

Immunophénotypage : technique et applications en biologie

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) permet d'étudier à haut débit, par immunofluorescence, toute préparation cellulaire en suspension et en premier lieu le sang.

Les antigènes exprimés par une cellule (« CD » : *Cluster of Differentiation*) permettent de la caractériser à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes. Certaines structures cellulaires peuvent également être mises en évidence directement, sans anticorps.

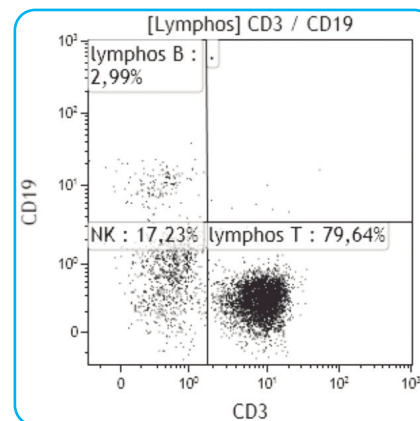
Aspects technologiques

L'immunophénotypage est le plus souvent réalisé sur un prélèvement sanguin mais peut l'être également sur de la moelle osseuse, des liquides d'épanchements divers, du LCR, ou sur toute suspension cellulaire, sous réserve des contraintes de conservation des cellules dans ces divers milieux.

L'échantillon est mis en contact avec un panel d'anticorps adapté à la pathologie recherchée, marqués par des fluorochromes. Différentes étapes de lyse des hématies, de perméabilisation peuvent être mises en œuvre. Le cytomètre dispose d'un système de fluidique permettant l'alignement des cellules dans un liquide de gaine, et leur passage une par une devant des lasers et des détecteurs de fluorescence (photomultiplicateurs). Classiquement, quelques dizaines à quelques centaines de milliers de cellules sont analysées pour chaque échantillon.

Les cytomètres actuels de routine permettent de détecter jusqu'à 10 fluorescences ou « couleurs » différentes, auxquelles s'ajoutent la taille et la structure pour chaque cellule analysée.

Des logiciels permettent l'exploitation de ces nombreuses données sous formes de graphiques ou cytogrammes représentant l'intensité de fluorescence des cellules pour chaque paramètre. Les profils d'expressions permettent l'identification des sous-populations cellulaires d'intérêt.



Exemple d'un cytogramme conditionné sur les lymphocytes : les cellules B sont CD19+ et CD3- ; les cellules T sont CD3+ et CD19- ; les cellules NK sont CD19- et CD3-.

Applications en immunologie

La quantification des sous-populations lymphocytaires sanguines permet d'explorer l'immunité cellulaire, avec un décompte des cellules B (CD19+), T (CD3+), et NK (CD16+ et/ou CD56+).

Au sein des cellules T, peuvent être distingués les *T helpers* CD4+ (en particulier dans le suivi des patients séropositifs pour le VIH) et les *T cytotoxiques* CD8+.

La cytométrie en flux est également utilisée en allergologie pour l'étude de l'activation des polynucléaires basophiles en présence d'un allergène donné.

D'autres applications très spécialisées existent en immunologie (lymphocytes T régulateurs, activation des monocytes...).

Applications en hématologie maligne

L'immunophénotypage est un élément clé du diagnostic des hémopathies malignes, en particulier pour les syndromes lymphoprolifératifs et les leucémies aiguës. Il s'articule dans une démarche multi-disciplinaire avec la cytologie, la cytogénétique, la biologie moléculaire, l'anatomo-cyto-pathologie...

Applications diagnostiques

Syndromes lymphoprolifératifs B :

La clonalité des cellules B est mise en évidence par un déséquilibre du ratio d'expression des chaînes légères d'immunoglobulines kappa et lambda (normalement de 2/3 kappa pour 1/3 lambda).

Certaines expressions spécifiques orientent le diagnostic : CD10+ dans les lymphomes folliculaires, CD5+ dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome du manteau, triple expression de CD103, CD11c et CD25 dans la leucémie à tricho-leucocytes...

Le diagnostic de la LLC repose sur le calcul du score de Matutes ou de Moreau :

1 point	0 point
Chaîne légère faible ou négative en surface	Chaîne légère d'intensité normale
CD5+	CD5-
CD23+	CD23-
FCM7-	FMC7+
CD79a (Moreau) ou CD22 (Matutes) : - ou faible	CD79a+ ou CD22+

Un score élevé (4/5 ou 5/5) correspond à une LLC, les autres syndromes lymphoprolifératifs ayant un score inférieur ou égal à 3/5.

Syndromes lymphoprolifératifs T et NK :

Le diagnostic de ces pathologies est plus complexe et nécessairement multi-disciplinaire. La clonalité des cellules T peut être appréhendée en CMF par l'étude du répertoire V-beta du TCR, à la recherche de l'utilisation sélective d'une sous-famille. La perte d'expression d'un antigène pan-T ou « trou phénotypique » est également un argument en faveur de la malignité.

Leucémies aiguës :

La CMF permet de confirmer la nature blastique des cellules par l'expression de marqueurs d'immatunité, et de déterminer leur lignée : lymphoïde B, T, ou myéloïde, dont va dépendre la prise en charge thérapeutique. C'est également une technique cruciale pour le diagnostic de certaines entités rares (leucémie à cellules dendritiques, biphénotypique, peu différenciée...).

	Marqueurs principaux
Lignée lymphoïde B	CD19, CD20, CD22, chaînes d'immunoglobulines lourdes et légères
Lignée lymphoïdes T (et NK)	CD3, CD5, CD2, CD7, CD4/CD8, TCR (CD16, CD56)
Lignées myéloïdes	MPO, CD13, CD33, CD117
Marqueurs d'immatunité	CD34, CD45 faible, CD38, HLA-DR

Autres hémopathies :

La dyshématopoïèse peut être mise en évidence par des profils d'expressions qui diffèrent des cellules normales. L'immunophénotypage est en plein développement dans le domaine des syndromes myélodysplasiques, avec l'essor de l'analyse multi-paramétrique et l'apparition d'innovations informatiques permettant l'analyse de ces données complexes. Dans le contexte du myélome, la CMF permet d'identifier les plasmocytes pathologiques (leur proportion est un élément du diagnostic différentiel entre myélome et MGUS) et d'établir leur clonalité.

Il est à noter que la cytométrie en flux n'est pas utile au diagnostic des néoplasies myéloprolifératives.

Suivi, évaluation de la réponse au traitement

Dans les leucémies aiguës lymphoïdes, la persistance de cellules malignes après traitement (maladie résiduelle ou MRD : *minimal residual disease*) est un facteur de risque de rechute. La sensibilité de la cytométrie est généralement équivalente à celle de la biologie moléculaire, jusqu'à 10⁻⁵ cellule. Ces applications sont néanmoins réservées aux protocoles cliniques et nécessitent une prise en charge technique du prélèvement particulière et sans délai.

Dans le contexte des syndromes lymphoprolifératifs, la sensibilité en suivi est de l'ordre de 0.1 à 1% (10⁻³ à 10⁻²) et l'indication de cet examen doit être posée selon les recommandations particulières à chaque pathologie.

Autres applications en hématologie

- Evaluation de la réponse aux anti-agrégants de la famille des thiényridines (clopidogrel, ticlopidine) par l'étude de la phosphorylation de la protéine VASP.
- Diagnostic de la sphérocytose héréditaire ou maladie de Minkovski-Chauffard : le test à l'EMA (éosine 5'maléimide) permet un screening rapide, sensible et spécifique des patients en amont de tests comme l'ektacytométrie.
- Recherche d'un clone « HPN » (hémoglobinurie paroxystique nocturne) : perte d'expression d'antigènes dépendants d'une ancre GPI (glycosyl-phosphatidylinositol), comme CD55 et CD59 et d'autres marqueurs, sur les hématies et/ou les leucocytes.
- Diagnostic d'une hémorragie foeto-maternelle : il existe en CMF des équivalents du test de Kleihauer (recherche d'hématies fœtales dans le sang maternel).



En pratique...

Examen	Cotation	Marqueurs testés
T4 T8	B80	CD45, CD3, CD4, CD8
Lymphocytes B CD19+	HN	CD45, CD19
Lymphocytes NK	HN	CD45, CD16, CD56
Phénotypage à la recherche d'une hémopathie maligne	B300	Par défaut : panel complet « lymphoïde » : étude des sous-populations B, T et NK, clonalité des cellules B (kappa/lambda), recherches d'atypies phénotypiques des cellules T (CD4/CD8, trous phénotypiques) En cas d'indications particulières : Recherche et caractérisation des blastes pour les leucémies aiguës Caractérisation des plasmocytes dans le contexte du myélome (sur moelle osseuse uniquement)

Joindre aux tubes :

- dans tous les cas, le résultat de la dernière numération formule sanguine :**
 pour le calcul du taux en valeur absolue de CD4 et des autres sous-populations lymphocytaires pour l'interprétation biologique et la quantification du clone dans le contexte des hémopathies malignes.
- pour les typages complets :**
 - renseignements cliniques :** contexte dysimmunitaire ? hémopathie connue ? traitée ? suivi d'un traitement par Tysabri* ou Rituximab* ? ...
 - diagnostic suspecté :** permet de choisir les marqueurs les plus pertinents,
 - lames non colorées pour l'examen cytologique,** souvent indispensable au diagnostic.

L'immunophénotypage analysant des cellules fraîches, les échantillons doivent être acheminés le plus rapidement possible et à température ambiante.

NB : Il existe un bon de demande spécifique aux hémopathies malignes disponible sur www.biomnis.com > analyses > bons de demande - attestations - autres documents pratiques.

Lauren Rigollet, département cytologie et immunophénotypage
 Biomnis

