

INTÉRÊT CLINIQUE D'UN SCORE IMMUNOPHÉNOTYPIQUE POUR PRÉDIRE L'ÉVOLUTIVITÉ DES MYÉLOMES ASYMPTOMATIQUES (SMM)

CORATA Belgique

6^{ème} Congrès

de Biologie Clinique

20 - 21 septembre 2018

ROUEN

PHUONG NGUYEN

20/09/2018



CORATA Belgique . 6^{ème} Congrès de Biologie Clinique

Plan de l'exposé

2

- Introduction
- Apports cytologiques
- Apports et limites de la Cytométrie en Flux Multiparamétrique dans les gammopathies monoclonales
- Utilisation des données Cytométriques comme paramètres pronostiques:
 - Paramètres pronostiques Quantitatifs
 - Paramètres (marqueurs) pronostiques Qualitatifs

1. Introduction – Myeloma overview

3

- ❑ Neoplastic **Plasma Cell** disorder
 - ❑ Proliferation of neoplastic plasma cells in the bone marrow
 - ❑ Monoclonal immunoglobulin in serum/urine (ex. non-secretory)
 - ❑ End organ dysfunction
 - ❑ **CRAB**: hypercalcaemia, renal failure, anemia, and bone lesions

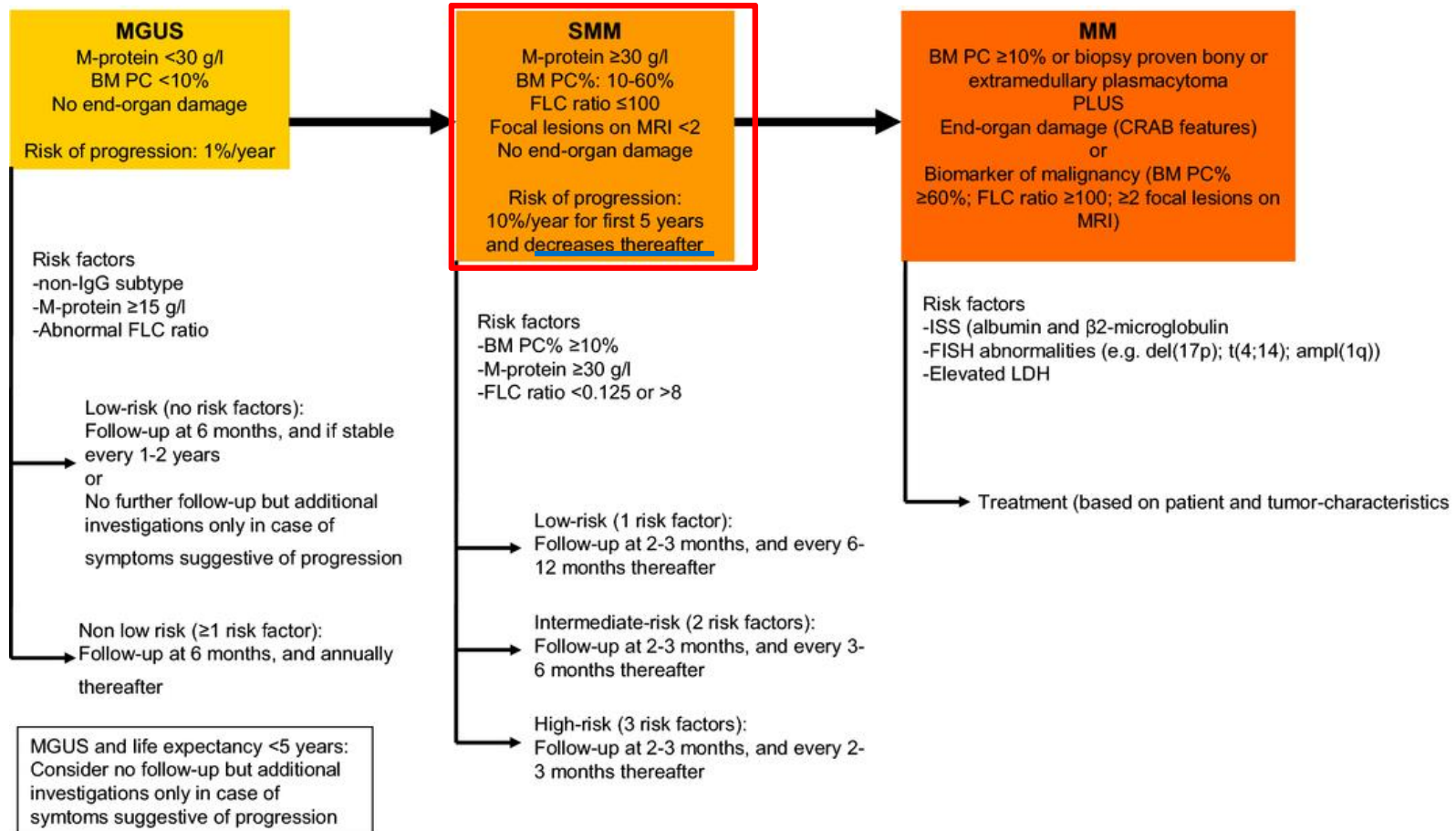


- ❑ 1% of all cancers in the Western world
- ❑ 13% of hematologic cancers (2nd after NHL)
- ❑ Median age at diagnosis is approx. 70 yo
- ❑ Treatment with induction chemotherapy +/- ASCT
- ❑ Progression:



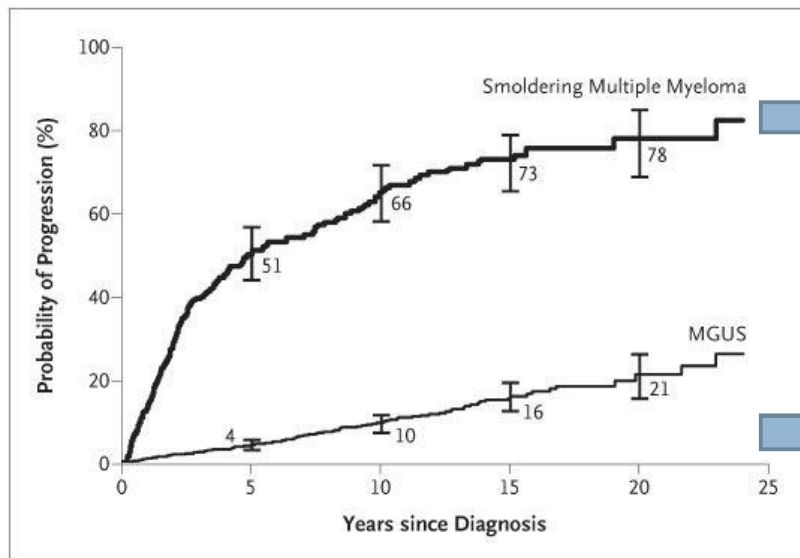
Progression

4



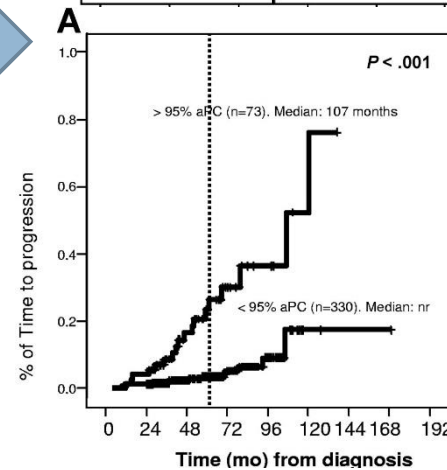
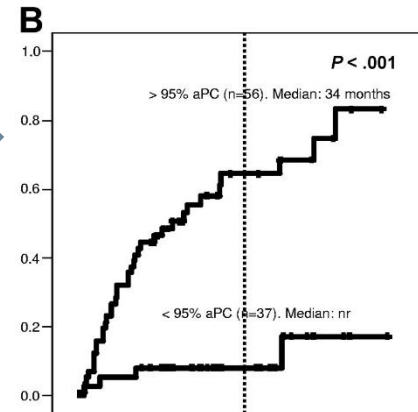
Progression risk to Myeloma

5



Probability of Progression to Active Multiple Myeloma or Primary Amyloidosis in Patients with Smoldering Multiple Myeloma or Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS).

([N Engl J Med.](#) 2007 Jun 21;356(25):2582-90)



Pérez-Persona E et al. Blood 2007 110; 2586-2592.

High-risk SMM

6

Definition of high-risk smoldering multiple myeloma

Clonal BMPCs $\geq 10\%$ and any one or more of the following:

- Serum M protein ≥ 30 g/L
- IgA SMM
- Immunoparesis with reduction of 2 uninvolved immunoglobulin isotypes
- Serum involved/uninvolved FLC ratio ≥ 8 (but < 100)
- Progressive increase in M protein level (evolving type of SMM; increase in serum M protein by $\geq 25\%$ on 2 successive evaluations within a 6-month period)
- Clonal BMPCs 50 to 60%
- Abnormal PC immunophenotype ($\geq 95\%$ of BMPCs are clonal) and reduction of ≥ 1 uninvolved immunoglobulin isotypes
- t(4;14) or del(17p) or 1q gain
- Increased circulating PCs
- MRI with diffuse abnormalities or 1 focal lesion
- PET-CT with focal lesion with increased uptake without underlying osteolytic bone destruction

Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. Blood 2015; 125:3069.

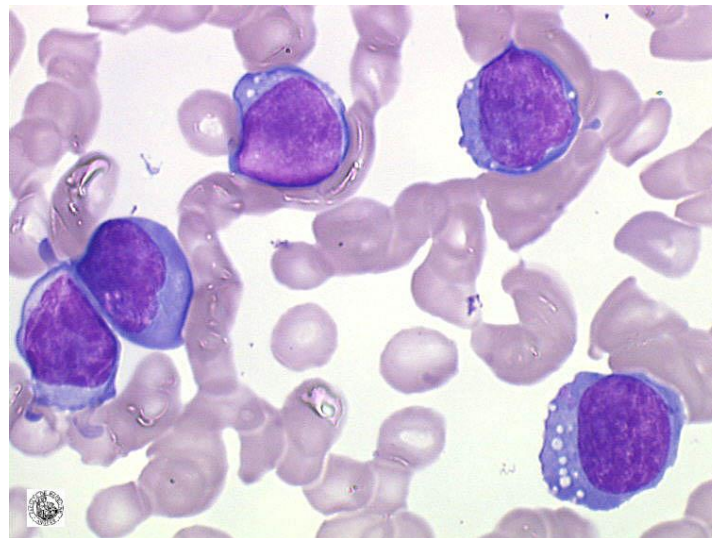
□ L'analyse Immunophénotypique des Plasmocytes = une des pistes majeures dans la détection des **SMM agressifs**.

→ un **score phénotypique** simple et reproductible permettrait de préciser le groupe de patients présentant une **maladie agressive** devant bénéficier d'un traitement précoce.

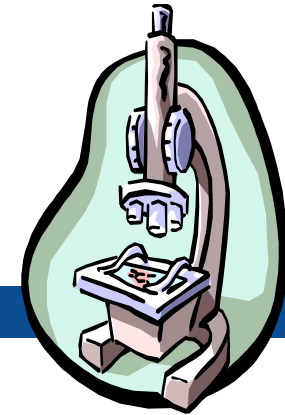
Appports cytologiques

8

- ❑ Sang périphérique:
 - ❑ Anémie normochrome normocytaire, moins souvent: macrocytaire
 - ❑ Rouleaux (sauf MM à chaîne légère ou non-sécrétant)
 - ❑ **Leucémie à Plasmocytes** (au moins 2000/ μ L de Plasmocytes circulant ET/OU constituant au moins 20% des WBC (WHO Classification 2017): pathologie plus **agressive**

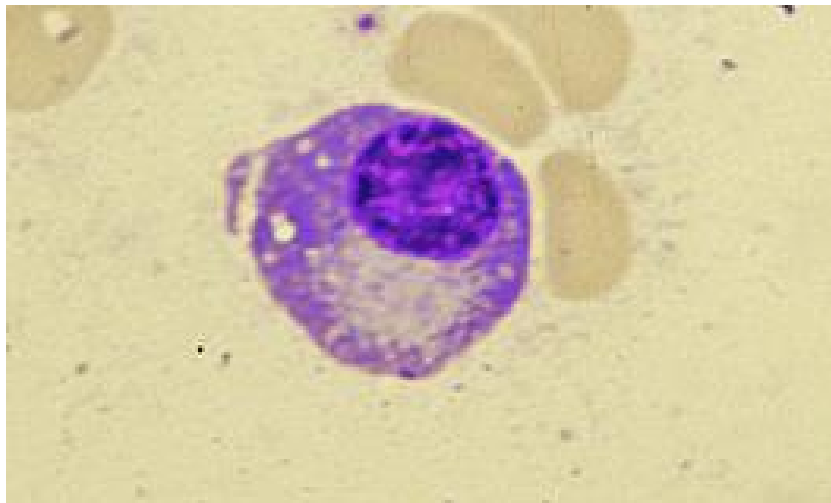


Cytologie médullaire



9

Comptage **microscopique** = % plasmocytes (PCs) **de référence**



Plasmocyte *morphologiquement normale*:

- Noyau excentré, avec chromatine très dense (cellules matures), absence de nucléole(s)
 - Cytoplasme abondant, **basophile** avec:
 - **Archoplasme** (zone non colorée):
Golgi
 - Longs profils parallèles de RE rugueux
- Lié à la forte activité de synthèse d'Ig

Anomalies morphologiques

10

2 types:

▣ Anomalies **Nucléaires**

- Signes d'immaturité, asynchronisme de maturation
- Plasmablastes
- Irrégularités nucléaires
- Bi- et Multi-nucléarité

→ Signes de **Malignité**

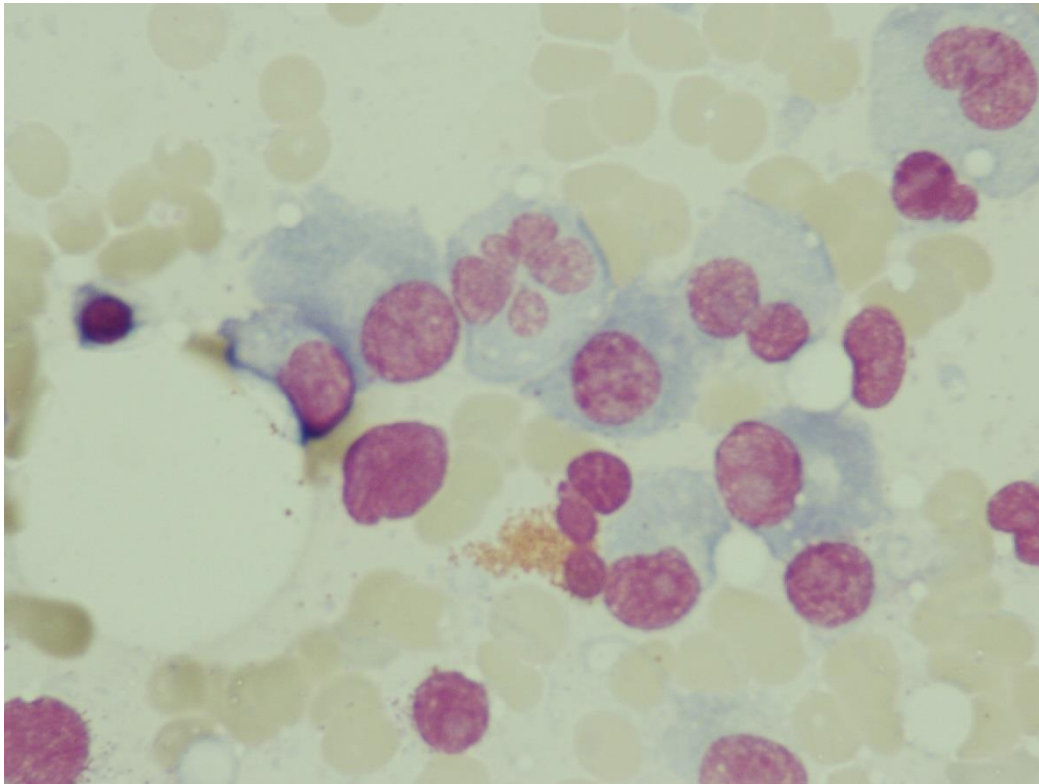
▣ Anomalies (ou Inclusions) **Cytoplasmiques**

- Cellules « flammées »
- Cellules de Mott, corps de Russell
- Corps de Dutcher
- Inclusions **Cristallines** → exclure **syndrome de Fanconi adulte** et **Histiocytose cristalline de surcharge!!**

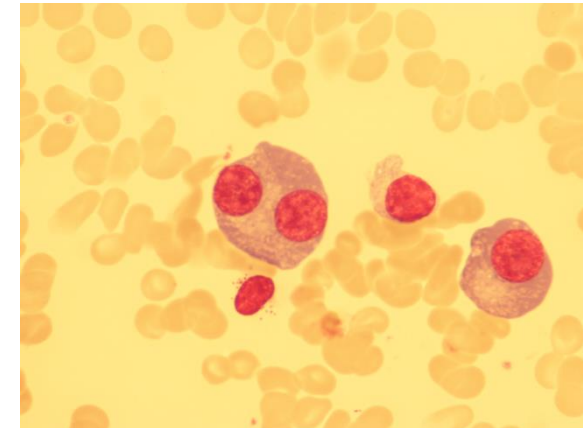
→ Parfois décrites dans les Plasmocytoses Réactionnelles

Anomalies nucléaires

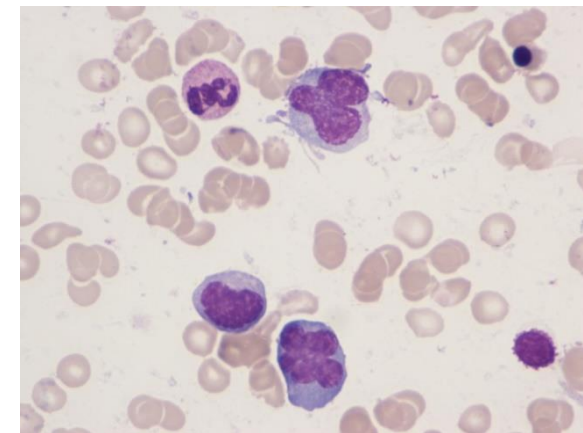
11



Immaturité nucléaire: Nucléole proéminent
Plasmocyte multinucléé



Plasmocyte mature binucléaire

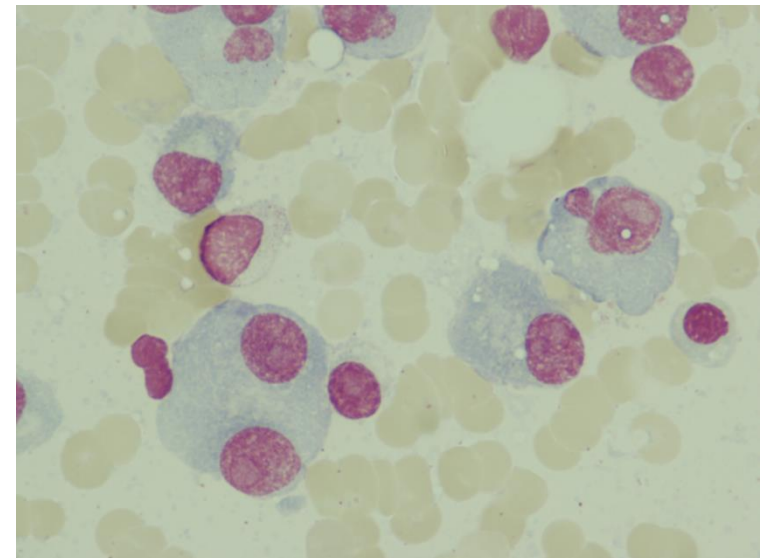
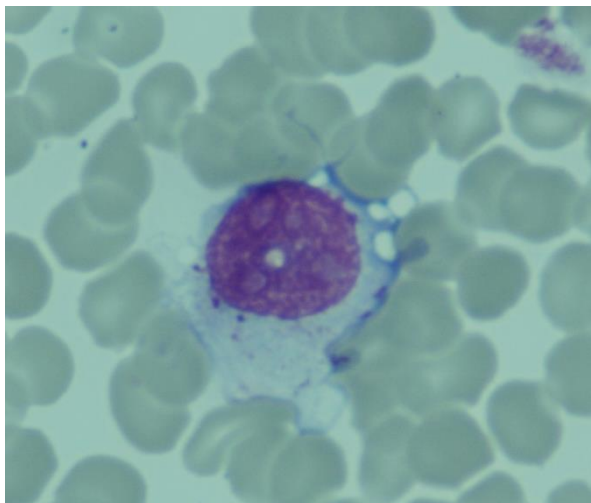
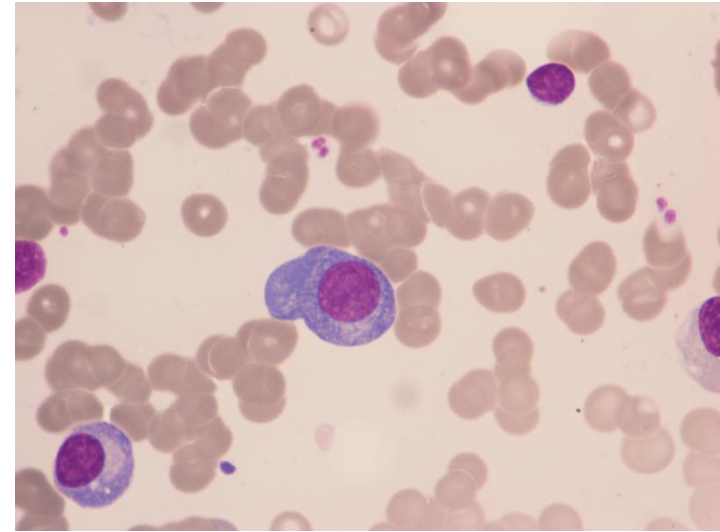
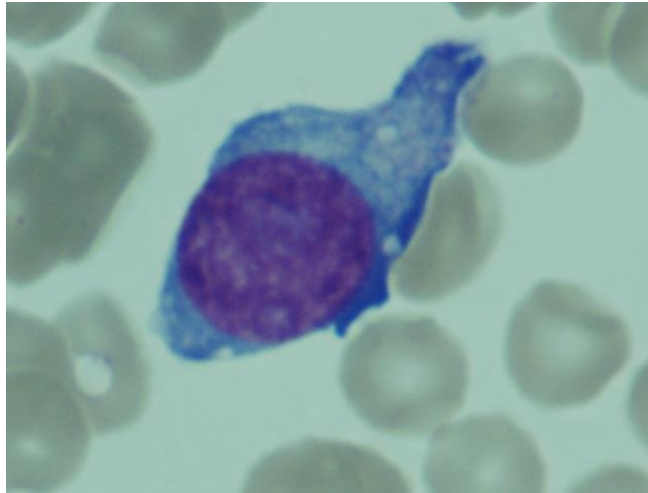


Plasmocyte mature avec noyau en fleur

Plasmocytes immatures

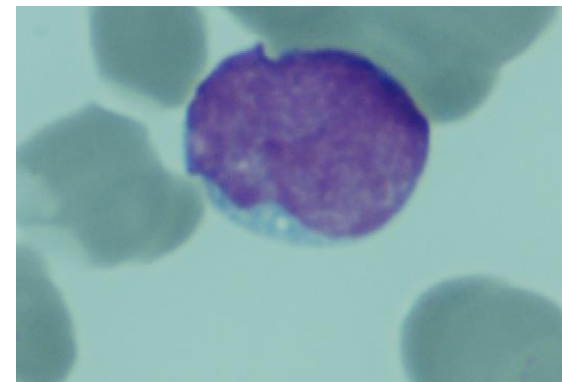
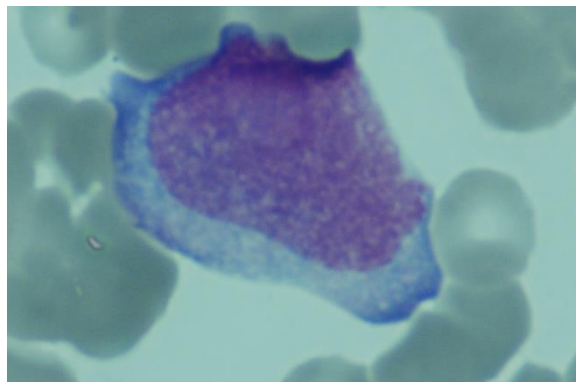
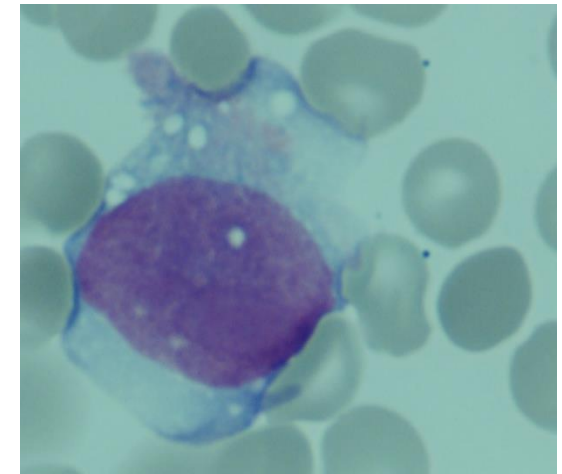
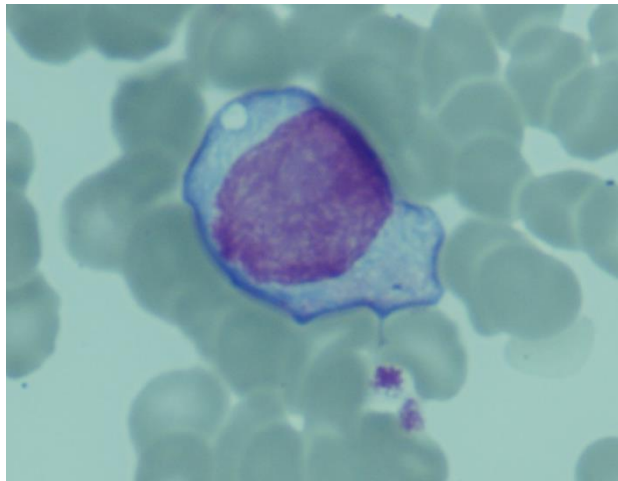
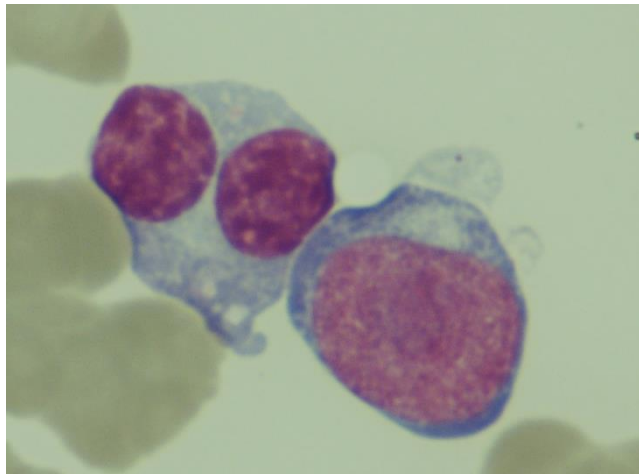
Irrégularité nucléaire

12



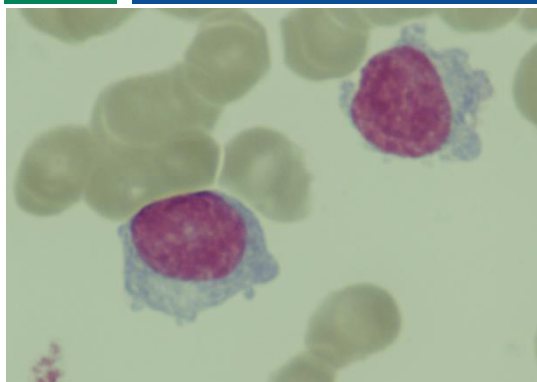
Plasmablastes

13



Anomalies Cytoplasmiques

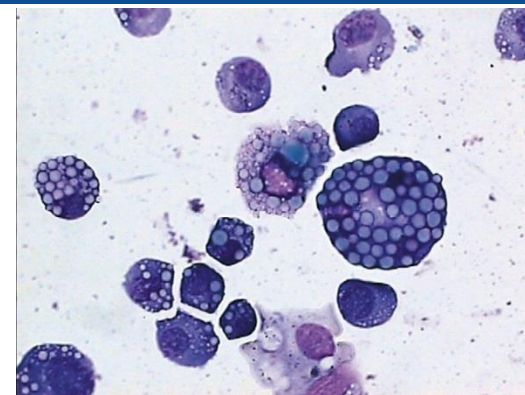
14



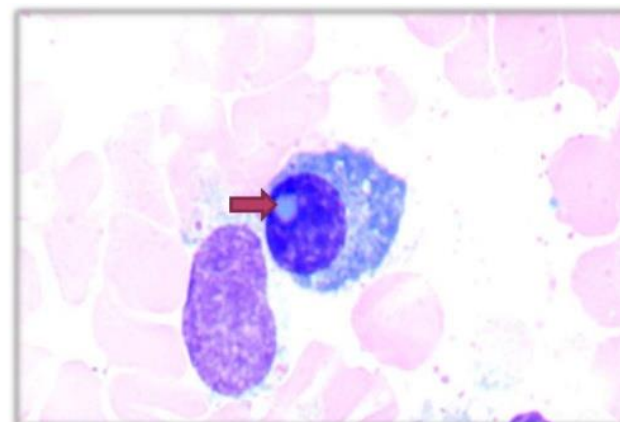
Cytoplasme réduit
Myélome à IgM



Cellules de Mott, corps de Russell



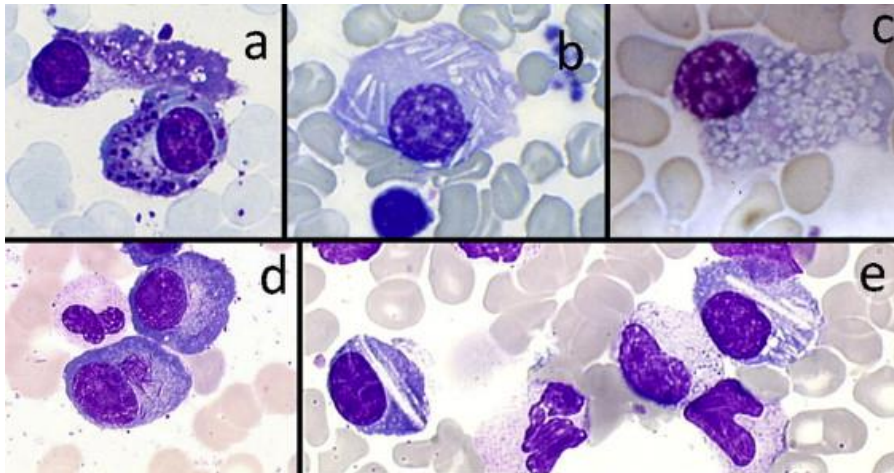
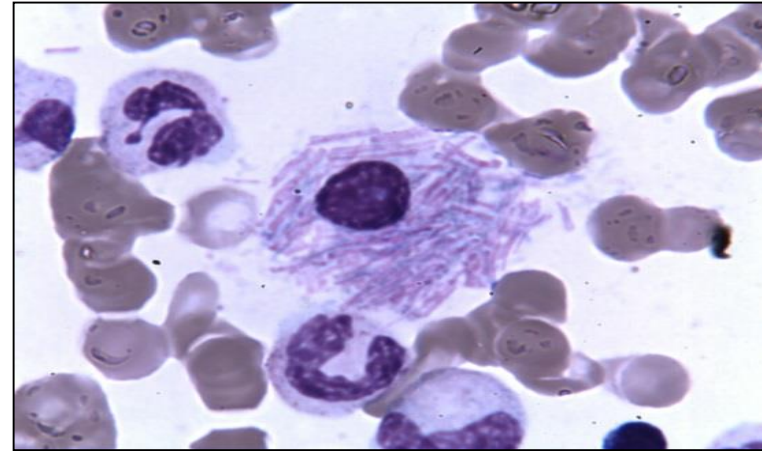
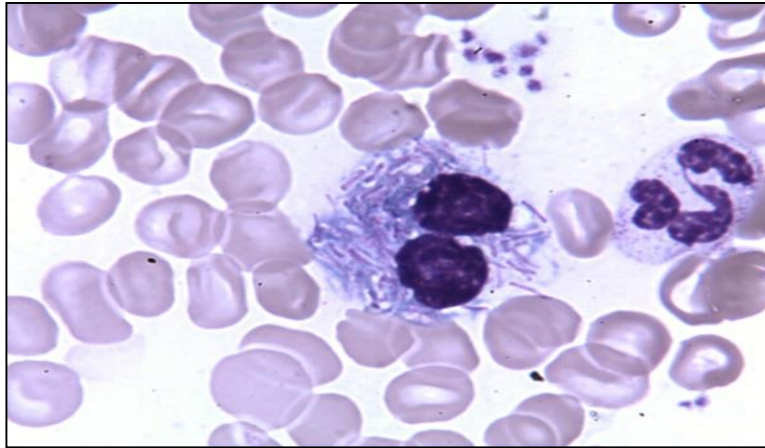
Plasmocyte en 'flamme'
MM à IgA



"Dutcher body" – invagination of cytoplasm into the nuclear structure

Inclusions Cristallines

15



Plasmocytoses à inclusions cristallines:
→ Évoquer syndrome de **Fanconi** adulte
(accumulation des chaînes légères **Kappa**
non lysées dans les endolysosomes des
cellules tubulaires proximales)

Valeurs Pronostiques des anomalies morphologiques

16

□ Myélomes à **Plasmocytes Matures** ont une survie globale plus prolongée que ceux à cellules **Immatures**

□ **Myélomes Plasmoblastiques**: pronostic très péjoratif.
(Paule B et al. Nouv Rev Fr Hematol 1988; 30; Goesguen JE et al. Leuk Res 1999;23)

61% associé à **t(4,14)** marqueur cytogénétique à haut risque de **dévolution** (Garand R et al. Leukemia 2003; 17: 2032-5)

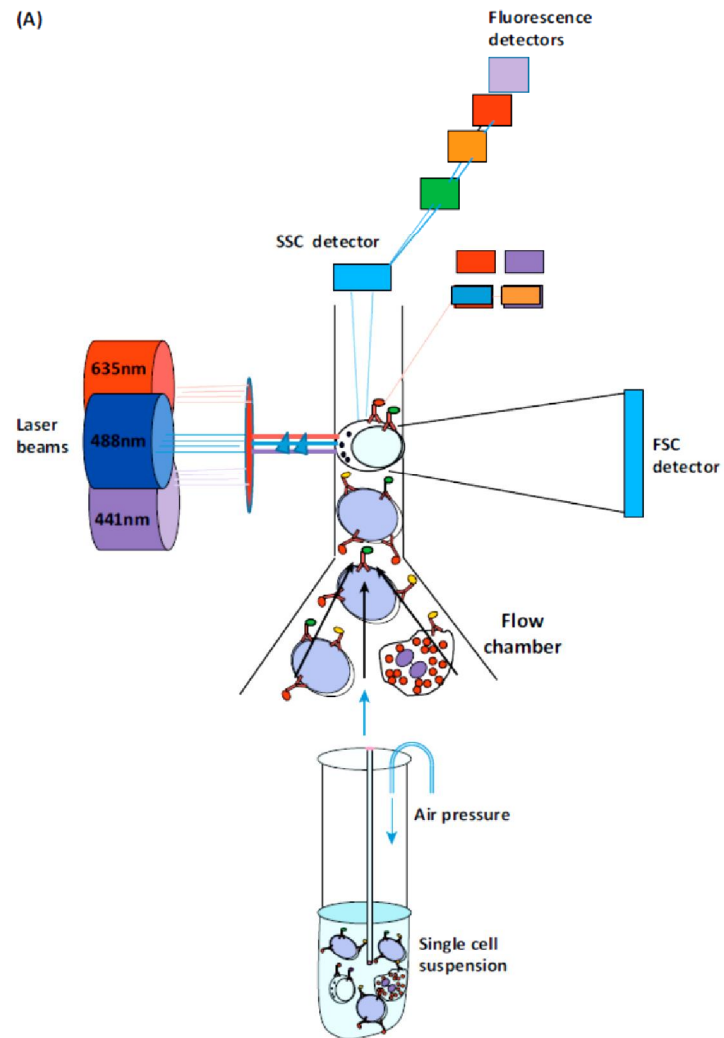
!! Notions pronostiques morphologiques non reprises dans la **actuelle** (2017) classification WHO des néoplasies hématologiques.

Cytométrie en Flux

17

□ IV
□

(A)



e du masque



Apports de l'immunophénotypage

18

□ **Évaluation primaire** au diagnostic

1/ Plasmocytes Monoclonaux vs réactifs vs lymphome

- Établissement du phénotype plasmocytaire anormal
- Détection d'une population B/T anormale

→ Diagnostic différentiel: **plasmacytose réactive (polyclonale)**, LNH-B avec différenciation plasmocytaire (**LPL, WM, LZM**), **MM à IgM, δ**

2/ Information Pronostique

- High vs Low Risk MGUS/sMM
- MGUS-like MM

□ **Évaluation de la réponse après thérapie**

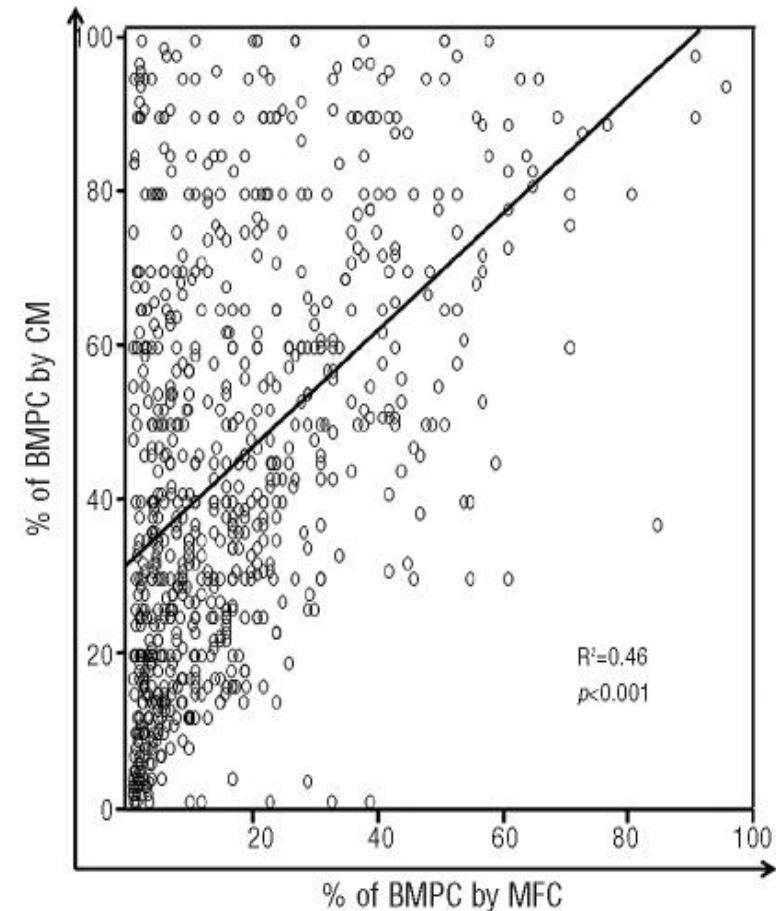
- Plasmocytes Réactifs vs Plasmocytes Néoplasiques résiduels
- MRD

□ Diagnostic des **néoplasies myéloïdes/lymphoïdes** secondaires à la thérapie

Limites de l'immunophénotypage

19

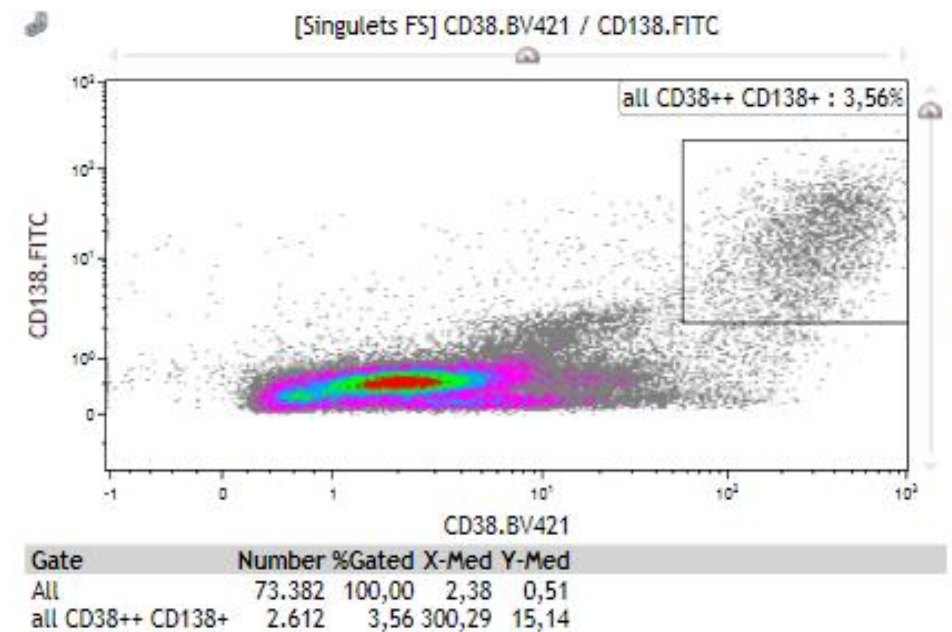
- Considération pratique: **Sous-estimation** du % de PCs par rapport aux méthodes cytologiques car
 - Concentration des plasmocytes dans spicules (grains) médullaires riches en graisse récupérés sur les frottis d'aspiration
 - Hémodilution du prélèvement d'immunophénotypage
 - Perte de PCs durant préparation technique (fragilité accrue des plasmocytes aux chocs mécaniques)
 - Autoaggrégation?
- Néanmoins ò
 - Rapport PCs monoclonaux/PCs polyclonaux correct
 - CFM reste **plus sensible** que la cytologie (nbre évènements analysés: $1-3 \cdot 10^5$ cellules en Cytométrie de routine vs 500 cellules en morphologie)



Immunophénotype des Plasmocytes

20

- ❑ Plasmocytes: cellules CD138+ CD38+++



- ❑ **CD38**: marqueur d'activation, présent dans plusieurs cellules immunitaires, les *plasmocytes* sont **CD38 FORT**
- ❑ **CD138**: Syndecan-1, marqueur spécifique des plasmocytes

Discrimination immunophénotypique: normaux vs pathologiques Plasmocytes - **Résumé**

21

Antigène	Normale expression (PC normaux)	Profile aberrant (cellules myélomateuses)	% de patients avec le phénotype aberrant sur tous les cas MM
CD38	+++	DIM+	80%
CD45	Dim, hétérogène	NEG	80%
CD19	+ (jusqu'à 33% de tous les PCs peut être CD19nég)	NEG	96%
CD56	Nég (jusqu'à 10-15% peut être CD56dim)	++	60-75%
CD117	Nég (0%)	+	30-32%
CD33	Nég	+	18%
CD20	Nég (jusqu'à 4% - CD20dim)	+	17-30%
CD27	+++ (100%)	Dim/Nég	40-68%
CD81	+ (100%)	Dim/Nég	55%
CD200	Nég ou +Dim	+ / ++	65-86%
CD28	Nég (jusqu'à 15% - CD28dim)	++	15-45%
SmlG	Nég	+	30%

Galtseva IV et al. Int J Lab Hem 2017; DOI: 10.1111/ijlh.12757

Jelinek T et al. Blood Cancer Journal 2017; 7, e617

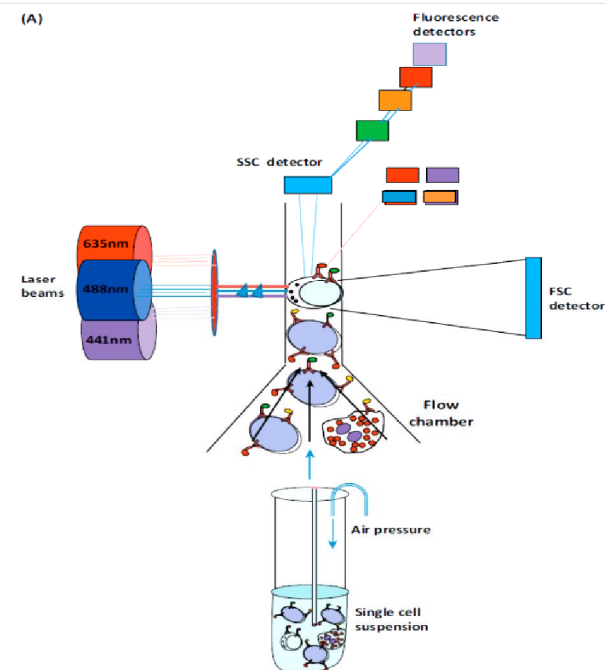
Panels Plasmocytes LHUB 10C

22

Fluorochrome	FITC	PE	ECD	PE-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-A700	APC-A750	BV421	KO
Tube 1 Screening Blastes/ Plasmocytes	CD138	CD13	HLA-DR	CD33	CD34	CD56	CD19	CD117	CD38	CD45
Tube 2 Étude clonalité Plasmocytaire	Kappa (intracyt)	Lambda (intracyt)	CD138 - PE.CF59 4	CD20	CD27	CD56	CD19	CD117	CD38	CD45

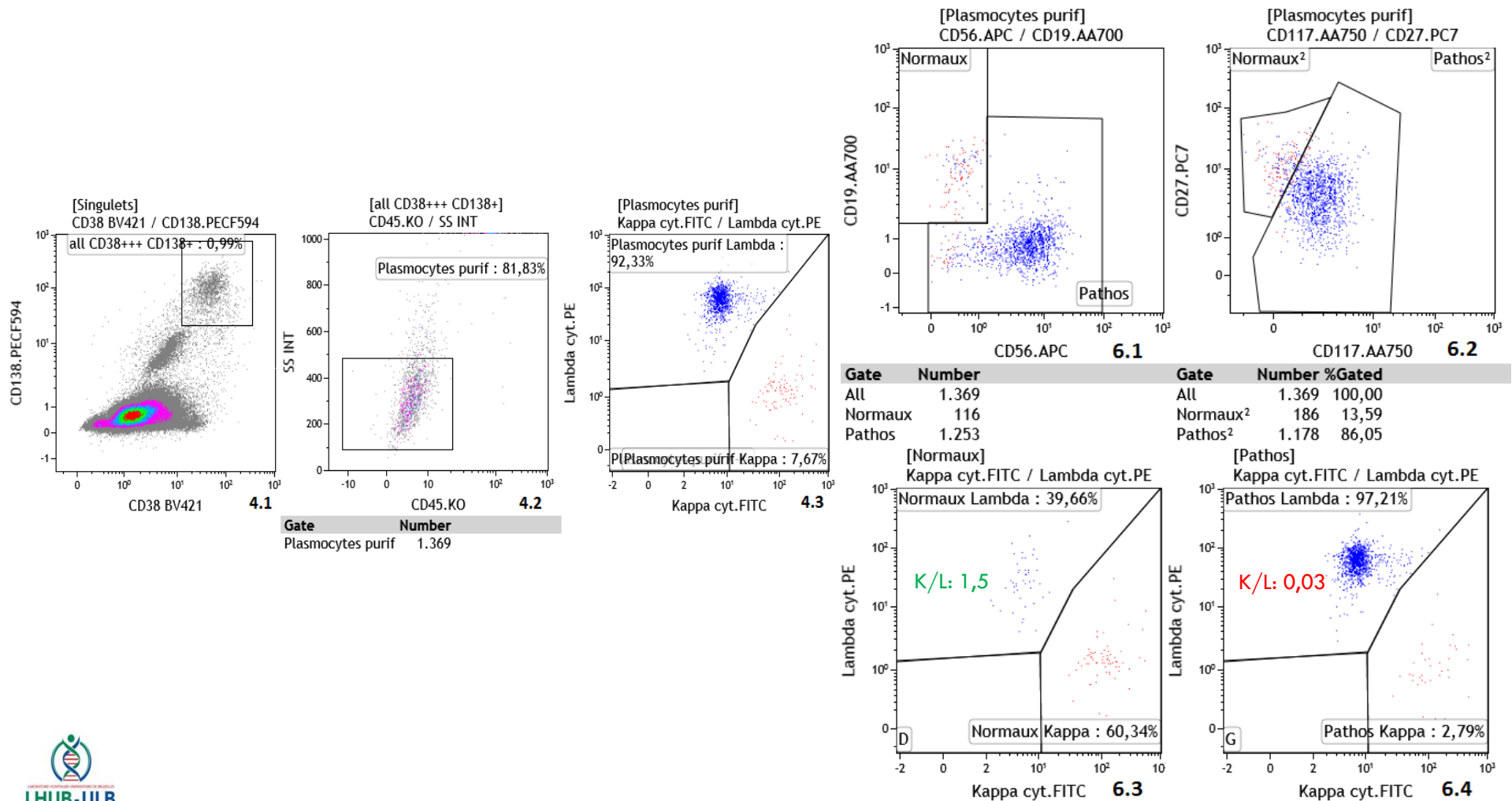


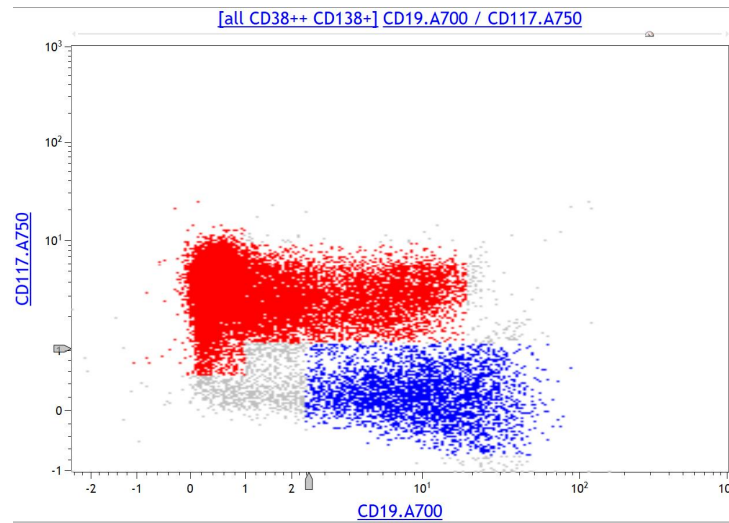
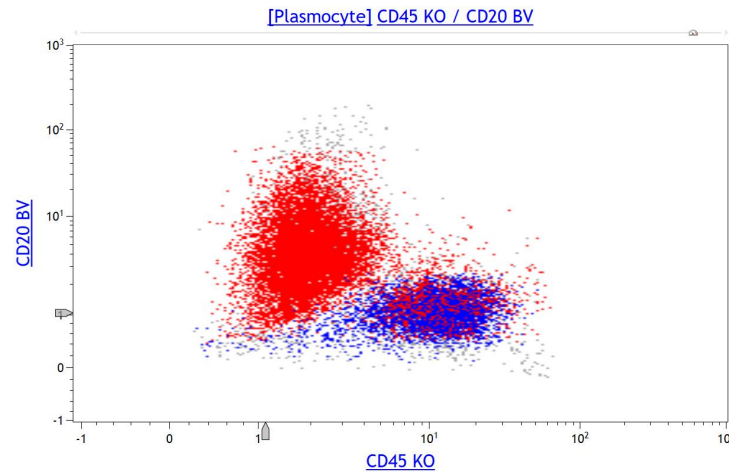
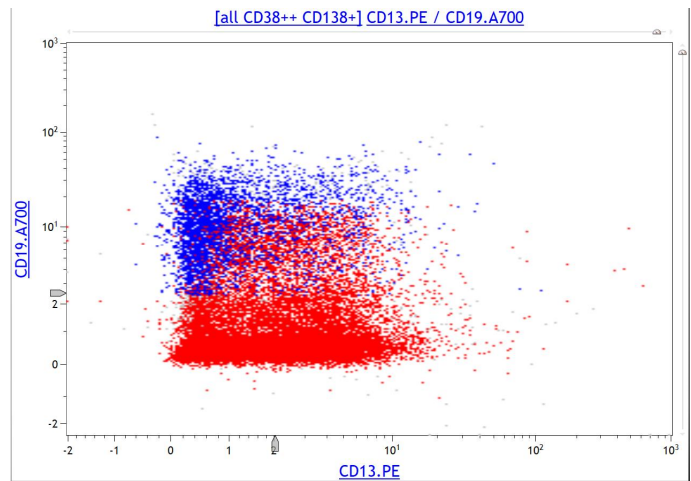
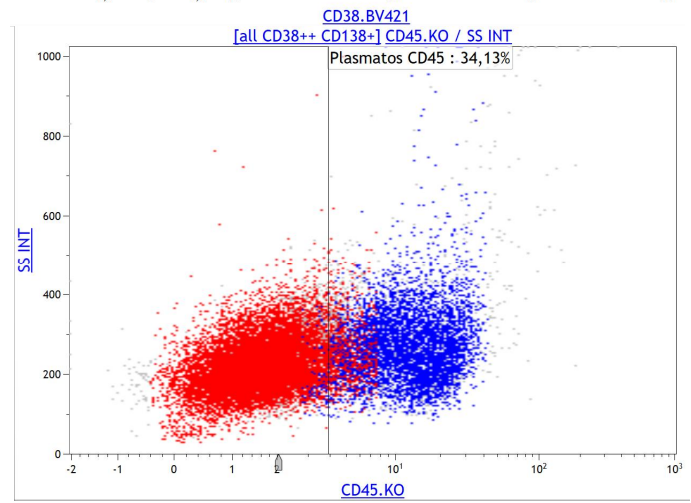
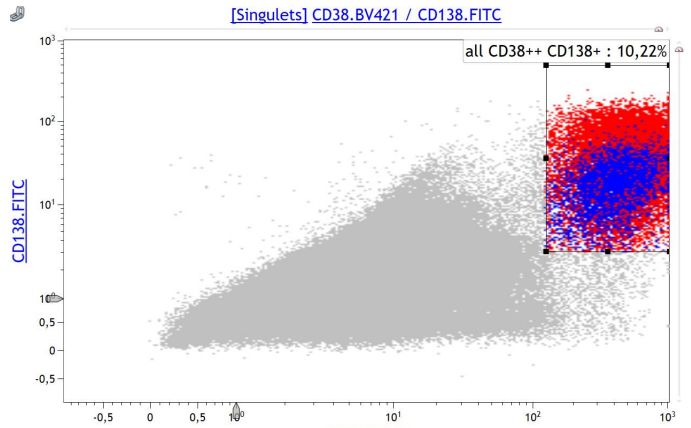
thoususlab.kz

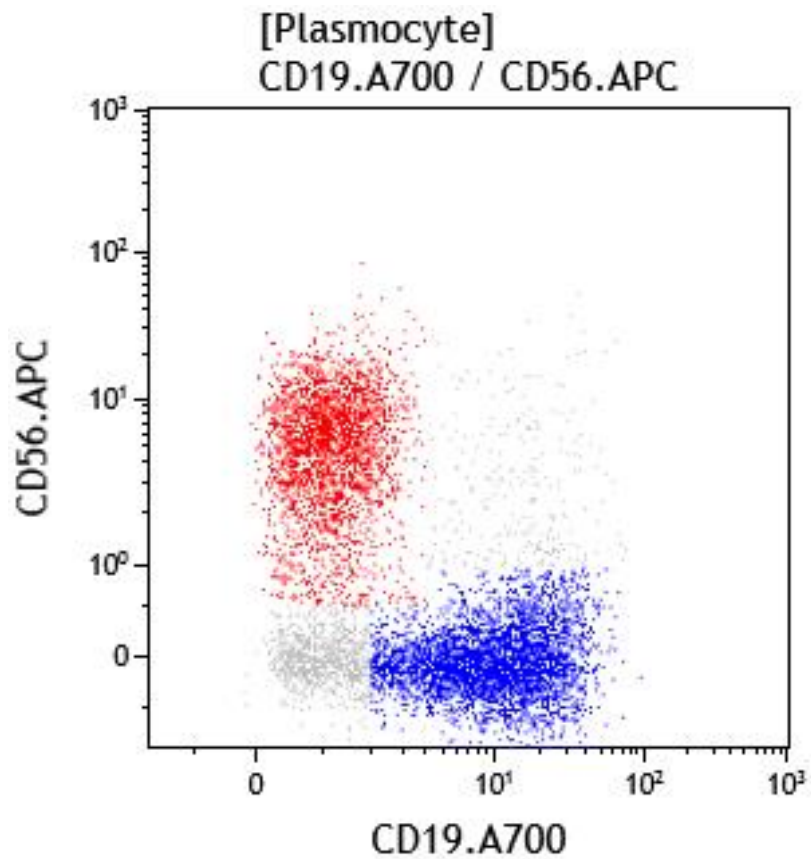
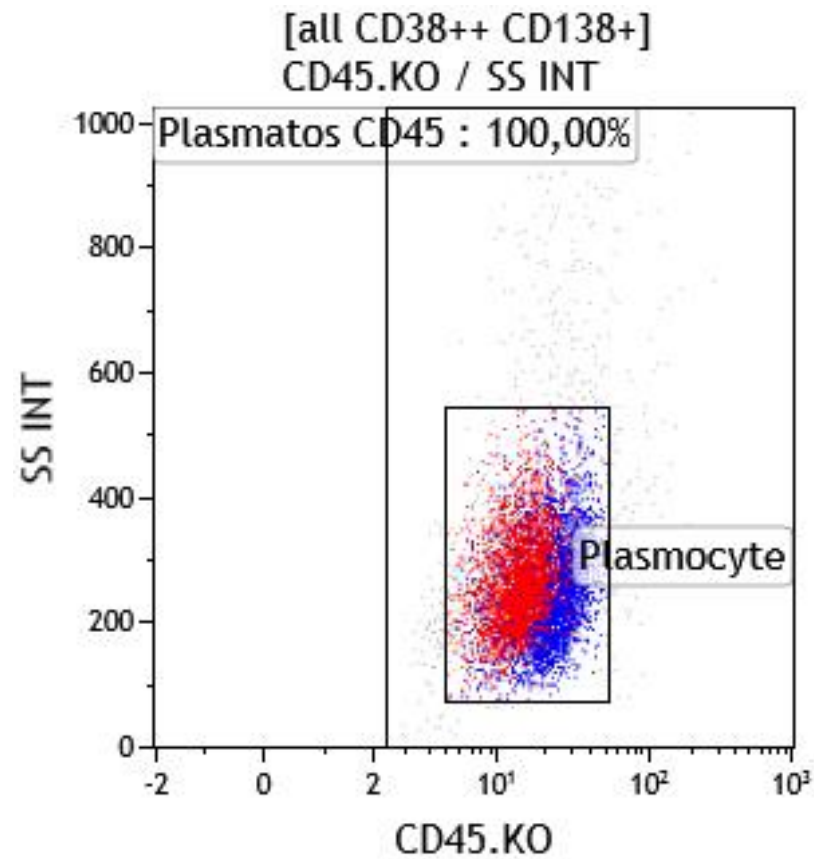
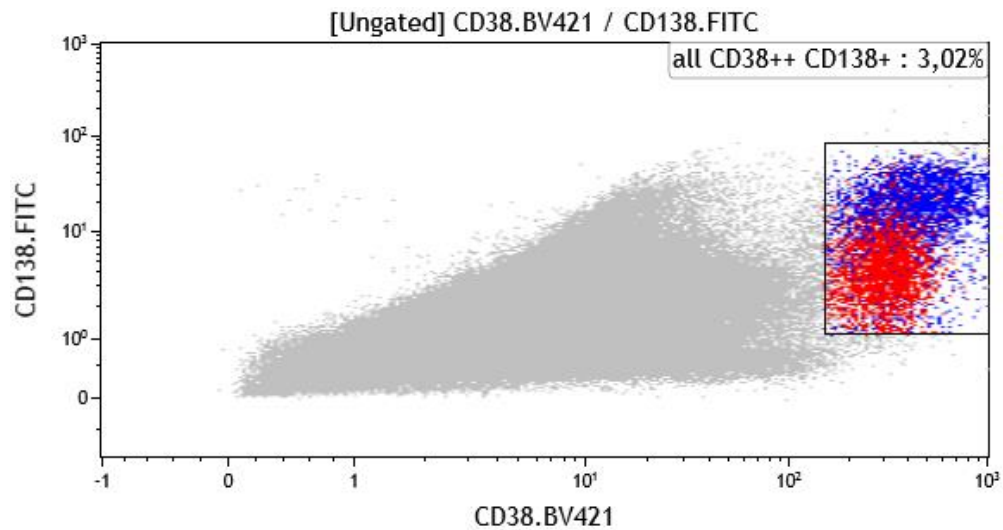


Clonal plasma cells vs Normal plasma cells

23







Apports de l'immunophénotypage

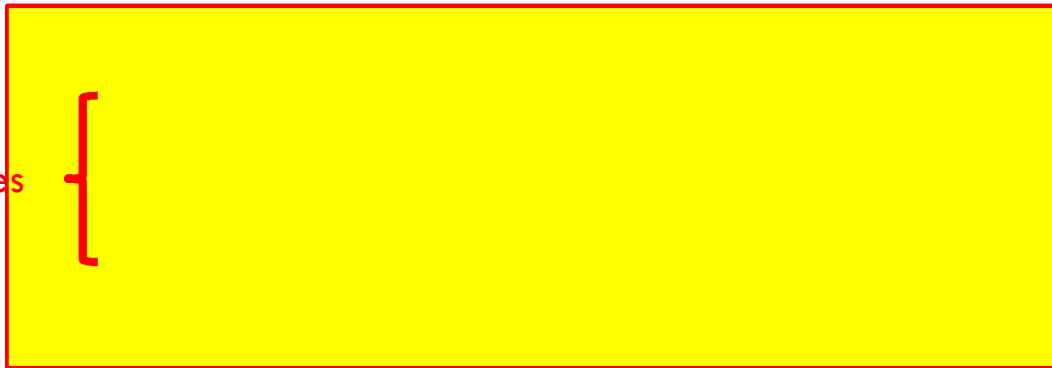
26

□ **Évaluation primaire** au diagnostic

1/ Plasmocytes Monoclonaux vs réactifs vs lymphome

- Établissement du phénotype plasmocytaire anormal
 - Détection d'une population B/T anormale
- Diagnostic différentiel: plasmacytose réactive, LNH-B avec différenciation plasmocytaire (LPL, WM, LZM), MM à IgM, δ

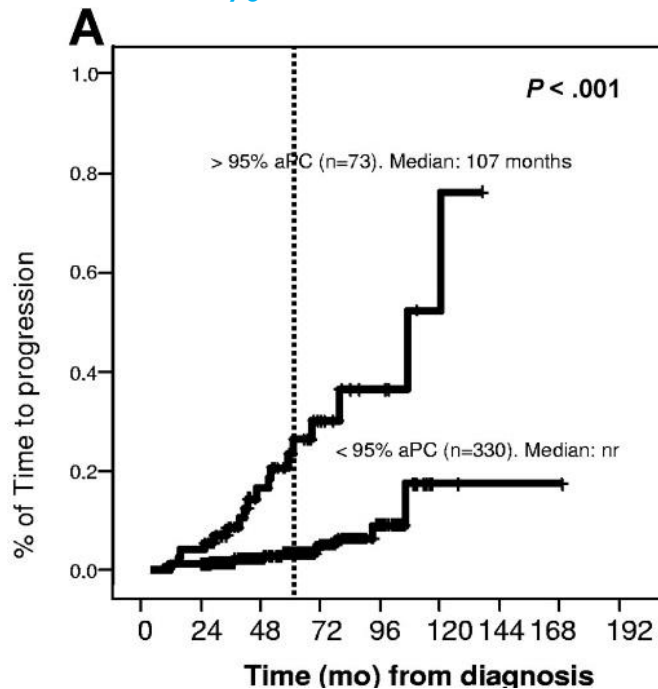
Quantitatives



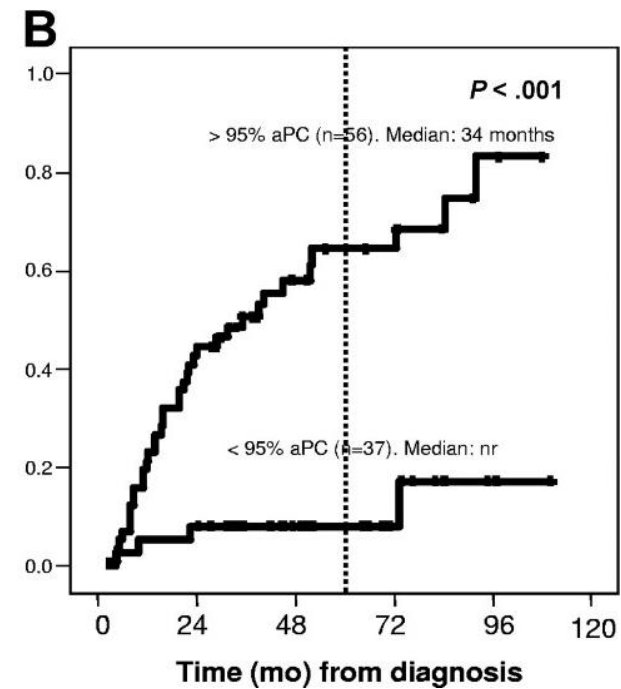
Informations Pronostiques Quantitatives

27

1. % de PCs Monoclonaux parmi le compartiment Plasmocytaire → Cut-off: 95%



MGUS



SMM

Pérez-Persona E et al. Blood 2007 110; 2586-2592.

MGUS-like MM: ayant >5% de Plasmocytes polyclonaux résiduels

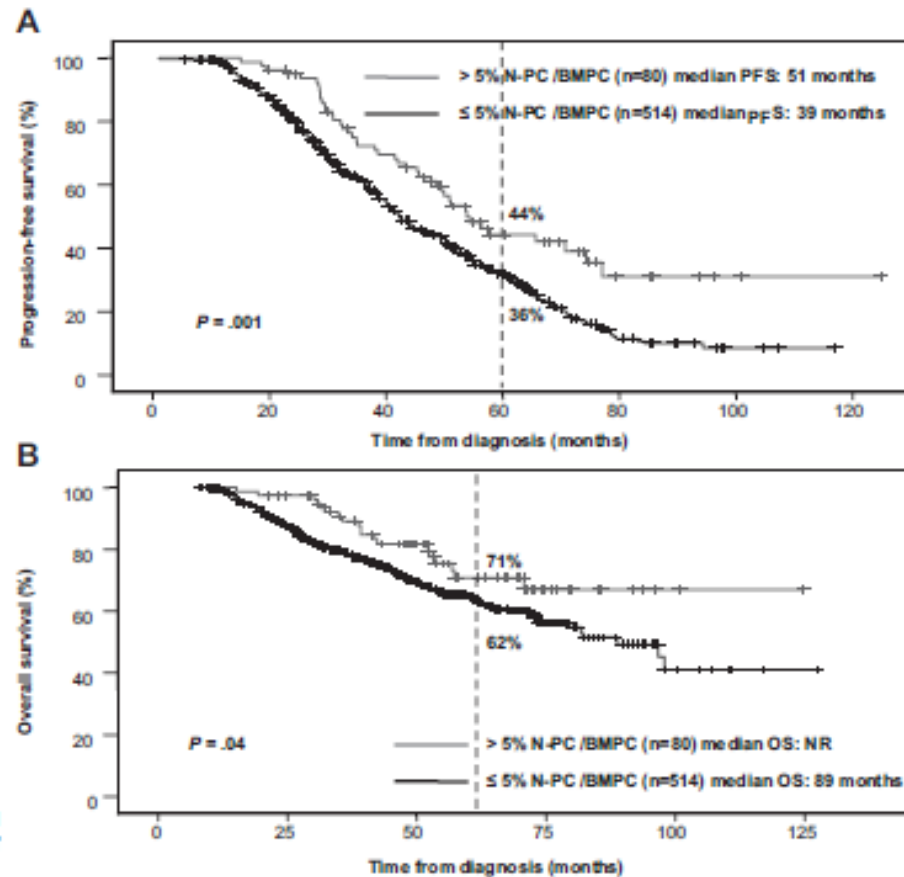


Figure 1. PFS and OS of symptomatic MM patients grouped according to the presence (N = 80) or absence (N = 514) of more than 5% N-PCs/BMPCs at diagnosis. (A) PFS. (B) OS.

Informations Pronostiques Quantitatives

29

2. Taux de Plasmocytes Circulants (cPCs)

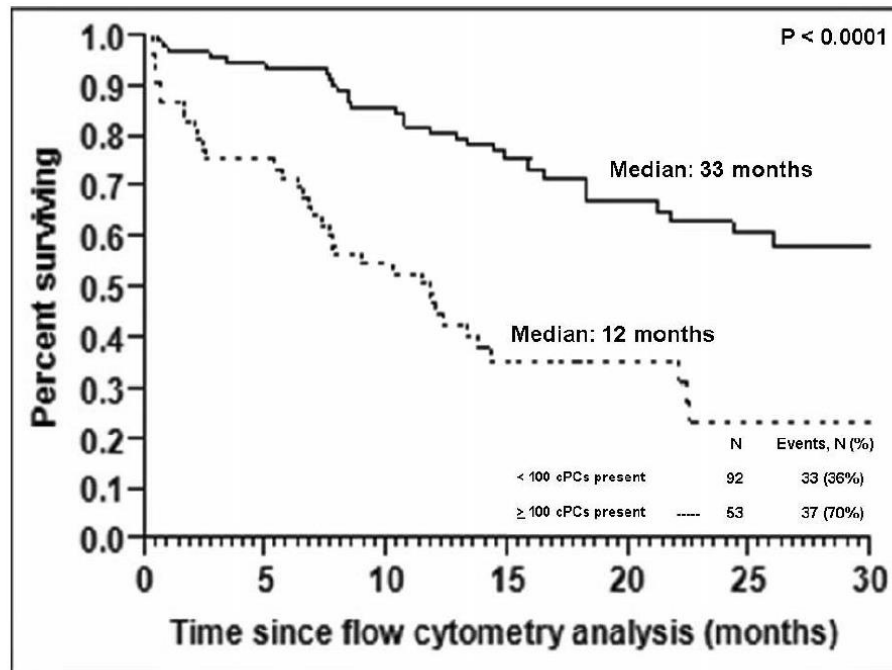
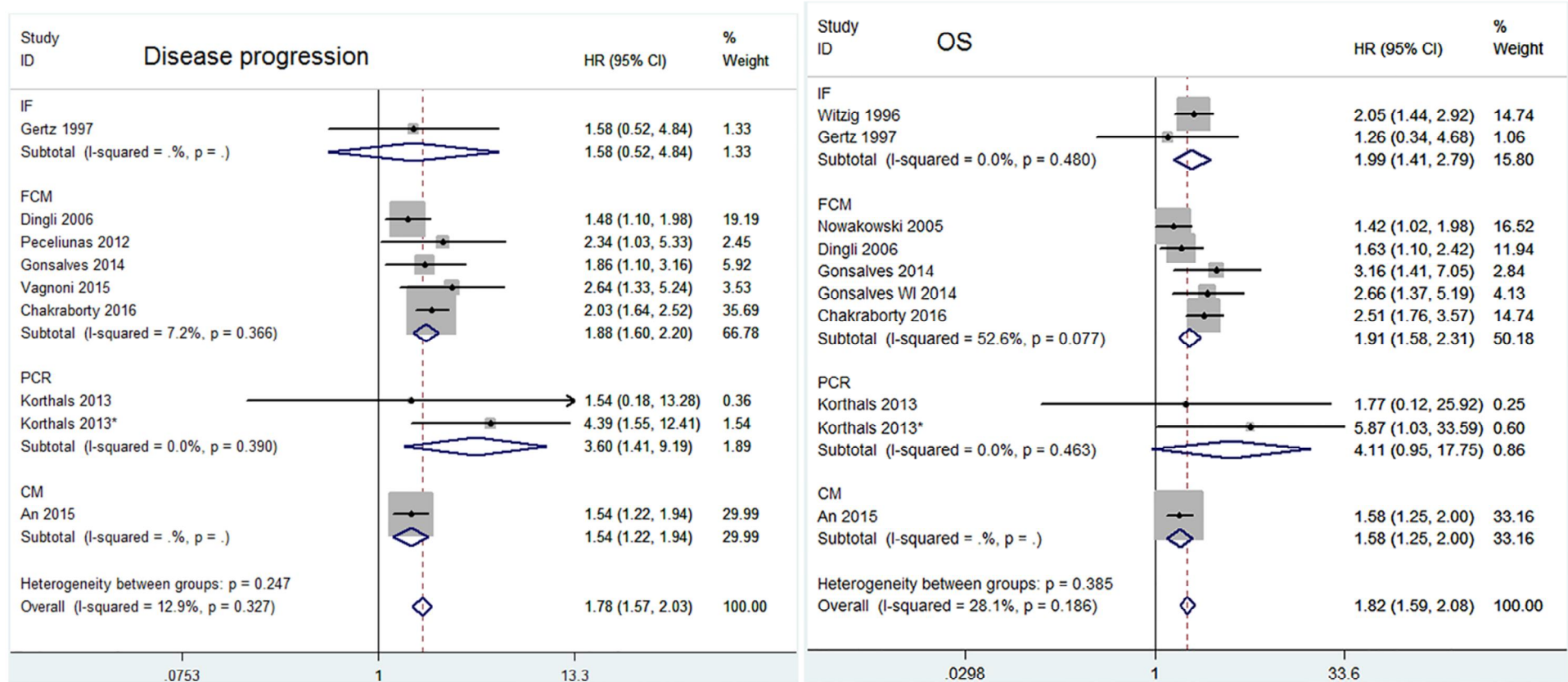


Figure 2. Shows the Kaplan-Meier Curve for survival from the time of peripheral blood flow cytometry analysis in all previously treated patients with actively relapsing disease based on the presence of circulating plasma cells (cPCs) based on the presence of 100 or more cPCs.

Gonsalves WI et al. Br J Haematol 2014; 167:500-5

2. Présence de PCs anormaux/monoclonaux circulants



Jia Li et al. PLOS One 2017 12(7).

Cut-off? Absence de consensus;

Absence de consensus et de standardisation au niveau de la **sensibilité analytique** à atteindre

Informations Qualitatives

pronostiques

31

- **CD117+**: récepteur c-KIT: **bon pronostic**

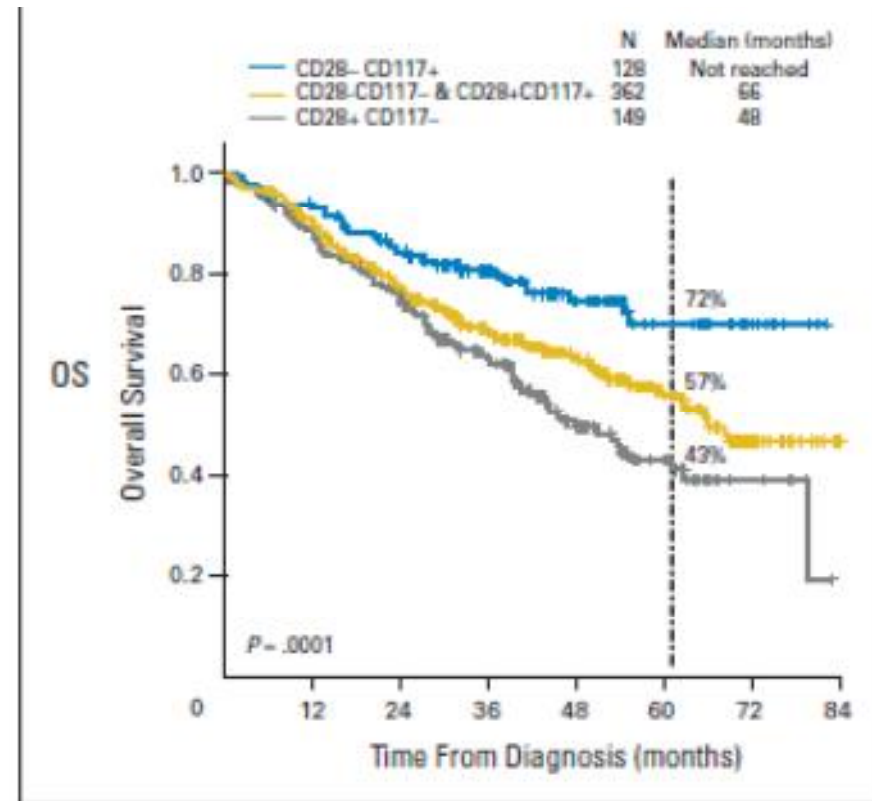
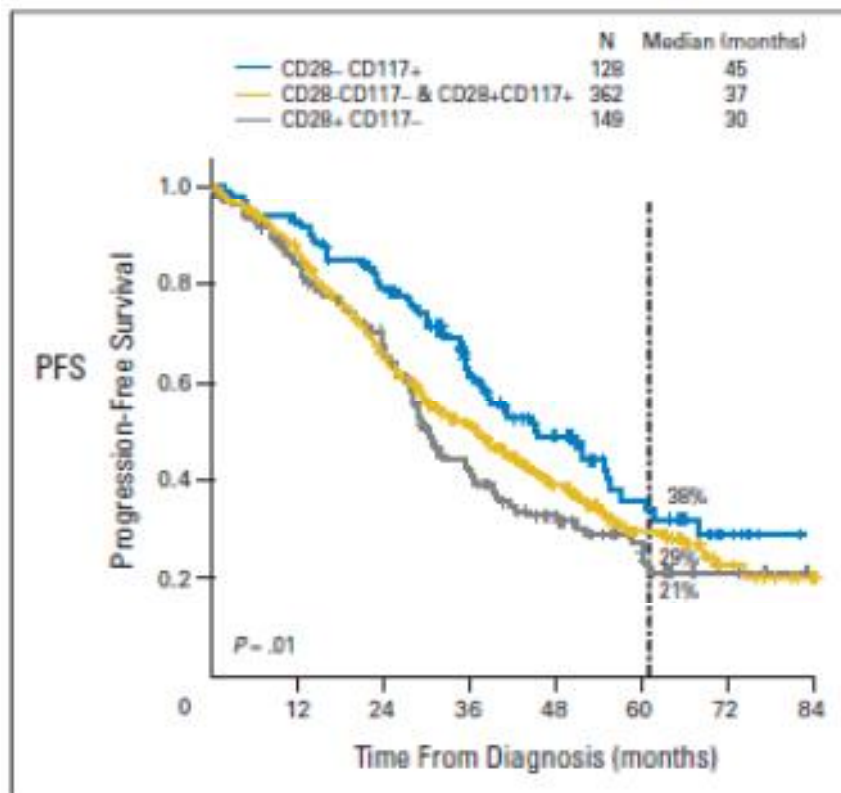
(Edling CE et al. Int J Biochem Cell Biol 2007;35. Schmidt-Hieber M et al. Haematologica 2011; 96)

- **CD28+**: Récepteur co-stimulateur T: **mauvais pronostic**

(Murray ME et al. Blood 2014; 123)

→ 3 groupes:

- **Mauvais CD28+/CD117-**
- Intermédiaire CD28+/CD117+ ou CD28-/CD117-
- **Bon CD28-/CD117+**

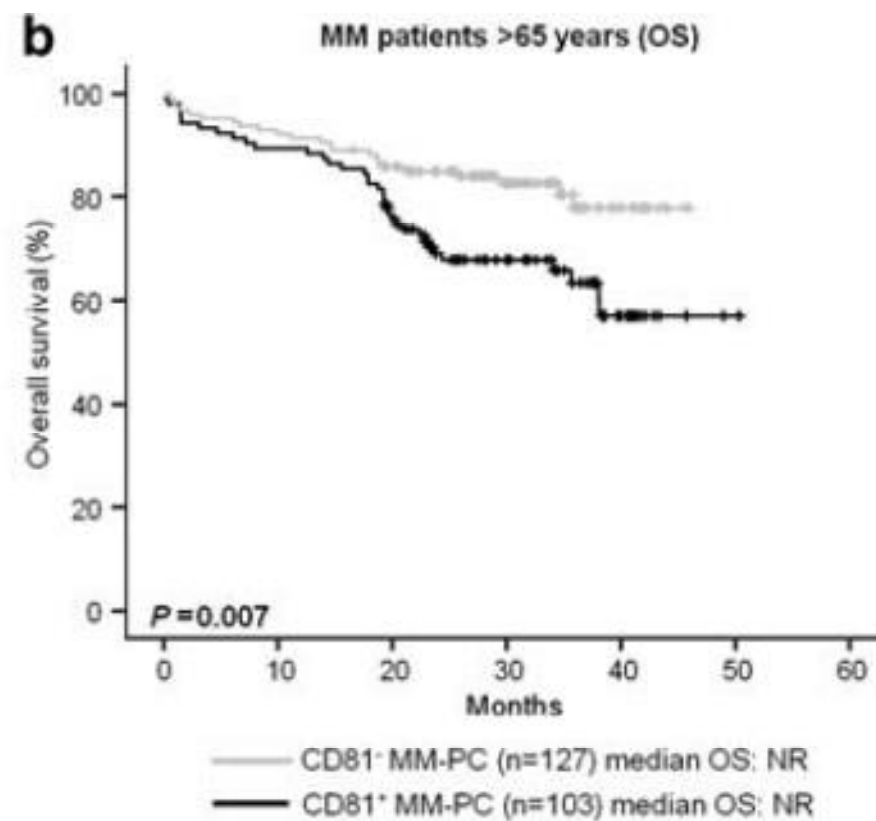
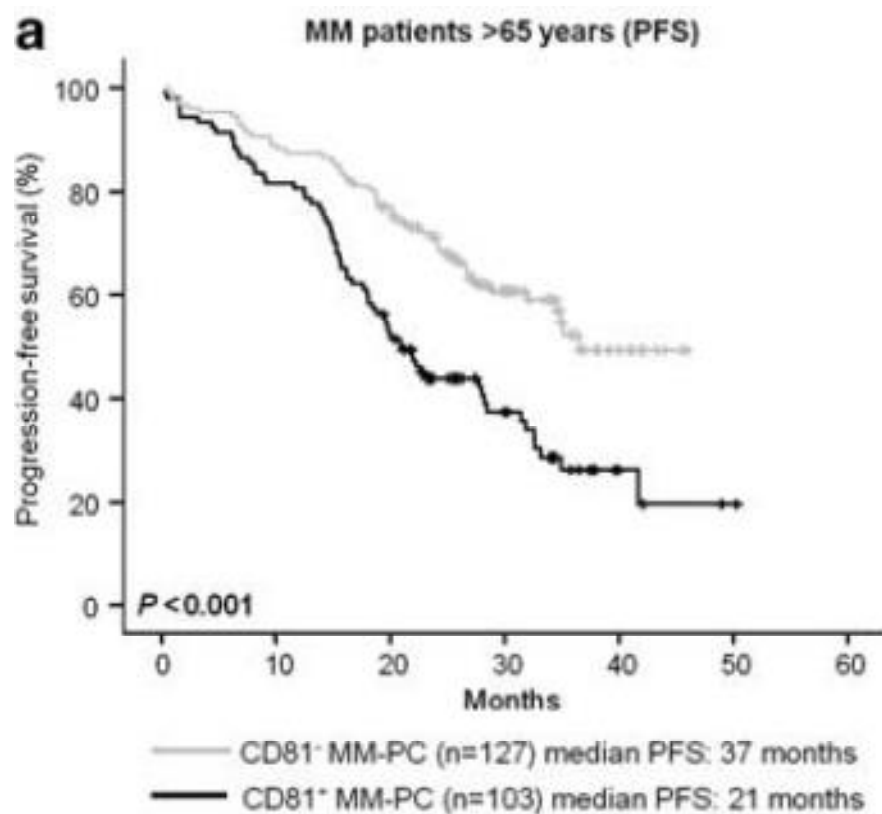


Mateo G et al. Journ of Clin Oncology 2008;26.

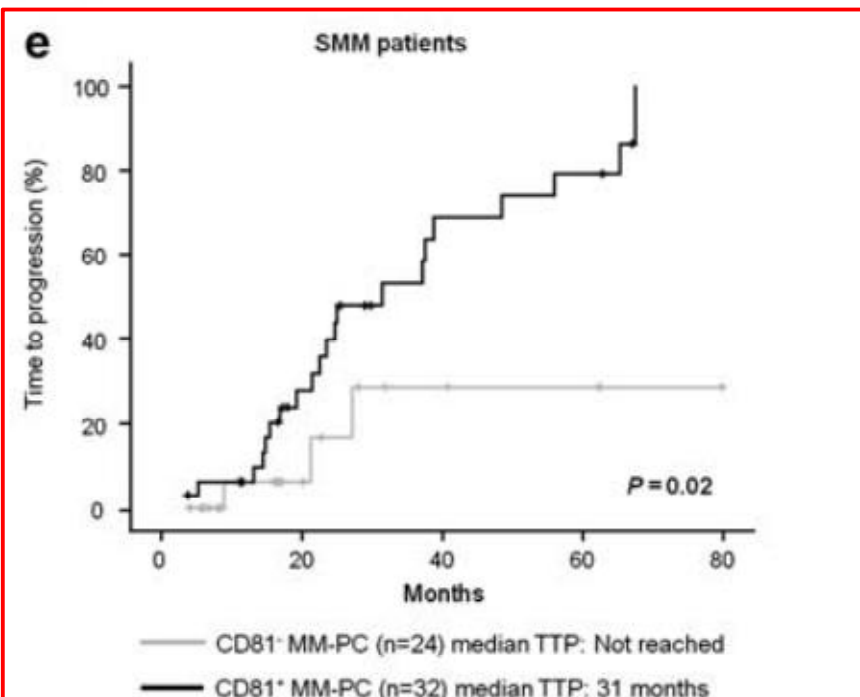
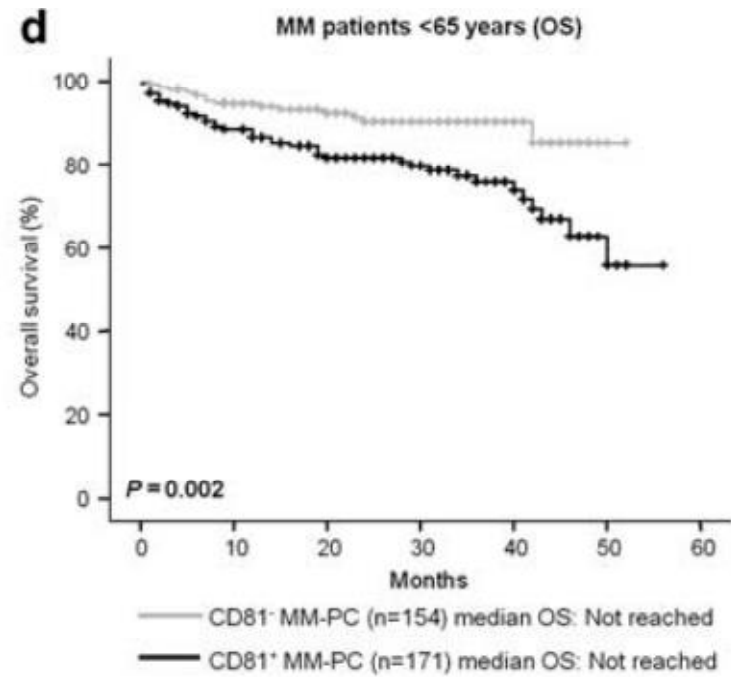
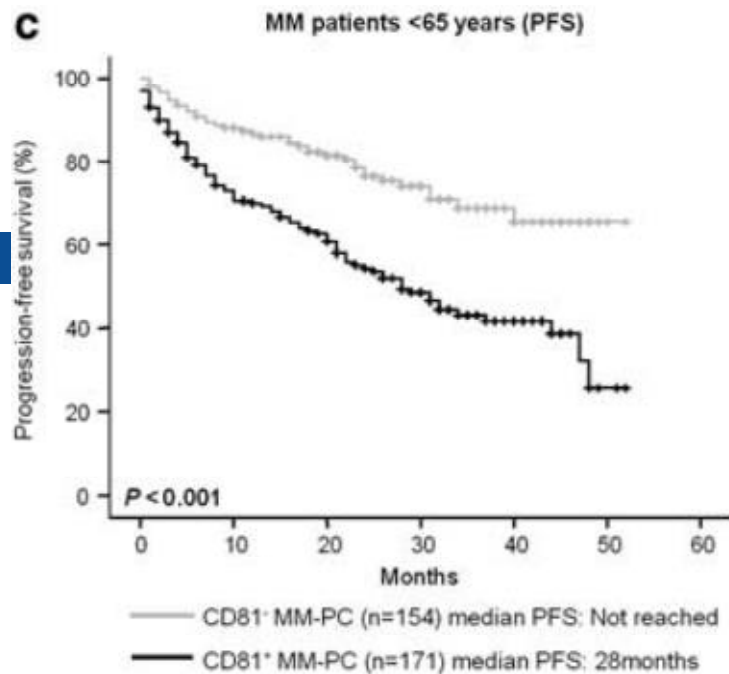
Expression du **CD28** joue comme **signal Pro-survie** des cellules myélomateuses en interagissant avec les *ligands* CD80/CD86 sur les cellules dendritiques (DC), facilitant l'expression des **cytokines supportives** telles IL-6 et IL-8, et de l'**enzyme immunosuppressive IDO**.

CD81: facteur pronostic

33



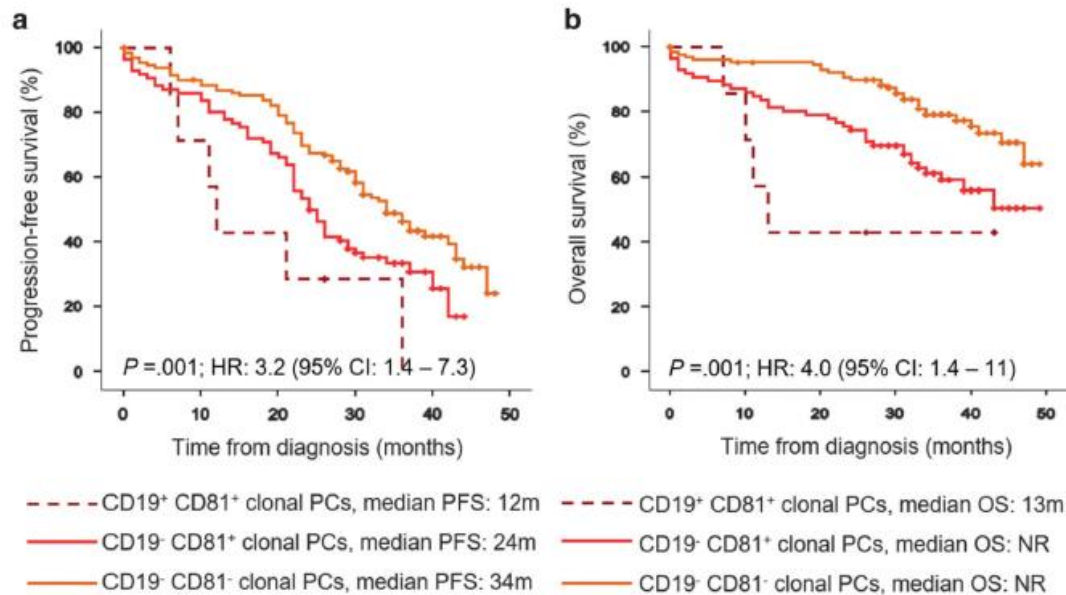
Paiva B et al. Leukemia 2012;
26(8): 1862-1869



Paiva B et al. Leukemia 2012;
 26(8): 1862-1869

Association marqueurs et pronostic?

35



Profile **CD19/CD81**: 3 sous-types:

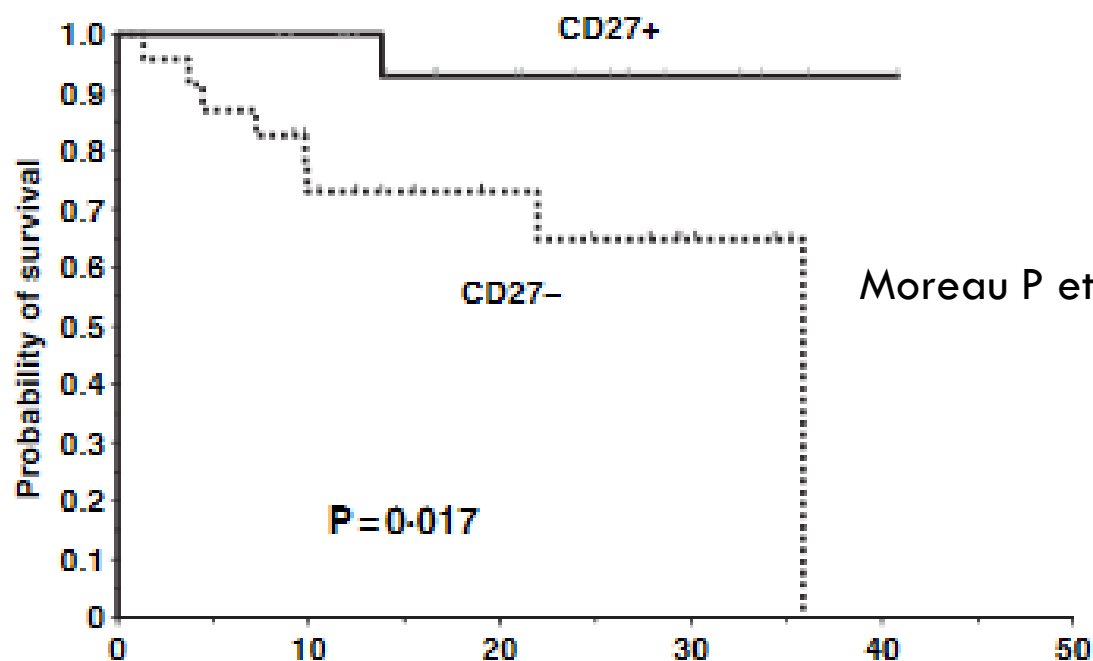
- **Différencié CD19^{neg} CD81^{neg}**
- **Intermédiaire CD19^{neg}CD81⁺**
- **Moins différencié CD19⁺CD81⁺**

N = 225 nouveaux diagnostics de MM

Paiva B et al. Leukemia 2017; 31:382-392.

CD27: marqueur pronostic

36



N= 101 patients

Moreau P et al. Br J Haematol 2006, 132.

Autres observations: MM CD27 nég expriment plus le **CD221 (IGF-R)** et associent plus souvent à **t(4;14)** → agressif MM?

Autres marqueurs d'intérêt pronostique

37

- **CD56**: L'expression du CD56 serait de meilleur pronostic (Ying Pan et al. Leukemia Research 40 (2016) 77-82)
- **CD200** (Glycoprotéine membranaire MRC OX-2, membre de la superfamille des Ig) : absent sur les PCs normaux, positif dans 65-86% des cas de gammopathie.
 - *L'intérêt pronostic de CD200 est sujet à **controverse**:*
 - Moreaux J et al. Blood 2006: patients MM avec PCs CD200 (-) ont une meilleure survie que le groupe CD200 (+) → L'absence du CD200 est meilleure
 - Alapat D. et al. Am J Clin Pathol 2012; 137: CD200 (-) serait associé à un score génétique plus défavorable et à une pathologie plus agressive.

Facteurs pronostiques de CFM

38

- Marqueurs Pronostiques **Qualitatifs**
 - CD19, CD27, CD28, CD117, CD56, CD81

- Marqueurs Pronostiques **Quantitatifs**
 - % de PCs monoclonaux (parmi tous les PCs) →
MGUS/SMM high risk (>95% aPCs) ou MM MGUS . like (<95% aPCs)

 - Taux de PCs circulants → pronostic plus défavorable

Conclusion

39

- Beaucoup de pistes de marqueurs de mauvais pronostic dans un nouveau diagnostic de MM mais peu d'études sur le risque d'évolution d'un SMM vers un MM sauf CD81 (Paiva et al. Leukemia 2012)
 - L'intérêt d'une vaste étude d'évaluation de l'intérêt pronostic de différents marqueurs dans la prédictivité d'évolution d'un SMM/MGUS vers un MM
- % *PCs monoclonaux parmi le compartiment plasmocytaire médullaire* « officiellement » reconnu comme facteur de mauvais pronostic indépendant d'évolution du SMM

Merci pour votre attention!

Discrimination immunophénotypique: Plasmocytes normaux vs pathologiques

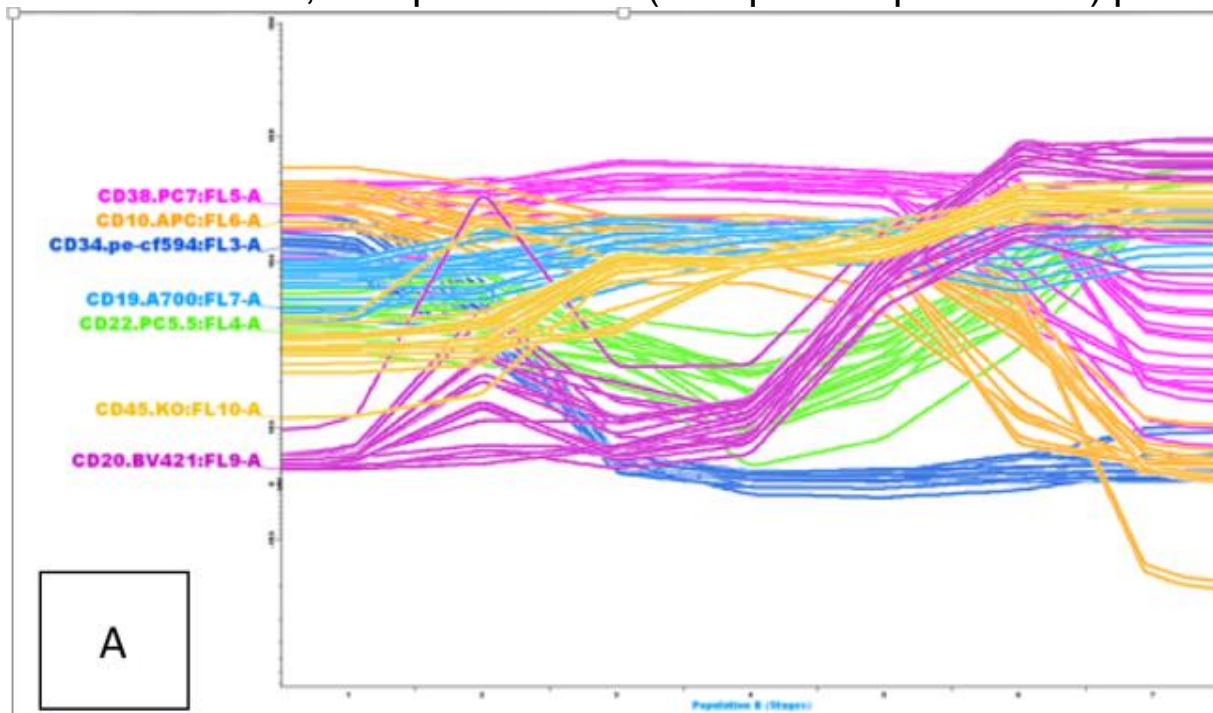
21

- **CD19**: marqueur B (pro-B à PCs). La diminution d'expression du CD19 est souvent liée à une altération d'expression du gène PAX-5 (facteur de transcription des protéines activateurs B).
 - *95% des PCs anormaux perdent l'expression du CD19*, mais ò
 - *Seulement 70% des PCs normaux expriment CD19*

Discrimination immunophénotypique: Plasmocytes normaux vs pathologiques

22

- **CD20**: marqueur B apparaissant plus tard que le CD19 et le CD22 durant la maturation B, lorsque le CD34 (marqueur d'immaturité) perd son expression.



N. Gorra, mémoire de fin d'étude
Pharmacie 2018, LHUB-ULB.

- PCs normaux perdent l'expression du CD20, **1/3 des PCs anormaux sont CD20+**
- Expression du CD20: souvent associé à une morphologie plasmocytaire mature, petits PCs ou lymphoplasmocytaire avec t(11:14) (Ref: R. Bataille et al. Trends in Hematology 2006)

Discrimination immunophénotypique: Plasmocytes normaux vs pathologiques

23

- **CD27**: protéine faisant partie des récepteurs du TNF. Rôle dans la différenciation des lymphocytes B en PCs. Marqueur Mémoire de la lignée B (son expression est limitée aux cellules du centre germinale, aux cellules B mémoires et aux PCs). *Expression du CD27 souvent diminuée* (40-68% des cas) dans les MMs.
- **CD28**: marqueur d'activation T. CD28 n'est pas exprimé sur les PCs normaux, il est rarement exprimé sur les PCs d'un MGUS, *Positif dans 1/3 des cas de MMs*.
→ Marqueur pronostic de MM agressif

Discrimination immunophénotypique: Plasmocytes normaux vs pathologiques

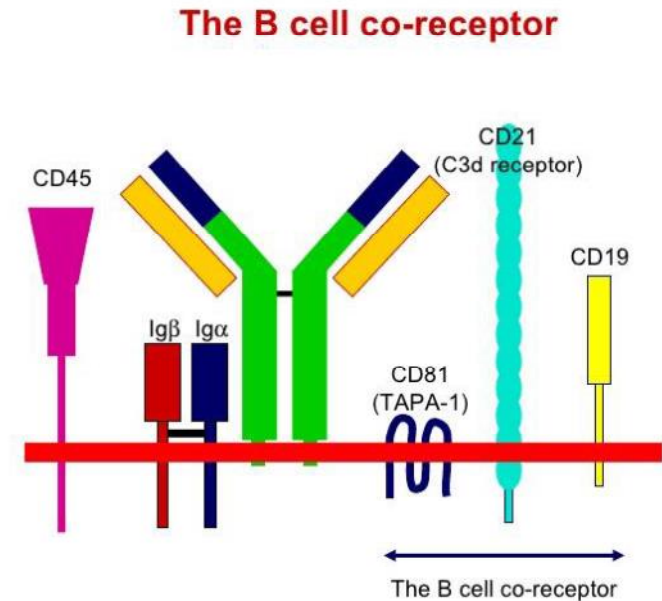
24

- **CD45**: marqueur Pan-leucocytaire. CD45 généralement + sur les PCs normaux. Sur les PCs néoplasiques, l'expression du CD45 peut être **dim ou nég.**
- **CD56**: molécule d'adhésion NCAM, impliqué dans l'ancrage des PCs myélomateux au stroma médullaire. CD56 souvent **+ sur les PCs myélomateux**, nég sur les PCs normaux. L'expression du CD56 dans les MM serait de meilleur pronostic de évolution. (Ying Pan et al. Leukemia Research 40

Discrimination immunophénotypique: Plasmocytes normaux vs pathologiques

25

- **CD81**: membre de la famille des tétraspanines, largement exprimé sur les cellules hématopoïétiques, excepté les érythrocytes, PLT et PMNs. Ce marqueur est exprimé sur toutes les cellules B et forme un complexe multimoléculaire CD19-CD21-CD81 qui est impliqué dans la transduction du signal des cellules B.
- L'expression du CD81 est plus forte sur les cellules B immatures (hématogones) que sur les cellules B matures et les lymphoblastes B leucémiques (C. Nagant et al. Int J Lab Hem 2018).
- CD81 est **dim ou neg** dans les PCs myélomateux en comparaison avec les PCs normaux.



Discrimination immunophénotypique: normaux vs pathologiques Plasmocytes

28

- **CD117**: proto-oncogène **c-Kit**, normalement exprimé sur les progéniteurs myéloïdes, érythroïdes et mégacaryocytaires et mastocytes. Normalement nég sur les PCs. Dans les *MGUS*, *50% des cas expriment le CD117*; dans les *MM*, *seul 1/3 des cas expriment le CD117* (Kra M et al. Leuk Lymphoma 2004; 45(11)).
- **CD138**: **syndecan-1**, protéoglycane héparine sulfate transmembranaire, exprimé au **stade PC** de la maturation B. Fonction: récepteur du collagène, fibronectine, thrombospondine, molécule d'adhésion de cytokines proangiogéniques et facteurs de survie (IL-6, APRIL, BAFF). Les plasmocytes normaux et anormaux ont une expression forte du CD138 → *Marqueur essentiel dans l'isolation cytométrique des PCs*. L'intensité du CD138 peut être atténuée en milieu hépariné (Yang RC et al. Journ of Biol Chem 2003; 81(3)).