



Première journée

Hémopathies à pDC

LpDC et LAM-pDC, MPDCP

BPDCN et MRD-Flow

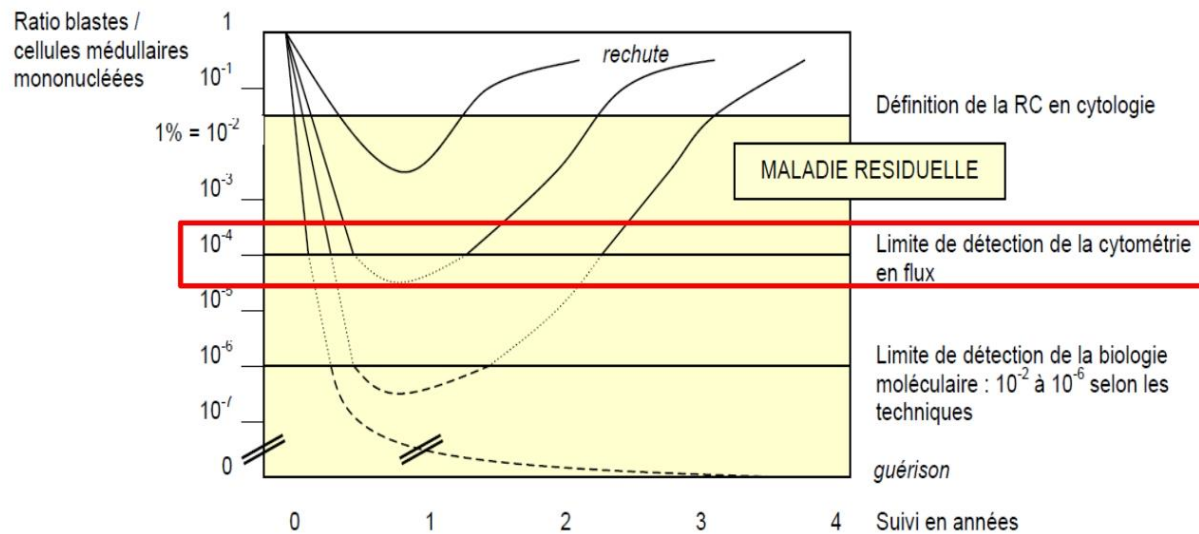
Principes, intérêts et retours sur l'expérience bisontine

Thomas FOURNET

Biologiste, Laboratoire d'Hématologie et d'Immologie cellulaire, CHU Besançon



MALADIE RÉSIDUELLE MINIMALE



- Persistance de cellules malignes en dessous du seuil de détection par les techniques conventionnelles
- Impact pronostique majeur dans les LA

Pas de consensus dans les BPDCN



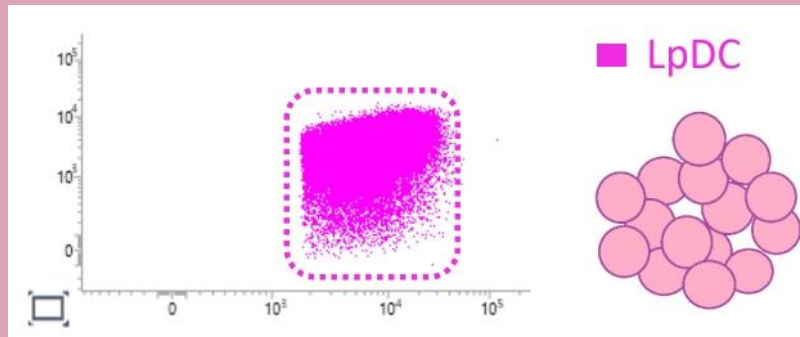
Diagnostic

Phénotypage des blastes pDC

BAP = BPDCN Associated Phenotype

Un BAP doit être :

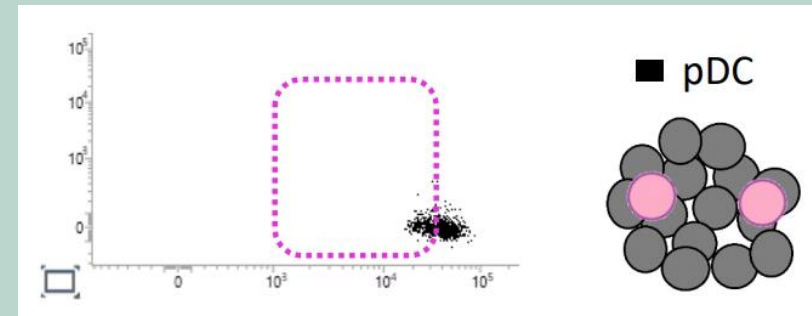
- Exprimé par > 80% des blastes
- Discriminant des pDC physiologiques
- Stable au cours du traitement



MRD

Recherche de pDC BAP+ parmi les pDC physio

MRD = Nombre de cellules typées LpDC (BAP+) / WBC45+



PROBLÉMATIQUES



Absence de recommandations pour la
MRD



Difficulté à quantifier un faible niveau
de blastes LpDC ($1 \cdot 10^{-4}$)



Chevauchement phénotypique

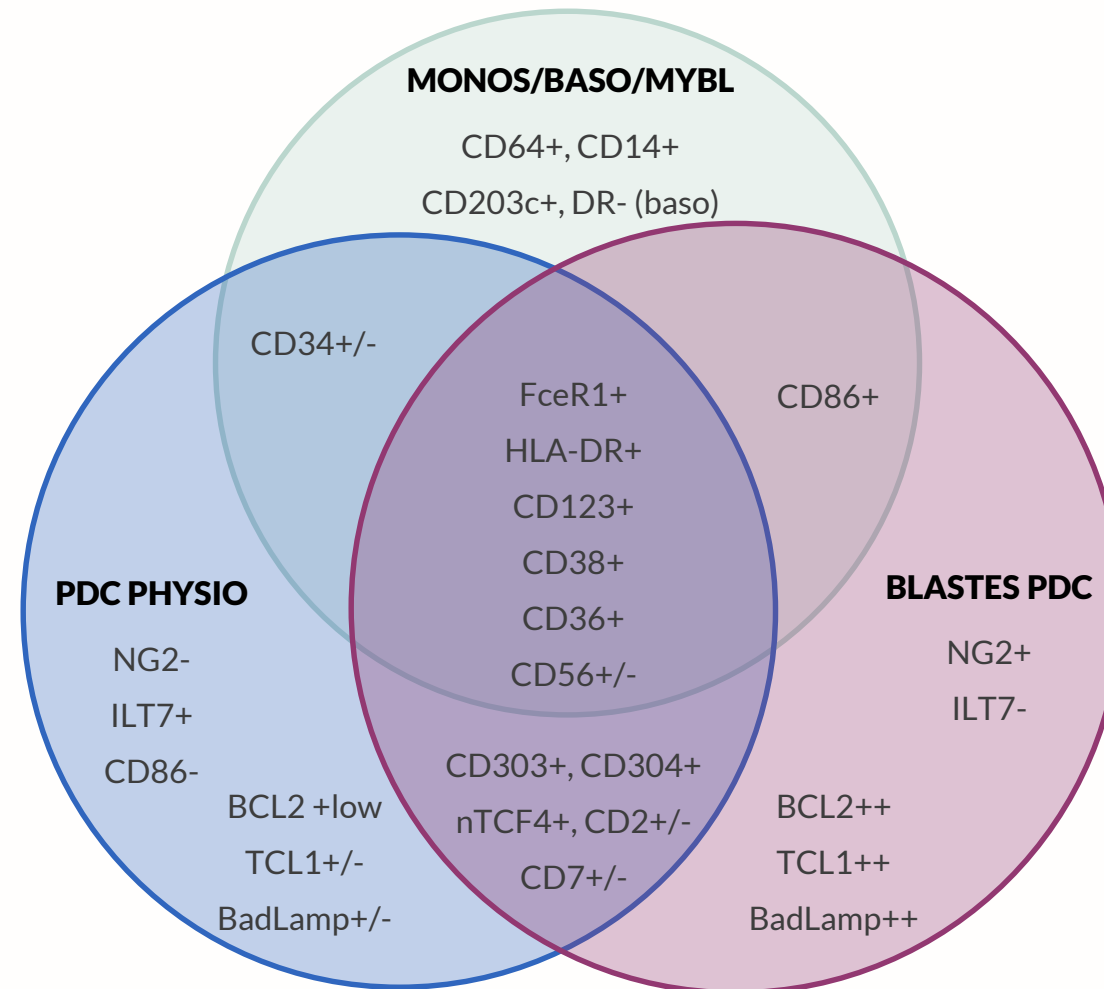
- pDC physiologiques / matures
- blastes LpDC
- autres populations (monocytes, basophiles)

Définir des BAP contributifs
Stabilité des marqueurs

Linéarité et la limite de
détection

Recherche de nouveaux
marqueurs spécifiques et
discriminants

Marqueurs phénotypiques d'intérêt dans les BPDCN





Mise au point

Etude prospective (août 2020 – septembre 2021)

Matériel

- 22 cas LpDC (collection DC 2016-27 91)
- 19 MRD
- CAL1 (lignée LpDC)
- 11 Moelles osseuses « normales » (MON)

Validation

Etude rétrospective (sept. 2021 - décembre 2024)

Matériel

- 67 cas de LpDC (inclus ou non au protocole LPDESSAI)
- 31 suivis avec MRD flow
- 6 rechutes

Marquage : 1 M de cellules / tube

Cytomètre : FACSLyric™ société BD Biosciences (USA)

Logiciels d'analyse : BD FACSuite™ Software version 1.4 et 1.5 et DIVA

CARACTÉRISTIQUES DES COHORTES



	Mise au point - BPD-CN	Mise au point - MON	Validation
Nombre de cas	22	11	67 (7 phéno diag inconnu)
Hommes	17 (77%)	6 (55%)	54 (81%)
Femmes	5 (23%)	5 (45%)	13 (19%)
Age	58 [12 - 91]	57 [2 - 82]	65 [4 - 91]
Suivis MRD	19 (10 patients)	/	107 (31 patients), médiane = 2
MRD positives	5 (3 décroissances et 2 rechutes)	/	11 (5 décroissances et 6 rechutes + 1 doute MO avec rechute neuro)
% pDC matures	?	0.24% [0.01 - 0.95]	0.18% [0 - 2]



PANELS UTILISÉS



	V450	PerCP-Cy5.5	V500	APC-H7	PE-Cy7.7	BV605	FITC	PE	APC	APCR700
T1	CD56	HLA DR	CD45	CD4	CD123	CD14	IgG	IgG	IgG2b k	
T2	CD56	HLA DR	CD45	CD4	CD123	CD14	CD303	CD304	FCeR1	CD38
T3	CD56	HLA DR	CD45	CD4	CD123	CD14	CD34	NG2	ILT7	CD7
Membranaire + Intracellulaires										
Intra T4	CD56	HLA DR	CD45	CD4	CD123	CD14		cdG2b k	cdG1 k	
Intra T5	CD56	HLA DR	CD45	CD4	CD123	CD14		cTCL1	cdlamp AF6	CD2

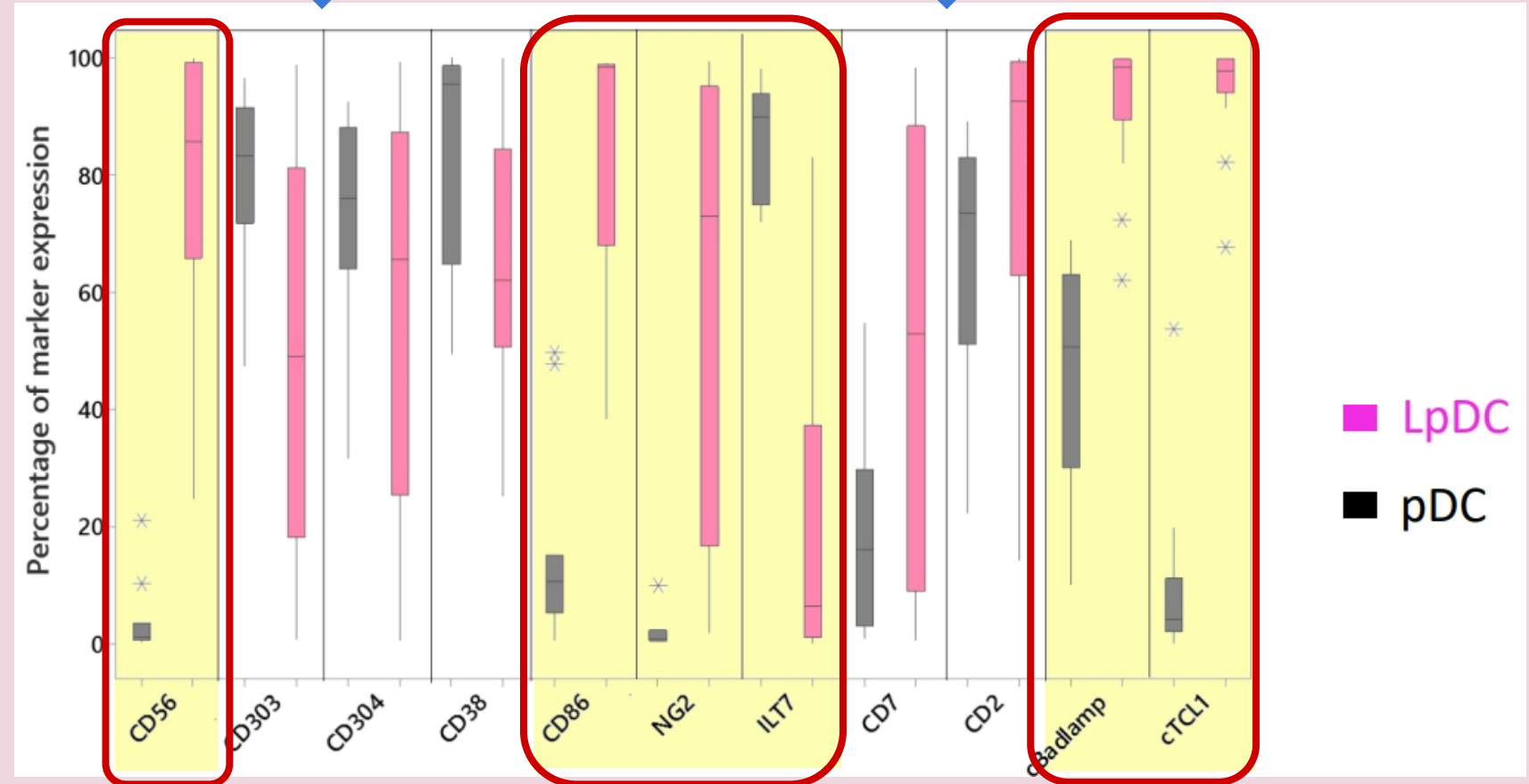
- Echantillons patient : moelle ou sang EDTA, peau, LCR
- Marquage : 1 million de cellules par tube



COHORTE DE MISE AU POINT

MARQUEURS D'INTÉRÊT DANS LA MRD

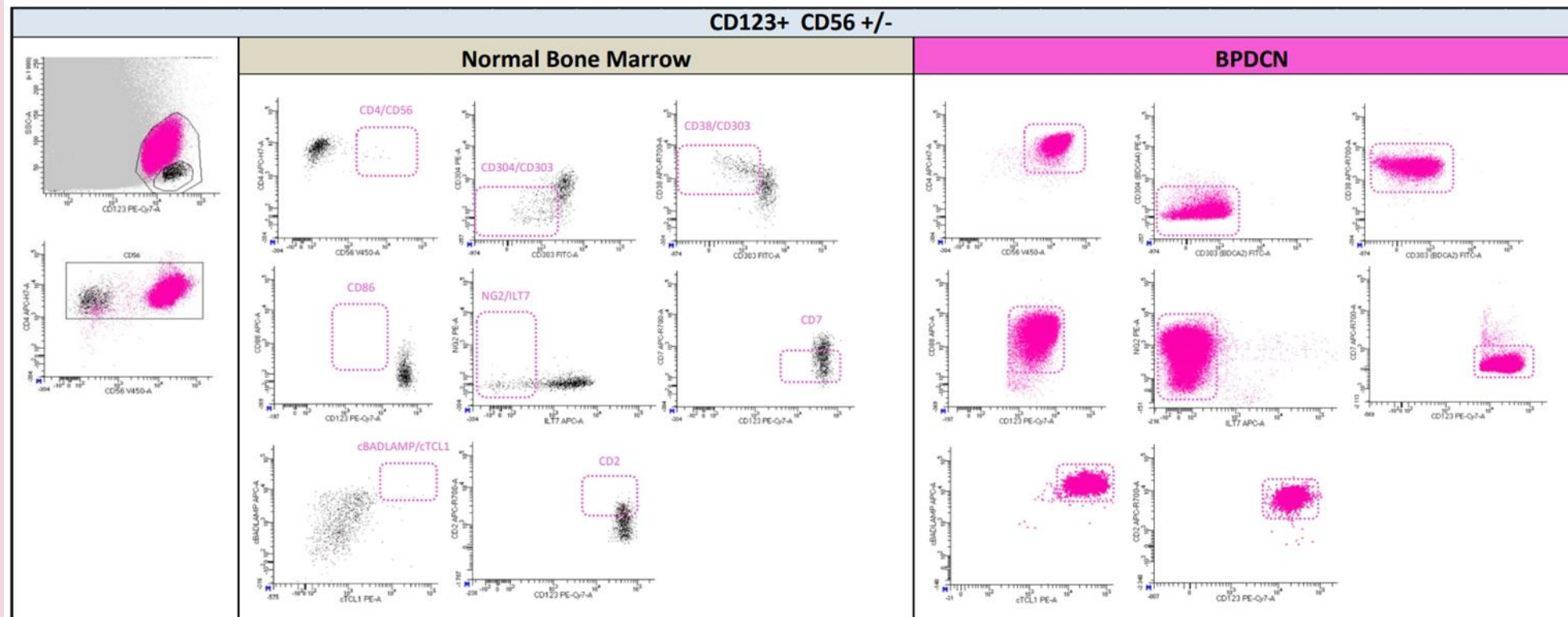
- CD56
- CD86
- NG2
- ILT7
- cBadLamp
- cTCL1





COHORTE DE MISE AU
POINT

CHOIX
DES BAP

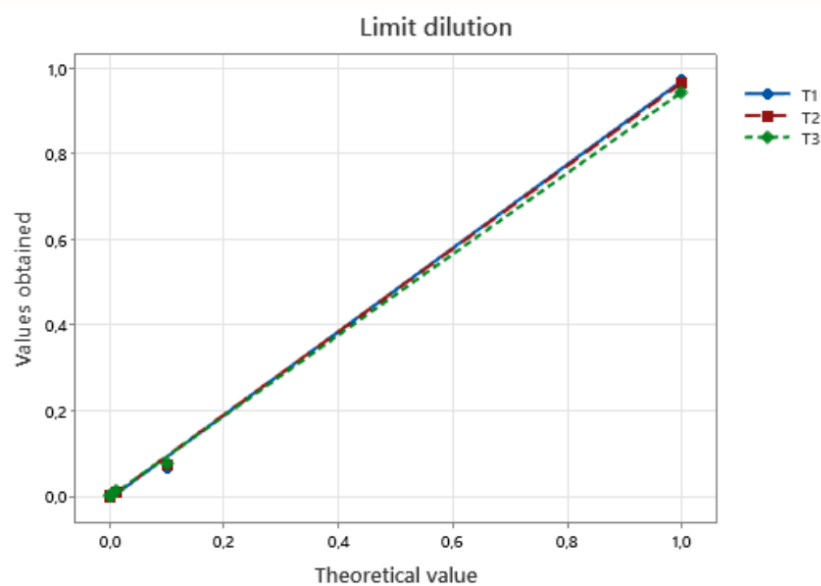


BAP	Applicability BPDCN cases contributive (%)			Quantification of cells presenting the BAP in normal BM			Maximum sensitivity of BAP based in MRD detection
				MEAN	±	SEM	
CD38+low CD303+low	6 / 21	(29%)		1,2E-04	±	8,1E-05	2,9E-04
CD304+ ET CD303+low	18 / 21	(86%)		1,3E-03	±	8,2E-04	2,9E-03
CD38+low CD303+low CD304+	6 / 21	(29%)		1,1E-04	±	7,9E-05	2,7E-04
NG2+ ILT7-	9 / 19	(47%)		3,7E-05	±	1,9E-05	7,5E-05
cTCL1+	18 / 18	(100%)		1,5E-03	±	6,2E-04	2,8E-03
cBadlamp+	17 / 18	(89%)		2,2E-03	±	6,0E-04	3,4E-03
cTCL1+ cBadlamp+	15 / 18	(83%)		2,4E-05	±	1,7E-05	5,8E-05



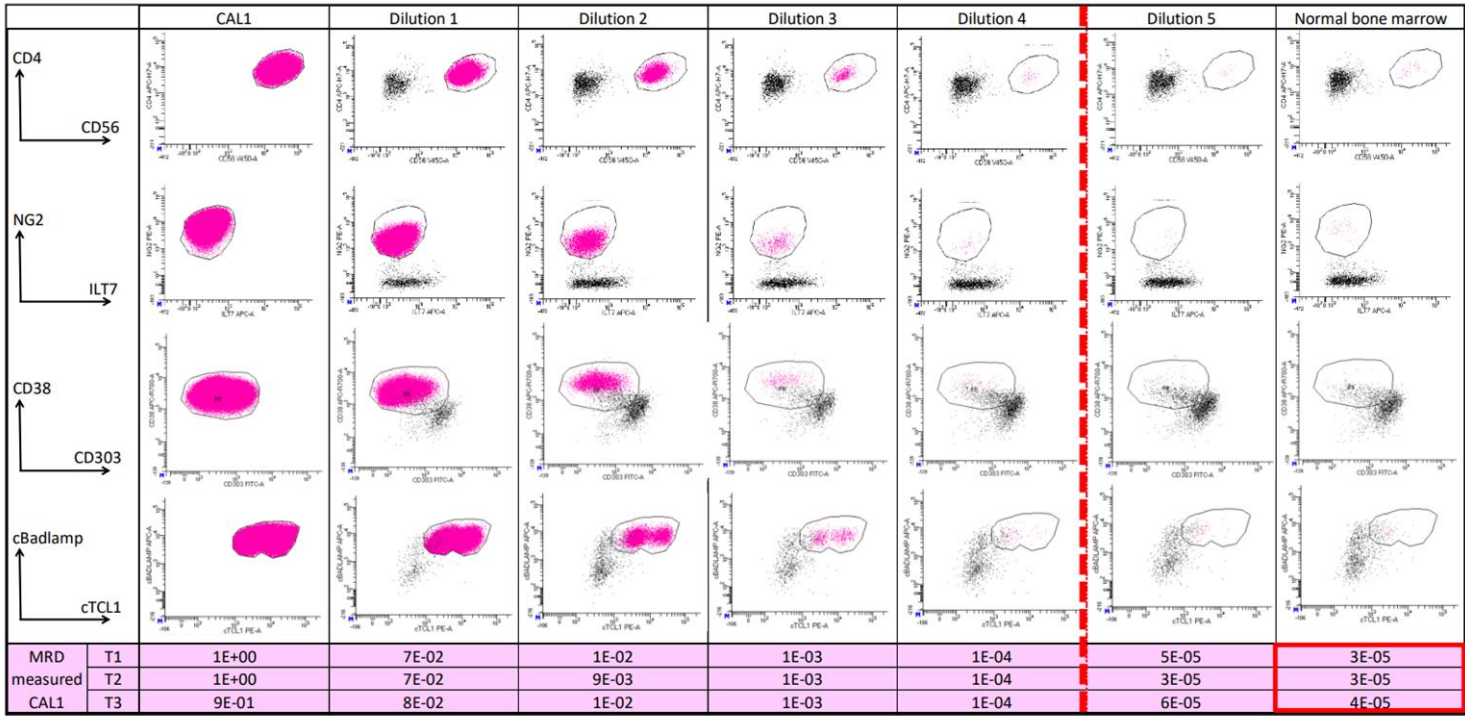
COHORTE DE MISE AU
POINT

LINÉARITÉ ET LOD



$$r^2 = 0,99$$

Linéaire jusqu'à 4E-5



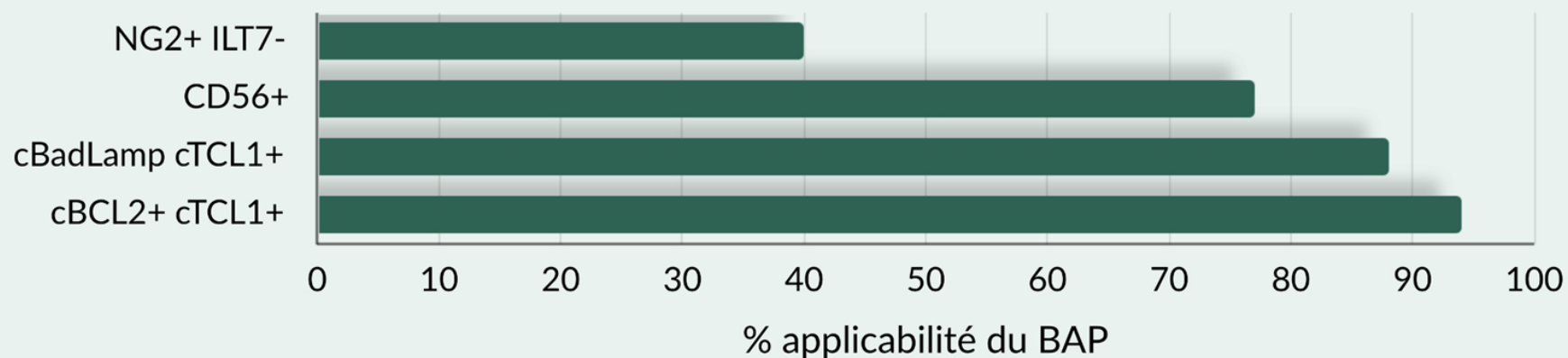
< 1E-4 : évènements non spécifique dans le BAP



COHORTE DE VALIDATION

APPLICABILITÉ DES BAP

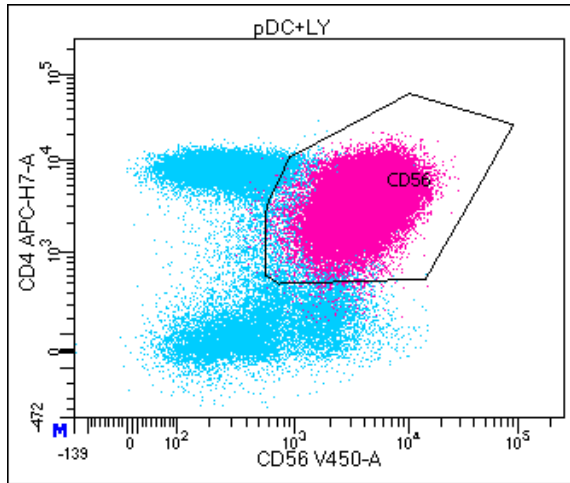
	Négatif (%)	Partiel/faible (%)	Positif (%)
CD56 (N = 60)	2	21	77
CD303 (N = 58)	26	41	33
CD304 (N = 58)	16	36	48
CD38 (N = 48)	29	42	29
FceR1 (N = 57)	2	19	79
ILT7 (N = 57)	82	16	2
NG2 (N = 58)	22	38	40
CD34 (N = 35)	0	7	0
cTCL1 (N = 59)	0	10	93
cBCL2 (N = 33)	0	0	90
cBadLamp (N = 59)	100	0	100
CD7 (N = 51)	55	27	18
CD2 (N = 54)	22	31	46



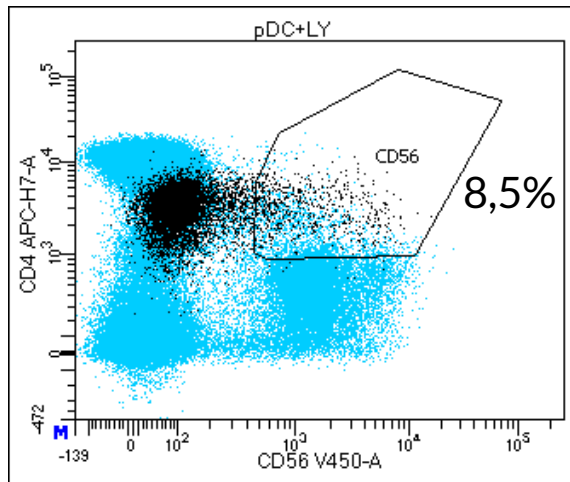
LE CD56 EST IL SUFFISANT POUR LA MRD-FLOW ?



Diagnostic

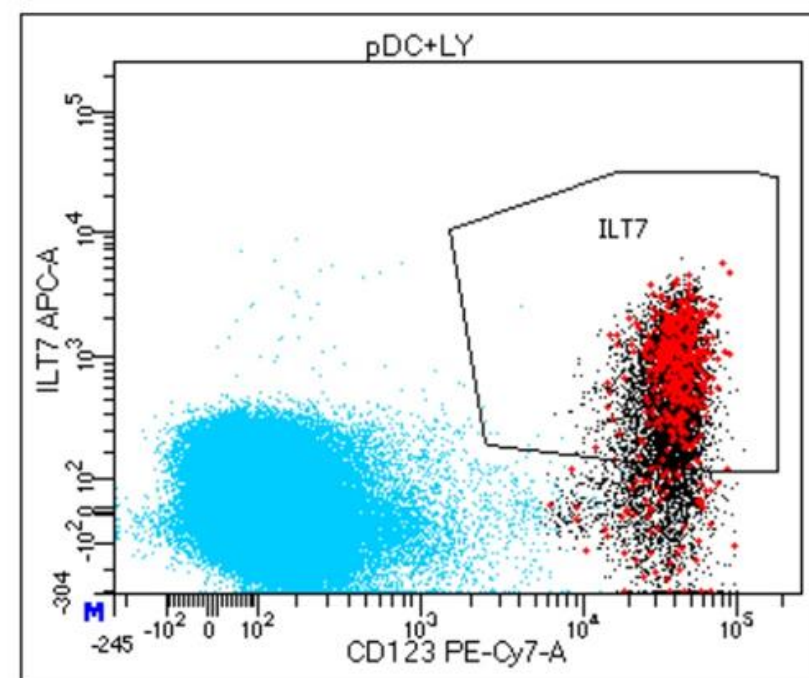
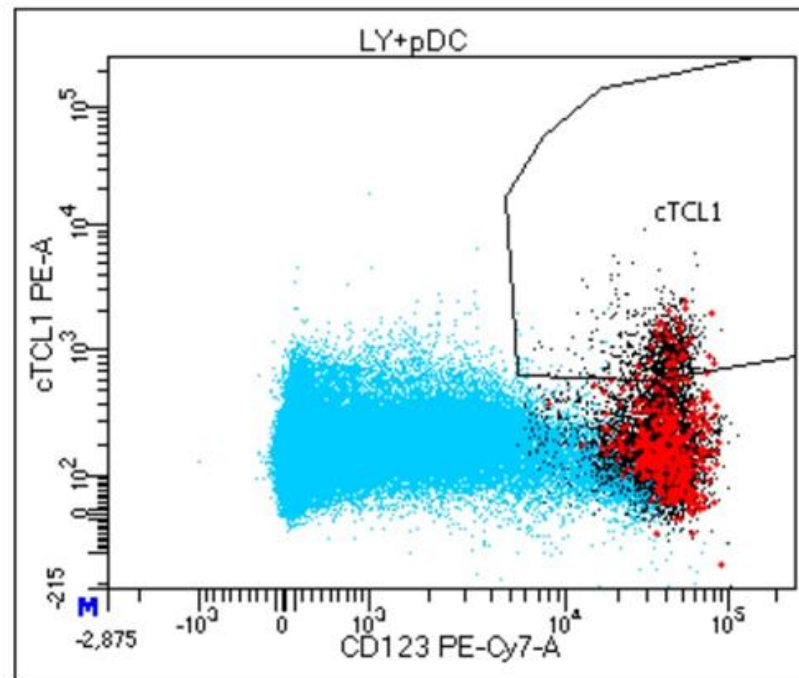
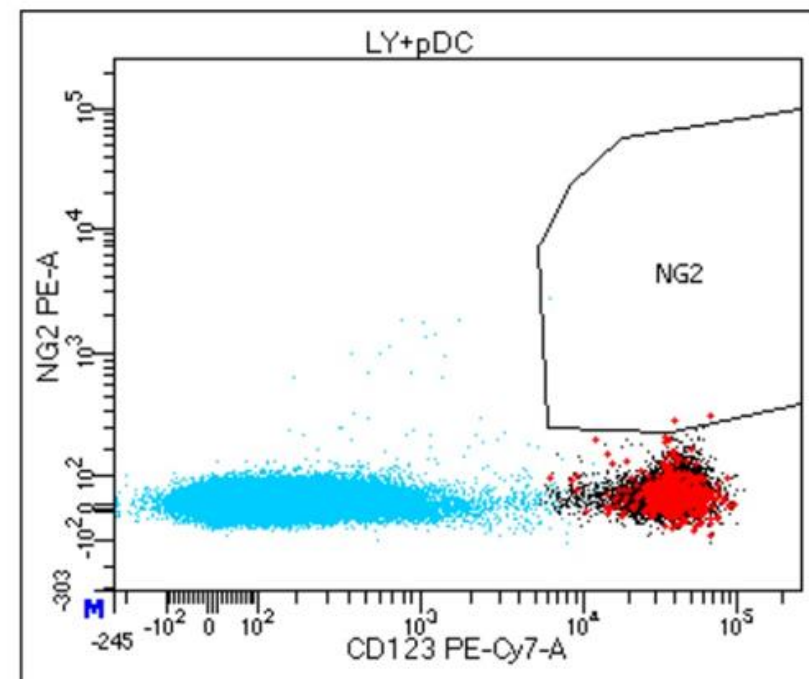
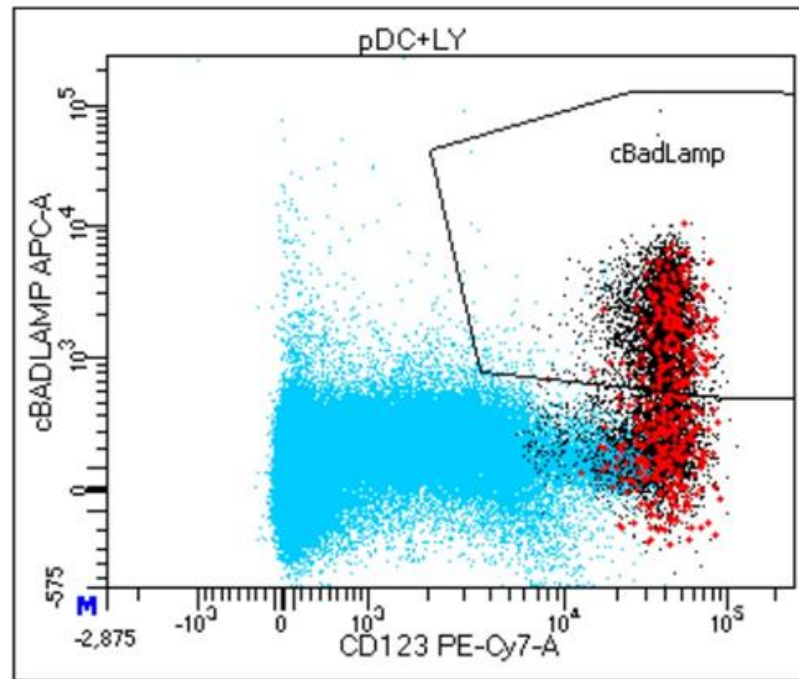
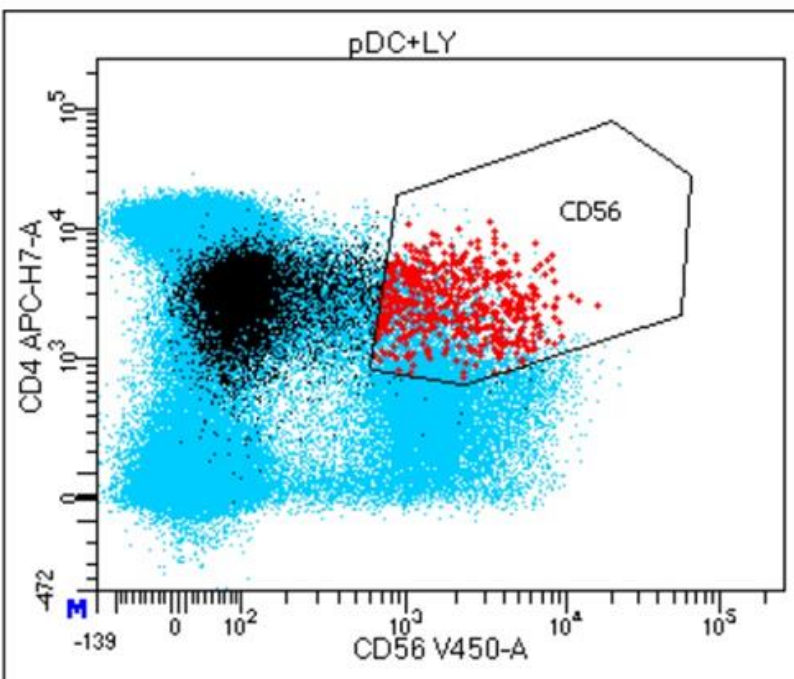


MRD1
indéetectable
 1×10^{-4}
pDC matures
CD56+ =
0,03% des
WBC45+



NON !

- En moyenne 3,8% des pDC physiologiques sont CD56+
- Pas de MRD à $\text{Sen} = 1 \times 10^{-4}$
- Combiner à des marqueurs plus discriminants
cTCL1, cBadLamp, ILT7, NG2



Nécessité d'utiliser d'autres marqueurs

TCL1-

BadLamp +/-

NG2-

ILT7+

Phénotype de pDC matures



STABILITÉ DES BAP

Persistence de blastes

Cohorte de mise au point

Cohorte de validation

[illegible]



CD56 DR CD303 CD304 FcεR1 CD38 NG2 ILT7 cBadLamp cTCL1 CD7 CD2



STABILITÉ
DES BAP

Rechutes

- Cohorte de mise au point
- Cohorte de validation

Cas 1	↑	=	=	=	=	↑	=	=	=	↑	=	=
Cas 2	↑	=	↓	=	=	↑	⊘	=	=	↑	↑	=
Cas 1	=	=	=	=	=	=	+	=	=	=	+	=
Cas 2	⊘	=	⊘	⊘	=	↑	↑	=	=	=	=	=
Cas 3	=	=	=	=	↓	=	=	=	=	↑	=	=
Cas 4	=	=	⊘	=	=	=	=	=	=	=	=	=
Cas 5 rechute #1	=	⊘	⊘	⊘	=	=	=	=	=	=	⊘	=
Cas 5 rechute #2 (LCR)	=	⊘	=	=	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT



1 Panel 12 couleurs

	BV786	BV421	PC5.5- PercCP- Cy5.5	APC-H7	PE-Cy7.7	BV510	FITC/ AF488	PE	APC/ AF660	APC R700/ AF700	BV605	BV711	Brilliant Stain Buffer Plus
T1	CD45	HLA DR	CD64	CD4	CD123	CD56	CD303	CD304	FCER1	CD34	CD38		
T2	CD45	HLA DR	CD64	CD4	CD123	CD56	FCER1	NG2	ILT7	CD34	CD86	CD7	
T4 intra	CD45	HLA DR	CD64	CD4	CD123	CD56	cBCL2	cTCL1	cBADLamp	CD304	CD36		

2 Évaluation de la MRD-flow comme critère de pronostic dans des études cliniques



Merci pour votre attention



Remerciements à :

- ❖ L'équipe du laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie cellulaire
- ❖ Samantha Pigot et Sabeha Biichlé