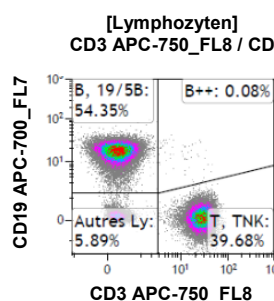


Abbildung 2: Analyse der Expression spezifischer Antigene der Lymphozyten T und B durch die Marker CD3, beziehungsweise CD19: Verhältnis B/T = 40/54, ungewöhnlich umgekehrt

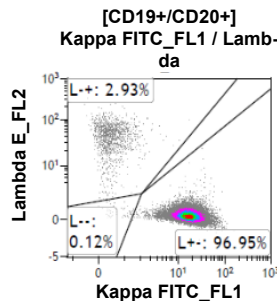


Abbildung 3: Analyse der Leichtketten Kappa und Lambda auf der Oberfläche der Lymphozyten B CD19+: Verhältnis Kappa/Lambda = 97/3 anomal, Indikativ einer Monoklonie

Eine erste Gruppe von «getesteten» Antikörpern ermöglicht die Evaluation verschiedener lymphozytärer Populationen, die normalerweise anwesend sind (Abbildung 2). Wenn Anomalien nachgewiesen werden (z.B. Ungleichgewicht des Verhältnisses von Lymphozyten B und T, erhöhte Expression einer der 2 Leichtketten (Verhältnis Kappa/Lambda >4.0 oder <0.25) (Abbildung 3)), ermöglichen die Tests der «2. Reihe» eine verfeinerte Diagnose (Abbildung 4).

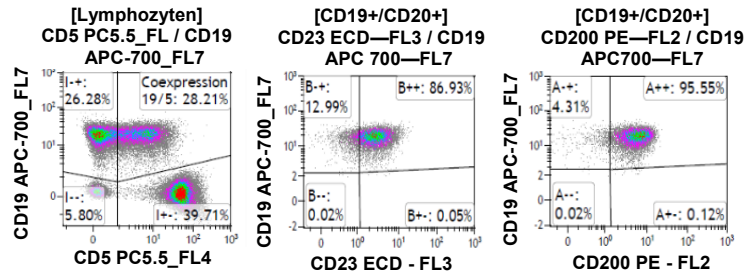


Abbildung 4: chronische lymphatische Leukämie B Kappa. A. Abweichende Koexpression des Lymphozytenmarkers T CD5. B. Expression des CD23. C. Expression des Markers CD200.

Die lymphomatischen Zellen B drücken auf ihrer Oberfläche häufig Antigene aus (CD), die nicht zu ihrer Zellreihe gehören, oder Marker, die nicht ihrem Differenzierungsstadium entsprechen. Dies ist zum Beispiel der Fall bei der Koexpression des Lymphozytenmarkers T CD5 bei der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) (Abb. 4). Diese besondere Kombination von Antigenen und der Expressionsintensität gewisser Marker (Tabelle 1) ermöglicht eine präzise Diagnose und erklärt die zentrale Rolle der DZ bei der Klassifikation der B-Lymphome.

	LLC	LP-B	LF	LZMS/LZM	LTl	MCL	LLP
CD19	+	+	+	+	+	+	+
CD20	+/faible	+fort	+fort	+(-)	+fort	+fort	+
CD5	+	-/+	-	-/(+)	-	+	-
CD23	+	-/+	-	-	-	-	-/+
CD10	-	-	+	-	-/(+)	-/+	-
CD103	-	-	-	-/(+)	+	-	-
CD25	-/(+)	-/(+)	-	+	+fort	-	-
CD11c	-/+faible	-	-	+/-	+fort	-	-/+
FMC7	-	-	+/-	+	+	+/(+)	-
slg	+faible	+fort	+fort	+	+	+fort	+modéré

Tabelle 1: Immunphänotyp der lymphoproliferativen Syndrome B.

+: >90 % der Fälle, +/-: >50 % der Fälle, -/+ : <50 % der Fälle, -: <10 % der Fälle. Intensität der Expression: schwach, mässig, stark

CLL: chronische lymphatische Leukämie; PLL-B: Polylmphozytenleukämie B; FL: follikuläres Lymphom; SMZL: splenisches Marginalzonenlymphom; MZL: Marginalzonenlymphom; TLL: Tricholeukozyten-Leukämie; MCL: Mantelzell-Lymphom; LPL: lymphoplasmocytisches Lymphom.

Indikationen für die Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung der Lymphozyten ist indiziert, um eine Lymphozytose unbestimmten Ursprungs zu evaluieren, um eine lymphoproliferative Neoplasie B oder T im Blut oder im Knochenmark nachzuweisen, insbesondere in Anwesenheit von Adenopathien, einer Splenomegalie oder Zytopenie, um eine Lymphozytose oder eine reaktive lymphatische Hyperplasie eines malignen Lymphoms zu erkennen, um ein malignes Lymphom von einer akuten Leukämie zu unterscheiden, um eine Unterklassifizierung der lymphoproliferativen Neoplasien B oder T zu erstellen (zum Beispiel die chronische lymphatische Leukämie, das Mantelzell-Lymphom oder die Tricholeukozyten-Leukämie), um monoklonale Plasmazellen nachzuweisen oder um die Resterkrankung eines behandelten Lymphoms zu evaluieren.

Alle malignen Lymphozytosen sind klonal, aber nicht alle klonalen Expansionen sind maligne: Gewisse infektiöse oder inflammatorische Ursachen einer Lymphozytose können mit einer oligoklonalen Expansion der Lymphozyten verbunden sein (zum Beispiel zwei bis fünf unterschiedliche Klone mit geringer Häufigkeit). Umgekehrt können prä-maligne Beschwerden (zum Beispiel monoklonale Lymphozytose B) oder frühe Stadien gewisser Leukämien nur einen geringen Anteil von klonalen Lymphozyten innerhalb einer grösseren Population von normalen polyklonalen Lymphozyten aufweisen. In solchen Fällen kann die Diagnose nur mit einer Überwachung erstellt werden (z.B. klinische Beobachtung, Überwachung des Blutbilds und/oder Wiederholung der Durchflusszytometrie oder der molekularen Tests).

Literatur

- 1) Craig FE and Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood. 2008;111:3941-3967

Kontaktperson

Dr. med. Pierre-Yves Lovey

pyves.lovey@hopitalvs.ch

www.hopitalvs.ch
www.spitalvs.ch