Etude prospective et comparative entre l'étude cytologique couplé à la Cytométrie en Flux par ponction aspiration à l'aiguille fine et l'histologie

dans le diagnostic et la classification des lymphomes à grandes cellules B

S.E Belakehal¹, M.R Abbadi¹, M Kacimi², F.Z Ardjoun¹.

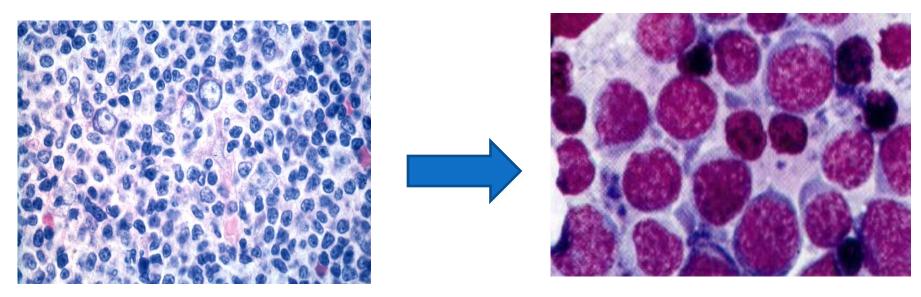
(1) Service d'Hématologie;

(2) Service d'Anatomo-pathologie

Hôpital Central de L'Armée Dr Med Seghir Nekkache

Définition des LGCDB

- Une prolifération Monoclonale de cellules lymphoïdes de grande taille de Phénotype B (CD20)
- Secondaires: LNH indolent (LF, LLC...)
- De novo: diagnostiqués sur une biopsie le plus souvent ganglionnaire, sans ATCD de LNH



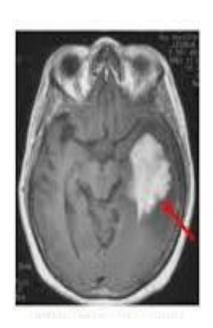
Localisations primitives des LGCDB

Atteignent

- Ganglions (nodulaires) : 60 % des cas
- Organes non lymphoïdes (tube digestif, os, cerveau, peau...): 40 %



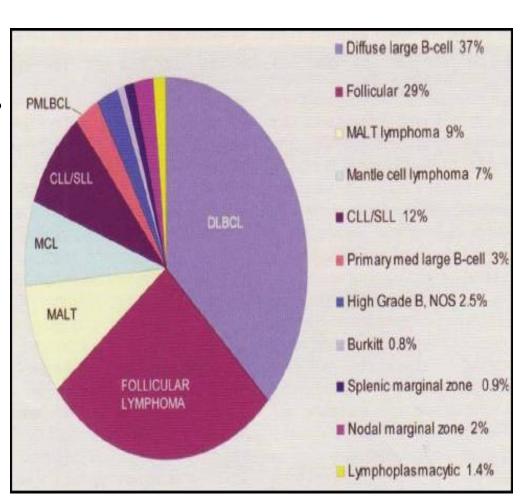






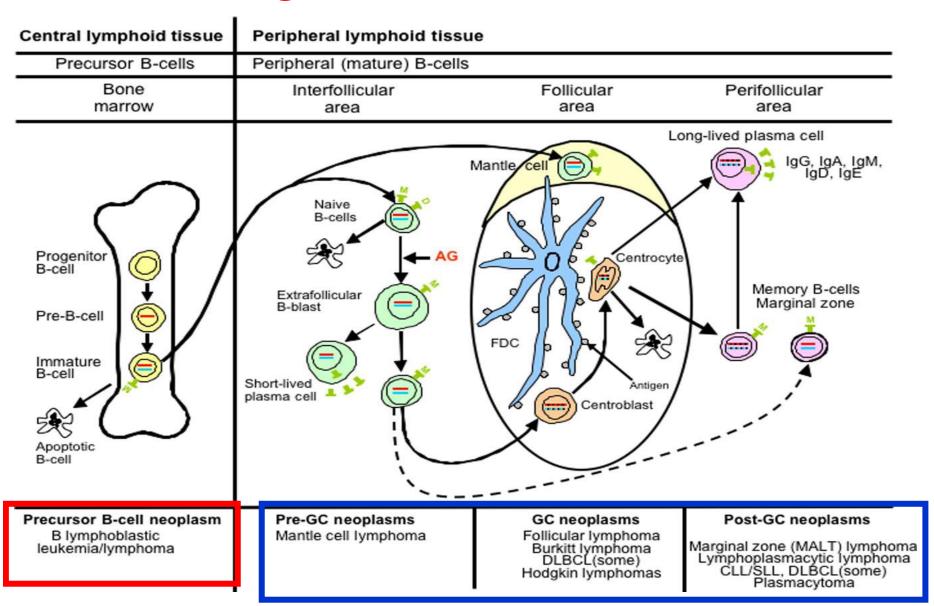
Incidence LGCDB

- Plus de 300 000 nouveaux cas par an sont détectés dans le monde.
- ➤ 1^{er} cancer chez l'adolescent et le jeune adulte.
- LNH de l'adulte



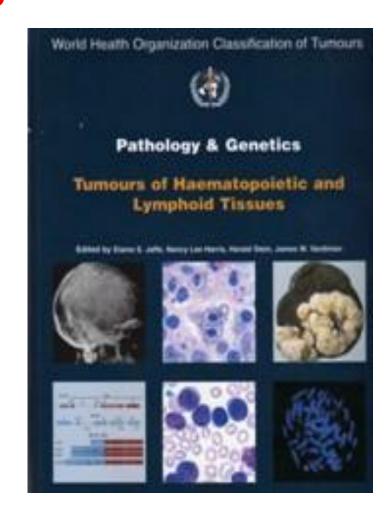
Gurbaxani et al. Arch Pathol Lab Med, 2009 Molina TJ, Revue du Praticien 2015, Dossier LGCDB

Origine cellulaire des LGCDB



Classification OMS, 2008

- Précurseurs B : lymphome/leucémie lymphoblastique
- Lymphomes B matures
 - Point de départ : Morphologique
 - Etude immunophénotypique
 - Etude cytogénétique
 - Etude moléculaire



(Jaffe S et al, IARC Press, 2001) (Jaffe S et al, Blood, 2008)

Les Changements: Classification OMS, 2016

Entity	
DLBCL, NOS	Distinction of GCB vs ABC/non-GC Consideration of MYC + BCL2 double expressor
High grade B-cell lymphoma with MYC, BCL2 and/or BCL6 translocations	Double or triple hit
High grade B-cell lymphoma, NOS	Replaces BCLU (WHO 2008) Blastoid large cells, no translocation
EBV+ DLBCL, NOS	May occur in young patients
Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement	Pediatric, localized cervical or Waldeyer

Remaining: Primary mediastinal large B-cell lymphoma, DLBCL of the CNS, ...

Swerdlow SH et al. Blood 2016-01-643569

Double hit lymphomas Activated B-cell like GC B-cell like **BCL2** expression BCL2-R **Double Double** hit expression **MYC MYC-R** expression Adapted from K Dunleavy

RECOMMANDATIONS POUR LE DIAGNOSTIC DE LGCDB ESMO Guidelines 2015

- ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE

Nécessité d'un prélèvement de bonne qualité

ANALYSE IHC

- CD20, CD5, CD30, Ki-67, IRF4, Cyclin D1
- MYC, BCL2
- EBER-1

ORIGINE CELLULAIRE (GC versus ABC)

- IHC Hans (CD10, BCL-6, MUM1)
- Etude du profil d'expression des gènes

- FISH

• Rearrangements: MYC, BCL-2, BCL-6

MÉTHODES DE DIAGNOSTIC (ALGERIE)

ANATOMOPATHOLOGIE : Tissus ganglionnaire ou extra ganglionnaire

- IMMUNOPHÉNOTYPAGE :

- Immunohistochimie (sur coupe)
 - Laboratoires d'anatomopathologie : marqueurs le plus souvent utilisés CD20, CD79a, CD3
- CMF (suspensions ganglionnaires ou extra-ganglionnaires)
 - Services d'hématologie
- ETUDE CYTOGÉNÉTIQUE: rarement pratiquée

Problématique LNH B à grandes cellules

ÉTUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE

- Problème :
 - Maladie de Hodgkin,
 - métastases de carcinome
- Problème : Distinction entre B et T/NK
- IMMUNOPHÉNOTYPAGE en complément à la morphologie : indispensable
 - Immunohistochimie (sur coupe) et/ ou
 - Cytométrie en flux (CMF)

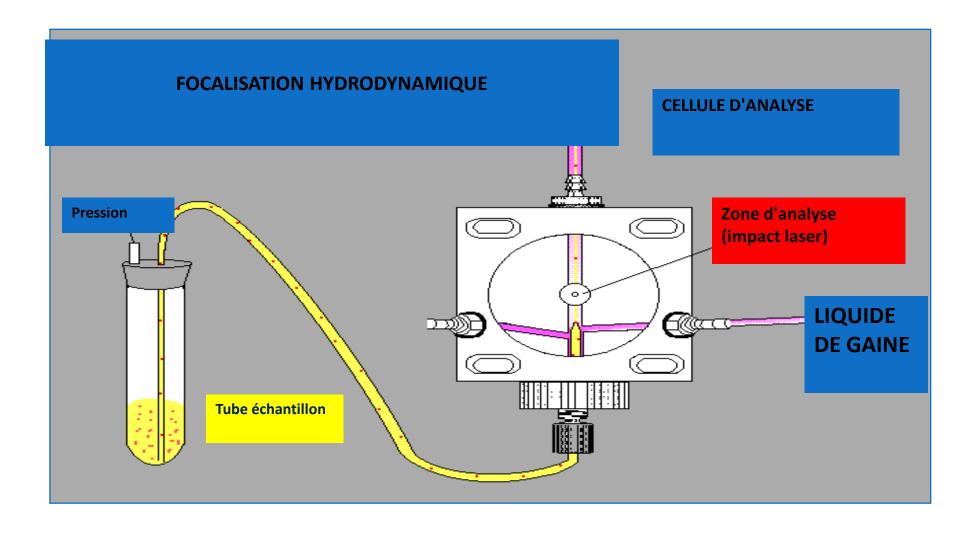
OBJECTIF DE CE TRAVAIL

- Evaluation de la technique par
- « Ponction-aspiration à l'aiguille fine pour étude cytologique couplée à la CMF »
- et <u>l'étude de la corrélation</u>
 (sensibilité et la spécificité) avec la technique de référence, qu'est « l'histologie » dans le diagnostic et la classification des Lymphomes non Hodgkiniens ganglionnaires et extraganglionnaires à grandes cellules B



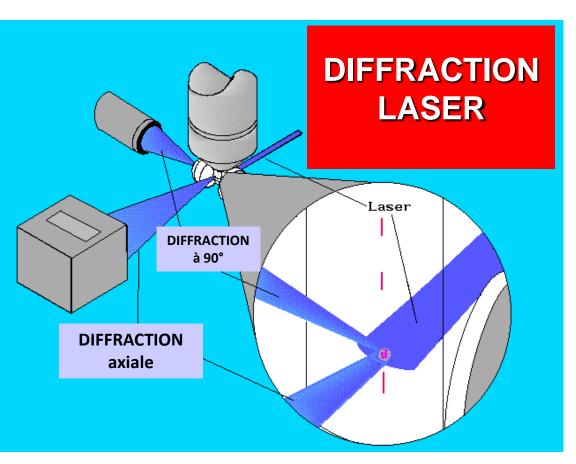


CYTOMÉTRIE EN FLUX



• Analyse des cellules en suspension, entraînées par un flux liquide, en les faisant défiler une par une devant un faisceau laser

Chaque cellule passant devant le faisceau laser va diffracter de la lumière laser et l'on mesure :



dans l'axe : image de la taille des cellules (FSC)

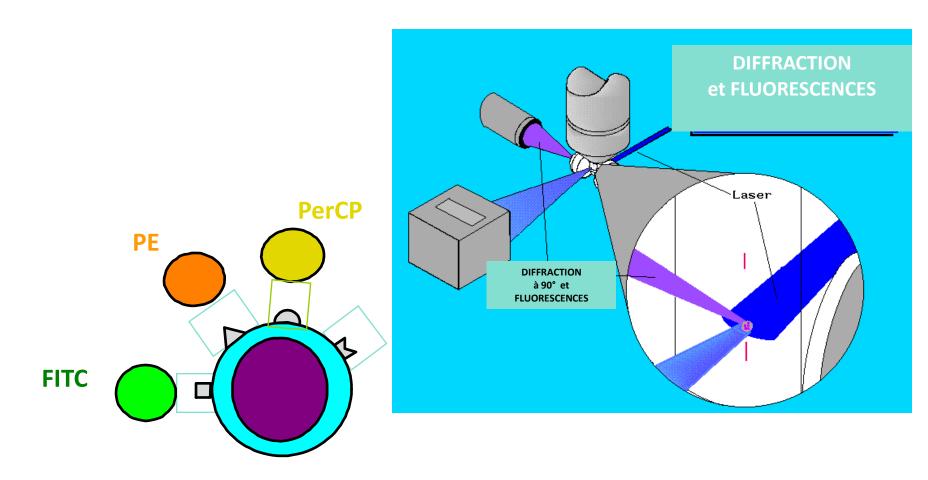
à 90°: image de la structure des cellules (SSC)

FLUORESCENCE

Les cellules analysées ne sont pas spontanément fluorescentes

- Traitement préalable = marquage cellulaire
- Colorants fluorescents qui se fixent sur certains constituants cellulaires et les rendent fluorescents. Ex: FITC, PE, PerCP
- Ac rendus fluorescents par couplage à un fluorochrome

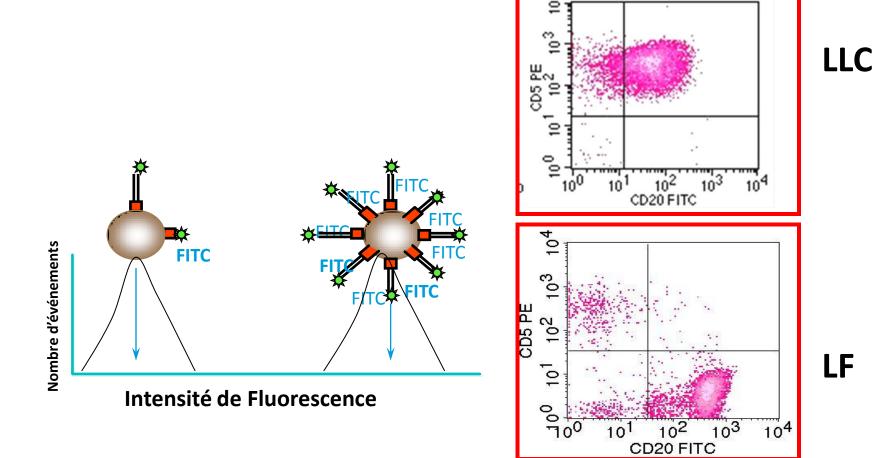
DIFFRACTION ET FLUORESCENCE



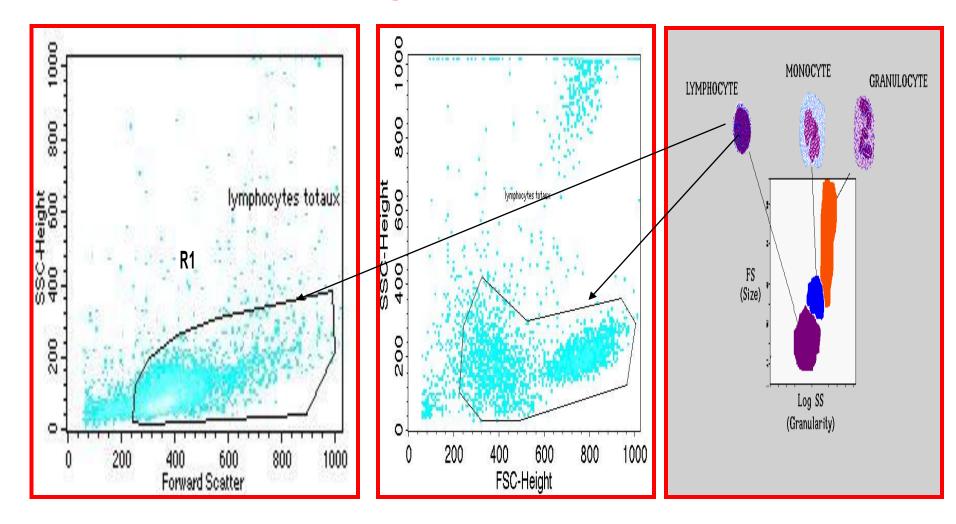
Chaque événement passant devant le faisceau laser peut aussi émettre de la fluorescence, qui sera mesurée à 90°

INTENSITÉ DE FLUORESCENCE

Proportionnelle à la charge antigénique



Les Signaux Mesurés



TISSUS GANGLION ou EXTRA GG

SANG

MATERIEL ET METHODES

POPULATION D'ETUDE

- <u>Patients</u>: Adénopathie (ADNP) et /ou localisation extra ganglionnaire pour suspicion de Lymphome malin
- Type d'étude : Stratégie diagnostique : étude de 134 prélèvements
- Durée : 6 ans [janvier 2010 à décembre 2015]

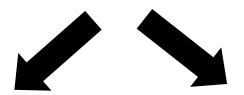
MATÉRIELS ET MÉTHODES SÉLECTION DES CAS (1)

[janvier 2010 à décembre 2015] n = 134 prélèvements						
Diagnostic		Rechute				
95 adénopathies	 26 prélèvements extra ganglionnaires 17 liquides pleuraux, 3 liquides d'ascite, 4 masses cutanées, 1 masse sternale, 1 LBA 	12 adénopathies	1 prélèvement extra ganglionnaire1 liquide d'ascite			

Ponction-aspiration à l'aiguille fine pour étude cytologique couplée à la CMF (1)

n = 134 prélèvements

n = 37 prélèvements en faveur LCDB



n = 33

Adénopathies

Prélèvements extra-gg

n = 4

- 1. Etude cytologique (Adénogramme et/ou PEG)
- 2. Étude anatomopathologique et IHC = 31 cas

Technique: Ponction-aspiration à l'aiguille fine pour étude cytologique couplée à la CMF (2)

Localisation de l'ADNP et/ou PEG (cutané, épanchement pleural...)

Première ponction : Aiguille verte : 22-23 Gauges;

Suspension ganglionnaire : 1-2 Frottis (MGG) + Étude cytologique (Richesse et Panel)

Reste de la suspension : Tube EDTA avec 2 à 3 ml **PBS**

Numération: Faible: 2 ponctions gg

Marquage: [10 μl Ac conjugué + 100 μl de suspension]

Incubation + Lyse + 2 lavages + re-suspend la suspension (500 μl PBS)

Acquisition: 10 000 à 50 000 évènements

Analyse: Cell Quest pro,

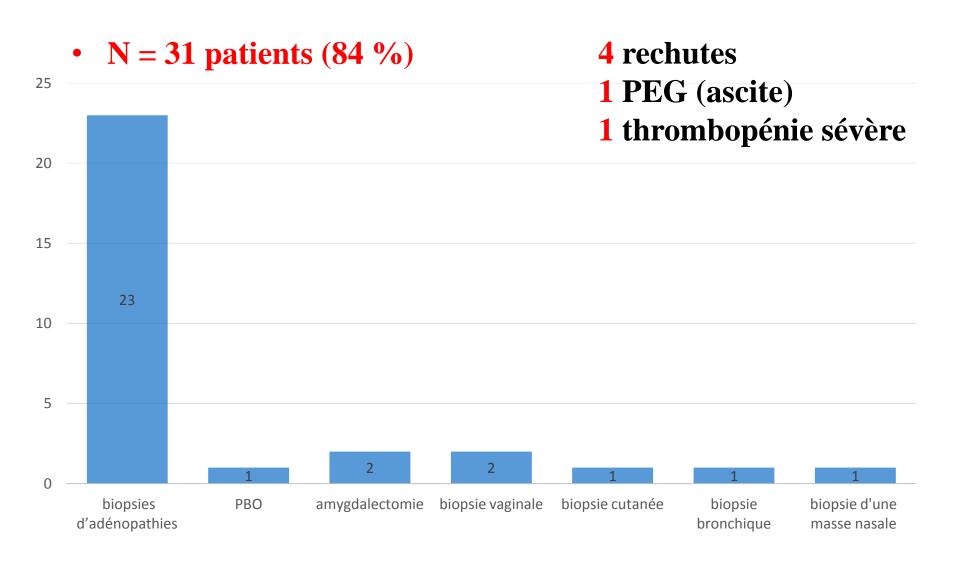
– Durée : 3 heures : " Orientation "





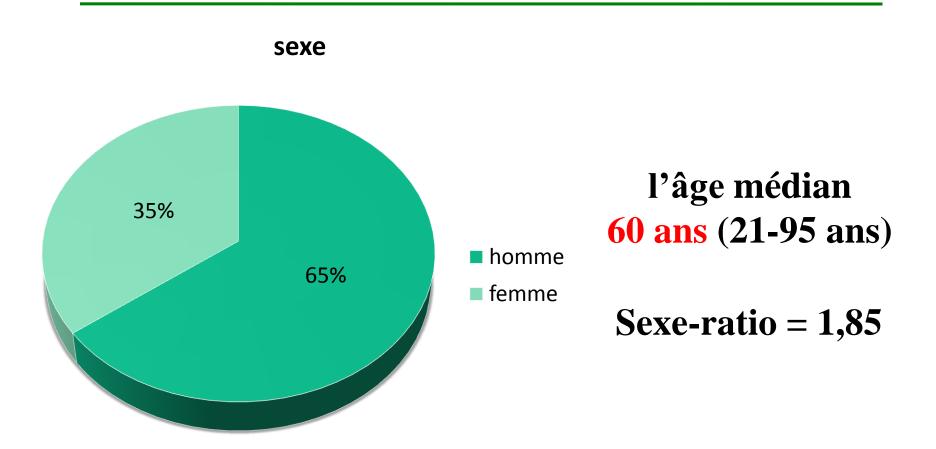


ÉTUDE HISTOLOGIQUE ET IHC



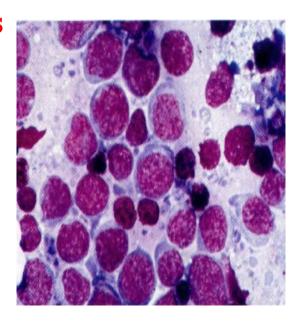
RÉSULTATS

RÉSULTATS AGE ET SEXE



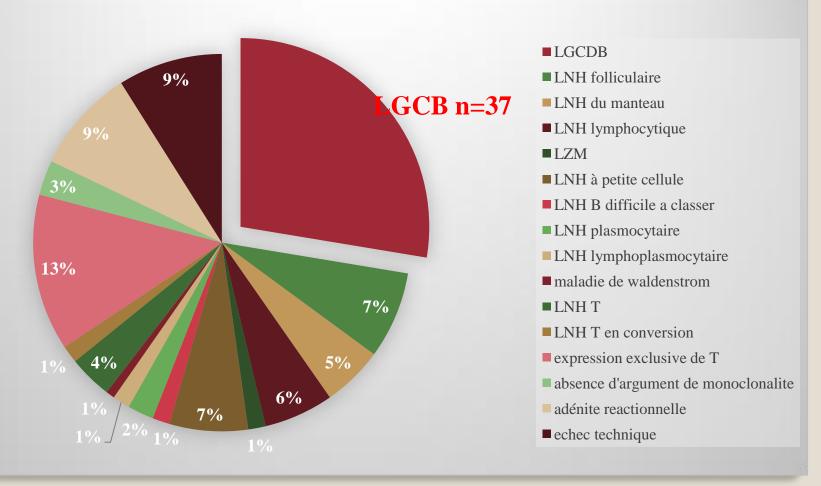
RÉSULTATS ÉTUDE CYTOLOGIQUE n = 37

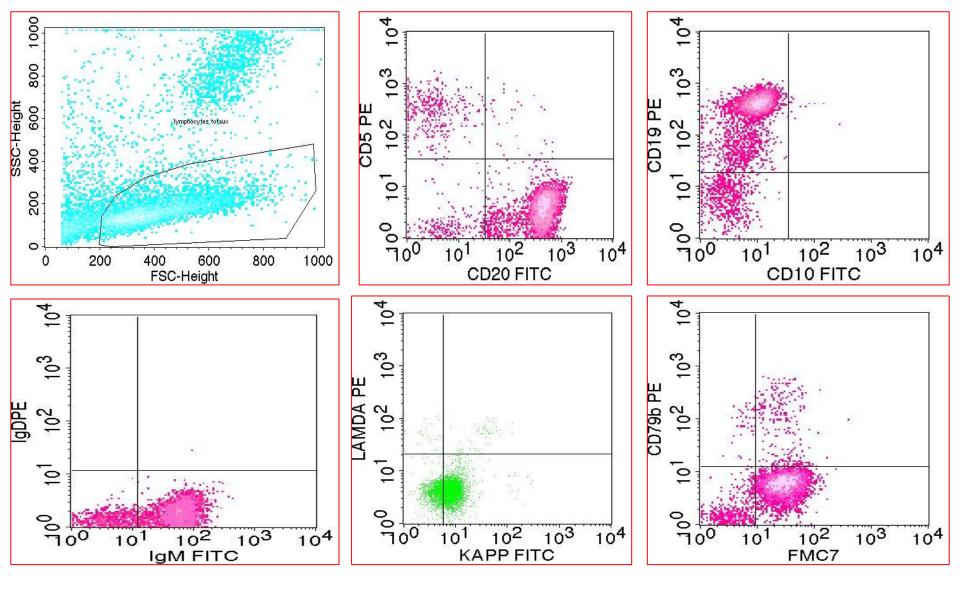
- Aspect monomorphe: sur 30 prélèvements avec cellules de grandes tailles de 15 à 20 ù de diamètre
- Aspect polymorphe: sur 7 prélèvements incluant
 - des lymphocytes de petites taille d'aspect mature
 - des lymphocytes de grandes tailles de 15
 à 20 ù de diamètre
- Dans 50 % des cas : On a noté la présence de noyaux nus nucléolés.



RESULTATS CMF

fréquence des LNH par technique de CMF couplée à la cytoponction





Prolifération ganglionnaire lymphomateuse à grandes cellules CD20+ /CD19+/FMC7+ /Kappa + /IgM +/ CD5 - /CD10 - / Évoquant un LGCB

Etude anapath : LGCDB CD20+

RESULTATS de la CMF n = 37

- La numération moyenne en lymphocytes par ponction = 900 elt/mm³ (200 -1800 elt/mm³)
- Les marqueurs :
 - CD20; CD22 positifs: 100% des cas
 - CD79b positifs : **80%**
 - CD5 positif: 45% avec faible expression.
 - Le CD23 et CD10 négatifs : 90% des cas.
 - La restriction isotypique de type lambda : 83%
- o le diagnostique de Lymphome B à Grandes Cellules
 - de novo : 31 patients
 - lors de la rechute : 6 patients

RESULTATS

ÉTUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE ET IHC n = 31

- Sur les 31 cas:
 - le diagnostic de LGCDB : 26 cas (83%)
 - Le diagnostic de LNH à petites cellules : 3 cas
 - Le diagnostic d'adénocarcinome : 1 cas
 - Le diagnostic d'adénite réactionnelle : 1 cas
- Les marquers utilisés en immunohistochimie
 - CD20, CD79a et CD3 dans 100% des cas.

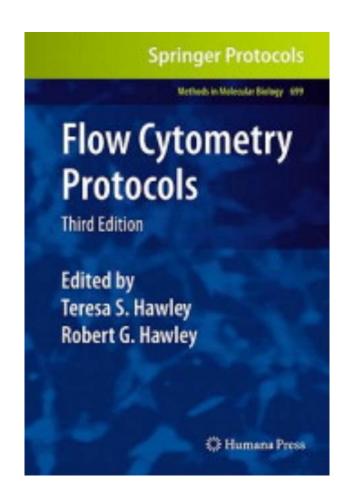
CRITÈRES DIAGNOSTICS IMMUNOPHÉNOTYPIQUES

Teresa S. Hawley and Robert G. Hawley (eds.), Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 699, 2011

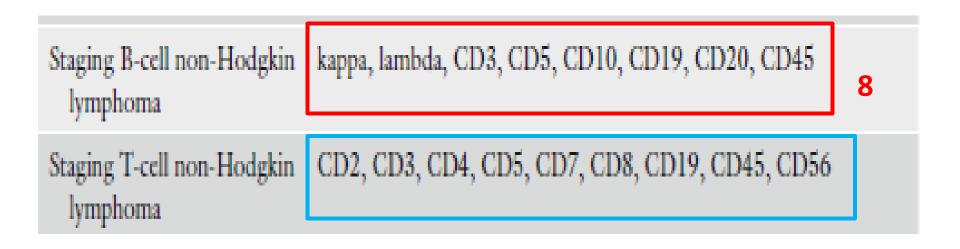
- LNH- B : Restriction aux chaînes légères et/ou CD20 > 85%
- Le seuil de positivité = 20%
- L'intensité de la fluorescence :

faible: 10^1 et 10^2 / moyenne: 10^2 et 10^3 /

forte : $> 10^3$



LE PANEL MINIMUM D'ANTICORPS POUR LE DIAGNOSTIC DES LMNH?



Teresa S. Hawley and Robert G. Hawley (eds.), Flow Cytometry Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 699, 2011

ETUDE DE LA CORRÉLATION (1)

	HISTOLOGIE	+		
CMF	+	VP = 26	$\mathbf{FP} = 5$	31
	<u> </u>	FN = 0	VN = 0	0
TOTAL		26	5	31

- CORRÉLATION: 84%

- FAUX POSITIFS : 2 cas

-AUTRES TYPES HISTOLOGIQUES: 3 cas

ETUDE DE LA CORRÉLATION (2)

- La discordance entre [la CMF et l'histologie] était retrouvée dans : 5 cas sur 31 LGCDB :
- 3 LNH à petites cellules :
 - 1^{er} cas : LNH du manteau qui pose un problème de diagnostic différentiel avec LGCDB, malheureusement la cycline D1 n'a pas été testée en CMF.
 - les deux autres LNH : l'histologie n'a pas pu préciser le sous type histologique.
- 1 <u>adénite réactionnelle</u>: les cellules lymphoïdes marquées le CD20, avec de grandes cellules à la cytologie ce qui nous a orienté vers un lymphome à grandes cellules.
- 1 <u>adénocarcinome</u>: le CD20 était positif de faible intensité avec la présence de cellules lymphoïdes de grandes tailles

DISCUSSION

- Validation de la CMF : Suspensions tissulaires
 - Nombreuses études : 1994
 - Ponction GG ou Extra GG ou par Perfusion Trituration
 - Dilacération
- Diagnostic : adénites réactionnelles :
 - Laane et al.: 97% (172 cas)
 - El sayed et al : 100% (4cas/ 57 cas)
 - Jeffers et al : 100%
- Sensibilité de détection : prolifération lymphomateuse : 80-90% des cas

- A. C. Wotherspoon and R. P. Hasserjian. Current Diagnostic Pathology (2000)
- Cherie H. Dunphy. Cytometry (2000)
- El sayed et al. Diagnostic Pathology 2008

Diagnostic et classification des lymphomes primaires et en rechute : Apport et limites de la ponction aspiration couplée à la cytométrie en flux

Diagnosis and Subclassification of Primary and Recurrent Lymphoma

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

Brenton A. Meda, MD,¹ David H. Buss, MD,² Ralph D. Woodruff, MD,² James O. Cappellari, MD,² Robert O. Rainer, MD,³ Bayard L. Powell, MD,⁴ and Kim R.Geisinger, MD²

BA MEDA et al. 275 patients : suspicion de lymphome malin

Diagnostic et classification des lymphomes par ponction ganglionnaire couplée à la cytométrie en flux



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

A Critical Review of 307 Cases with Technical Suggestions

<u>Pio Zeppa</u>, Gilda Marino, Giancarlo Troncone, Franco Fulciniti, Amalia De Renzo, Marco Picardi, Giulio Benincasa, Bruno Rotoli, Antonio Vetrani, Lucio Palombini

n = 307 patients: suspicion de Lymphome malin

Contribution de la cytométrie en flux dans l'évaluation immunophénotypique des tissus suspects d'atteinte lymphomateuse ?

Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 42:296-306 (2000)

Contribution of Flow Cytometric Immunophenotyping to the Evaluation of Tissues With Suspected Lymphoma?

Cherie H. Dunphy*

Division of Hematopathology, Department of Pathology, St. Louis University Health Sciences Center, St. Louis, Missouri

CH. DUNPHY et al. 278 atteintes ganglionnaires et 95 extra ganglionnaires

Flow cytometric immunophenotyping and cell block immunocytochemistry in the diagnosis of primary Non-Hodgkin's Lymphoma by fine-needle aspiration: Experience from a tertiary care center

N=65 cas:

- 40 cas de LNH B
- 21 cas de LNH T
- 4 cas LNH inclassables
- CMF seule (Sensibilité : 74%) >> IH sur bloc seule (65,5%)
- Both [CMF + IH] : Sensibilité de 88,5% dans le diagnostic et la classification des LNH

Paul, et al.: FNA diagnosis of NHL by immunophenotyping Journal of Cytology / July 2014 / Volume 31 / Issue 3

Etude de la corrélation entre CMF et Histologie – IHC dans le diagnostic des lymphomes

Diagnostic Pathology

Research

Flow cytometric immunophenotyping (FCI) of lymphoma: correlation with histopathology and immunohistochemistry Abeer M El-Sayed, Mohammad H El-Borai, Abeer A Bahnassy* and Shadia MS El-Gerzawi

The overall concordance between FCI versus histopathology and IHC was 88%.

CMF SUR SUSPENSIONS GANGLIONNAIRES OU EXTRA-GG

Ponctions multiples

Avantages

- Technique quantitative
- Répétitive
- Possibilité de tester plusieurs antigènes sur une même cellule
- Clinicien orienté dans 24h
- Pas d'hospitalisation (ambulatoire)
- Pas d'anesthésie
- Orientation de l'anatomopathologiste

- **Mais limites...** quelques Faux négatifs
 - Absence d'expression des Igs dans certains cas
 - Insuffisances cellulaires dans certains cas
 - Contamination sanguine dans certains cas

ABSENCE D'EXPRESSION DES IGS

	Kaleem et al	Young et al	Meda et al.
	(2001)	(1998)	(2000)
	n = 298	n = 87	n = 275
CMF	10 cas	6 cas	17 cas
	3,35%	6,89%	6%
Histologie	Lymphome B	2 LGCDB	1 LF
		4 CD20 >85%	16 LGCDB

- Zeppa et al: 4% (12 cas /307): Ig cy (négative dans 7 cas); <u>Lymphome B</u>:
 CD20 > 85% / CD20+/CD5+ > 35% / CD19+/CD10+ > 18%
- Certains auteurs : aberration phénotypique

INSUFFISANCES CELLULAIRES

Selon de nombreux auteurs

- Kocjan et al : 4 % à 30%

Meda et al.4,36% (12 cas / 275)

- Young et al: 5% (5 cas / 87)

- Zeppa et al: 5% (15 cas / 307)

- Nécrose, Fibrose, Ganglion hyperhémique, Ganglion profond, Expérience du médecin, organe ponctionné
- Certains auteurs : Première année d'exercice, mais qui ont diminué avec le temps et l'expérience des médecins

- Ainsi, actuellement la majorité des équipes recommandent :
 - Répétitions des ponctions
 - Ponctions sans aspirations

Numération :

- Kocjan et al.: après ponction:
 1500 lymphocytes /mm³ [500 à 3000]
- Zardawi et al. : après ponctions : < 1600 lymphocytes /mm³
- <u>Dans notre étude</u>: <u>Toutes</u> suspensions confondues: [500 /mm³ et 16 000 /mm³ cellules lymphoïdes]

VIABILITÉ CELLULAIRE DES SUSPENSIONS GANGLIONNAIRES

- Recommandation (Dunphy et El Sayed) : CMF immédiatement après le prélèvement : préservation de la viabilité des cellules et des antigènes de surface
- Notre étude : Application dans les minutes qui suivent la ponction:
 - Étude immunophénotypique

CONCLUSION (1)

- La CMF renforce la capacité diagnostique de l'étude cytologique par ponction aspiration à l'aiguille fine, en jouant un rôle crucial dans le **diagnostic différentiel** rapide et précis entre les processus réactifs, et les LNH de phénotype B et T.
- La CMF par ponction ganglionnaire offre plusieurs autres avantages : peut apporter au clinicien une orientation diagnostique rapide, dans la journée, au patient, un confort, un gain de temps appréciable, et de réduire son temps d'hospitalisation, et au pathologiste une aide précieuse dans la démarche diagnostique.

CONCLUSION (2)

- Par conséquent, la technique combinée utilisée dans la présente étude peut être utilisée comme méthode de diagnostic du LGCDB, particulièrement lors :
 - de la rechute
 - et dans le cadre du bilan d'extension des sites inaccessibles à la biopsie.
- Ce travail apporte une contribution à la connaissance d'une technique diagnostique performante, utile dans les LNH, et peu répandue en Algérie.



MERCI POUR VOTRE ATTENTION