

## I Le dossier – Lymphomes cutanés

# Comprendre l'intérêt de la cytométrie en flux pour les dermatologues

**RÉSUMÉ :** Le diagnostic du syndrome de Sézary est souvent complexe, source d'errances diagnostique et thérapeutique. L'utilisation de la cytométrie en flux s'est considérablement développée afin de déterminer les stades sanguins B0 à B2 des patients. C'est une méthode fiable et rapide, principalement basée sur la quantification de lymphocytes sanguins présentant un défaut d'expression de CD7 et/ou CD26. Néanmoins, les lymphocytes CD4+ CD7- ou CD26- peuvent être présents dans d'autres dermatoses et dans le syndrome de Sézary, une proportion non négligeable de ces cellules comprend des lymphocytes T bénins.

KIR3DL2/CD158k représente le premier marqueur "générique" positif des cellules tumorales permettant la détection et le suivi des cellules de Sézary. Son utilisation est particulièrement intéressante en l'absence d'hyperlymphocytose TCD4+, voire de lymphopénie.



**H. MOINS-TEISSERENC**

Inserm UMR-1160  
et Laboratoire d'hématologie biologique,  
Université de Paris, AP-HP, Hôpital Saint Louis,  
PARIS.

Le syndrome de Sézary (SS) est une maladie rare correspondant à une forme agressive et leucémique de lymphome cutané à cellules T (CTCL) caractérisée par une érythrodermie, une lymphadénopathie et un nombre élevé de lymphocytes atypiques avec des contours nucléaires cérébriiformes (cellules de Sézary [CS]) dans le sang et la peau. Les patients atteints de mycosis fongicoïde (MF) peuvent également présenter des cellules de Sézary sanguines. Le diagnostic du MF et du SS est souvent complexe, la présentation clinique posant le problème du diagnostic différentiel des autres dermatoses inflammatoires érythrodermiques, d'autant plus qu'un clone T peut y être également détecté.

L'ajout en 2007 d'une classification sanguine (B pour *blood*) à la classification TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) a permis de mieux rendre compte du spectre des différentes formes du MF, érythrodermique ou non, du pré-SS et du SS [1]. De plus, la catégorisation en stades B0, B1 et B2 représente une valeur ajoutée pronostique, indépendante des stades T et N.

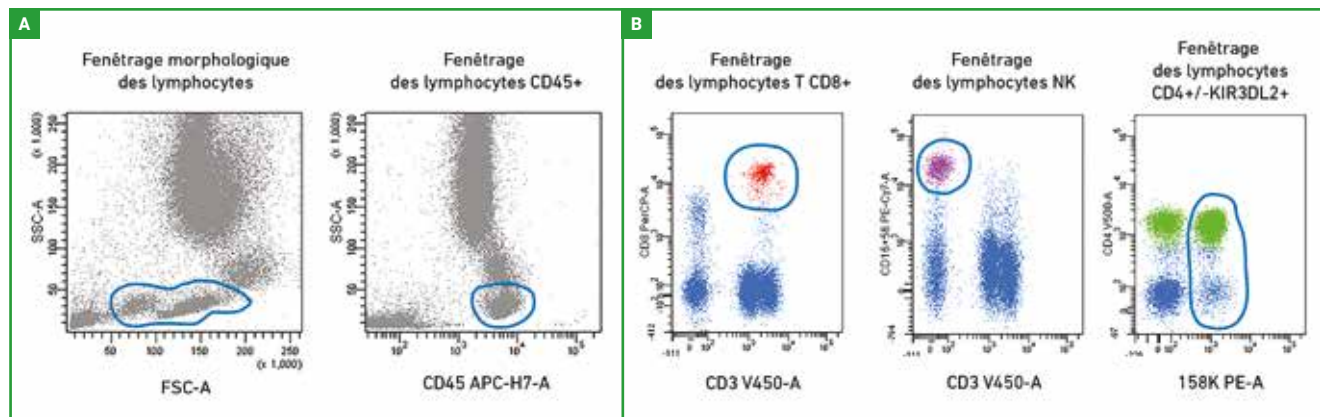
Historiquement, la charge tumorale sanguine s'évalue à partir du dénombrement des CS sur frottis sanguin. Cette méthode, basée sur les caractéristiques morphologiques des cellules tumorales, n'a jamais atteint de consensus international car peu sensible et sujette à une variabilité d'interprétation entre cytologistes. De ce fait, la cytométrie en flux (CMF) est devenue une alternative incontournable permettant d'identifier et de quantifier les CS sanguines. Cette technique, qui repose sur l'analyse de cellules en suspension, permet d'obtenir des informations relatives à la taille, la structure et l'expression de marqueurs cellulaires spécifiquement reconnus par des anticorps monoclonaux (AcM). Il s'agit d'une analyse quantitative et multiparamétrique des cellules.

### Principe de la cytométrie en flux

Les trois principaux éléments d'un cytomètre sont :

- la fluidique, qui permet l'introduction et le positionnement des cellules dans

## Le dossier – Lymphomes cutanés



**Fig. 1 :** Stratégie de fenêtrage des cellules de Sézary KIR3DL2+. **A :** les lymphocytes sont identifiés par double fenêtrage, morphologique et d'expression de CD45. **B :** après identification des lymphocytes TCD8+ et NK, ceux-ci sont soustraits de la population CD4+/-KIR3DL2+, permettant d'isoler les cellules de Sézary KIR3DL2+. Cette stratégie permet de potentiellement individualiser les cellules présentant un ou des défauts d'expression des molécules CD3 et/ou CD4.

un flux laminaire vers une chambre de mesure ;

- l'optique, qui produit et recueille des signaux lumineux lors du passage des cellules une à une devant une (ou plusieurs) sources lumineuses (laser en général) ;
- l'électronique, qui permet la conversion des signaux optiques en signaux électroniques. La numérisation de ces signaux aboutit à l'analyse informatique.

Les informations sur la taille et la structure (complexité intracellulaire) sont recueillies à partir des données de diffraction de la lumière collectées après passage de chaque cellule. Les informations liées à l'expression des molécules de surface (souvent nommées CD pour *cluster of differentiation*) sont obtenues grâce aux signaux de fluorescence émis par des fluorochromes auxquels les AcM spécifiques des CD d'intérêt ont été couplés. Il est aussi possible de détecter des molécules à localisation intracellulaire, après une étape de perméabilisation. La CMF peut s'appliquer à l'analyse des tissus, dont la peau, après dissociation et mise en suspension des cellules.

Les cytomètres généralement utilisés en routine hospitalière possèdent au moins trois lasers dont la longueur d'onde respective permet d'exciter plusieurs types de fluorochromes possédant des spectres d'émission différents.

Les signaux obtenus permettent de quantifier le pourcentage d'une population positive par rapport à une population parentale (ex. : % de lymphocytes T par rapport aux lymphocytes totaux) et d'évaluer la densité d'expression d'un marqueur donné en fonction de sa moyenne d'intensité de fluorescence (**fig. 1**).

### Principes du marquage

Brièvement, 50 à 100 mL d'un prélèvement sanguin recueilli en présence d'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) sont incubés avec des anticorps identifiant les populations cellulaires d'intérêt. La combinaison d'AcM permet de distinguer les différentes sous-populations de cellules nucléées sanguines après une étape de lyse des globules rouges. La numération des lymphocytes est possible grâce à l'ajout d'une quantité connue de billes dans les tests.

### Les différents types de marqueurs lymphocytaires

Les leucocytes sanguins comprennent les polynucléaires, les monocytes et les lymphocytes. Ils se distinguent en CMF par leurs caractéristiques morphologiques, affinées par l'analyse de l'expression de CD45 (marqueur de tous les

leucocytes) qui permet de mieux démarquer le signal du bruit de fond (**fig. 1A**).

Les populations lymphocytaires les plus représentées dans la circulation sanguine sont les lymphocytes T, B et *natural killer* (NK).

Parmi les lymphocytes T, on distingue :

- les lymphocytes T CD4+ auxiliaires (ou *helper*) et les lymphocytes T CD4 régulateurs ;
- les lymphocytes T CD8+ dits "cytotoxiques".

La majorité des lymphocytes T sanguins sont porteurs d'un récepteur du type TCR  $\alpha\beta$ . Les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , minoritaires dans le sang, sont généralement CD4-CD8- et/ou CD4-CD8 CD8<sup>low</sup>. Tous les lymphocytes T expriment CD3.

Les lymphocytes B sont essentiellement identifiés par le marqueur CD19 et les NK sont caractérisés par un phénotype CD3-CD (16/56)+.

### Cellules de Sézary en CMF : les marqueurs CD7 et CD26

Les CS sont décrites comme des lymphocytes T matures CD3+, habituellement CD4+CD8-, exprimant un TCR de type  $\alpha\beta$ . Plusieurs marqueurs ont été identifiés

avec une efficacité variable pour le diagnostic et le suivi thérapeutique du MF et du SS.

Les recommandations EORTC/ISCL de 2007, 2011 et 2018 ont émis des valeurs seuils relatives (pourcentages) et absolues en CMF, basées sur la perte de CD26 et CD7 à la surface des lymphocytes T CD4+, permettant de distinguer les stades B0-B1-B2 [1-3]:

– critères B2 en CMF : lymphocytes TCD4+ CD26-  $\geq 1\,000/\mu\text{L}$ , ou CD4+ CD7-  $\geq 1\,000/\mu\text{L}$  OU (expansion des lymphocytes TCD4+, avec soit TCD4+ CD26-/lymphocytes totaux  $\geq 30\%$ , ou CD4+ CD7-/lymphocytes totaux  $\geq 40\%$ , ou ratio CD4/CD8  $\geq 10$ );

– critères B1 en CMF : lymphocytes T CD4+ CD26- ou TCD4+ CD7-  $\geq 250/\mu\text{L}$  ET  $< 1\,000/\mu\text{L}$ ;

– critères B0 en CMF : lymphocytes TCD4+ CD26- ET TCD4+ CD7-  $< 250/\mu\text{L}$ .

### Cellules de Sézary en CMF : les marqueurs positifs

Les cellules de Sézary correspondent à une expansion clonale de lymphocytes T possédant tous le même TCR. La quantification du clone tumoral est par conséquent théoriquement possible en CMF en utilisant l'anticorps anti-TCR-V $\beta$  spécifique de la famille V $\beta$  du clone. Néanmoins, cette approche est peu compatible avec une activité de dépistage diagnostique puisqu'elle requiert la détermination préalable du clone V $\beta$ . Celle-ci est possible en CMF à l'aide de kits disponibles dans le commerce mais elle reste relativement coûteuse en routine hospitalière. Par ailleurs, les AcM disponibles dans le commerce ne sont capables de détecter que 70 % des TCR-V $\beta$  existants. Enfin, il faut garder à l'esprit qu'un clone tumoral peut correspondre à un autre type de lymphoprolifération T, voire à un clone réactionnel (anti-tumoral, inflammatoire ou encore lié à l'âge).

KIR3DL2/CD158k est un récepteur appartenant à la famille des *killer-cell*

*immunoglobulin-like receptors* (KIRs). Il a été rapporté pour la première fois par Bagot *et al.* comme étant un marqueur positif "générique" des cellules de Sézary [4]. Sa fiabilité a été démontrée dans le sang et la peau [5-8] et une valeur pronostique quant à la survie a été rapportée avec une valeur seuil de cellules KIR3DL2  $> 85\%$  des lymphocytes totaux [9]. Chez les individus sains, KIR3DL2 est exprimé par une sous-population mineure de NK et par de rares TCD8+. Une stratégie de fenêtrage en CMF excluant les cellules NK (CD3-CD (16/56)+) et les TCD8+ permet d'identifier les CS KIR3DL2+ (*fig. 1B*) [10]. Nous avons récemment publié les résultats d'une étude portant sur 254 patients érythrodermiques adressés à l'hôpital Saint-Louis pour suspicion de CTCL. Les résultats montrent que les seuils de 200/ $\mu\text{L}$  et/ou de 10 % de CS KIR3DL2+ permettent d'établir un diagnostic initial de SS (stade B2 préalablement défini par les critères ISCL/EORTC) avec une sensibilité de 89 % et une spécificité de 96 %, alors que la sensibilité des CD4+ CD7- n'est que de 69 % [11].

De plus, ces seuils sont particulièrement informatifs lorsque la numération des TCD4+ est inférieure à 1 600/ $\mu\text{L}$  et permettraient un diagnostic plus précoce du SS. Nos résultats indiquent par ailleurs que chez plus de la moitié des patients, une fraction  $\geq 30\%$  des TCD4+ bénins (non Sézary) n'exprime pas CD26. Cela est problématique lors du suivi de ces patients, la numération des TCD4+ CD26- pouvant sous-estimer la réponse sanguine aux traitements.

### Cellules de Sézary en CMF : les phénotypes aberrants

Les CS peuvent présenter une diminution voire une perte d'expression des molécules CD2, CD3, CD4 et/ou CD5, partielle ou totale, ou plus rarement être de phénotype CD8+ CD4- ou CD8+ CD4+. Ces anomalies peuvent contribuer à l'évaluation globale en CMF et apporter

des arguments en faveur de la présence de CS, en parallèle avec les anomalies citées ci-dessus.

## Conclusion

Le diagnostic du SS demeure complexe, source d'errance thérapeutique et de retard diagnostique. La CMF permet la caractérisation directe et rapide sur un prélèvement sanguin des cellules de Sézary circulantes, selon les critères admis par l'ISCL/EORTC, auxquels nous recommandons l'ajout du marqueur KIR3DL2. Cette technologie doit s'associer aux autres critères biologiques (mise en évidence d'un clone T identique dans la peau et le sang) et cliniques afin d'établir le diagnostic de SS. Elle permet en outre de suivre l'évolution de la charge tumorale sanguine au décours des différentes lignes thérapeutiques, sa contribution à l'évaluation de la maladie résiduelle restant à évaluer dans des études multicentriques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. OLSEN E, VONDERHEID E, PIMPINELLI N *et al.* ISCL/EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*, 2007;110:1713-1722.
2. OLSEN EA, WHITTAKER S, KIM YH; International Society for Cutaneous Lymphomas, United States Cutaneous Lymphoma Consortium, Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sezary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*, 2011;29:2598-2607.

## ■ Le dossier – Lymphomes cutanés

3. SCARISBRICK JJ, HODAK E, BAGOT M *et al.* Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sezary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer*, 2018;93:47-56.
4. BAGOT M, MORETTA A, SIVORI S *et al.* CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood*, 2001; 97:1388-1391.
5. KLEMKE CD, BRADE J, WECKESSER S *et al.* The diagnosis of Sezary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers. *Br J Dermatol*, 2008;159:871-880.
6. ORTONNE N, LE GOUVELLO S, TABAK R *et al.* CD158k/KIR3DL2 and NKp46 are frequently expressed in transformed mycosis fungoides. *Exp Dermatol*, 2012;21:461-463.
7. POSZEP CZYNSKA-GUIGNÉ E, SCHIAVON V, D'INCAN M *et al.* CD158k/KIR3DL2 is a new phenotypic marker of Sezary cells: relevance for the diagnosis and follow-up of Sezary syndrome. *J Invest Dermatol*, 2004;122:820-823.
8. BATTISTELLA M, LEBOEUF C, RAM-WOLFF C *et al.* KIR3DL2 expression in cutaneous T-cell lymphomas: expanding the spectrum for KIR3DL2 targeting. *Blood*, 2017;130:2900-2902.
9. HURABIELLE C, MICHEL L, RAM-WOLFF C *et al.* Expression of Sézary Biomarkers in the Blood of Patients with Erythrodermic Mycosis Fungoides. *J Invest Dermatol*, 2016;136:317-320.
10. MOINS-TEISSERENC H, DAUBORD M, CLAVE E *et al.* CD158k Is a Reliable Marker for Diagnosis of Sézary Syndrome and Reveals an Unprecedented Heterogeneity of Circulating Malignant Cells. *J Invest Dermatol*, 2015;135:247-257.
11. ROELENS M, DE MASSON A, RAM-WOLFF C *et al.* Revisiting the initial diagnosis and blood staging of mycosis fungoides and Sezary syndrome with the KIR3DL2 marker. *Br J Dermatol*, 2020; 182:1415-1422.

---

L'auteure est expert-consultante auprès d'Innate-Pharma (Marseille).