

Author's
copyright ©

52^{ème} journées de Biologie Praticienne

7 décembre 2018

La Cytométrie en Flux appliquée à l'Hématologie Évolution & Perspectives



Ludovic Lhermitte, Laboratoire d'Hématologie
Hôpital Necker-Enfants-Malades

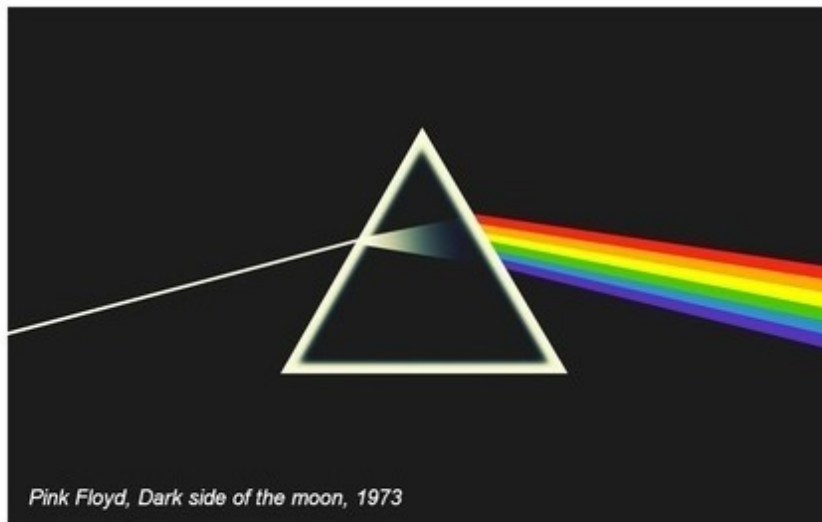
52e JBP - 2018 - L. LHERMITTE

Back to the basics ...

1934 Moldavan, Science
Comptage cellulaire en capillaire avec détecteur photoélectrique

1949 Wallace Coulter
Comptage cellulaire en suspension (passage contraint) avec détection par système d'impédance

'principe Coulter'
(brevet 1953)



1969 Phywe AG
Premier cytomètre commercial

1982 Entrée cytomètre en clinique
Immunologie

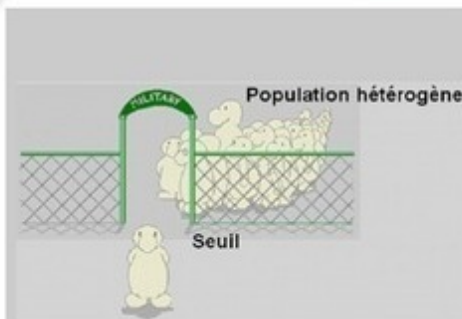
1980's – 90's Applications à l'hématologie
1994 – Score de Matutes

Author's
copyright ©

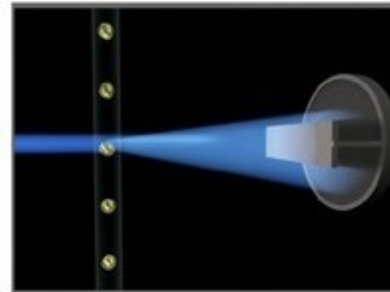
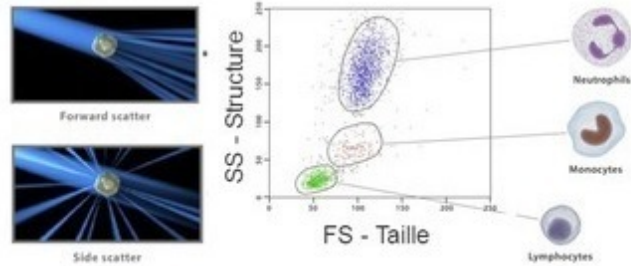
CHAPITRE 1

Principes de la Cytométrie de flux

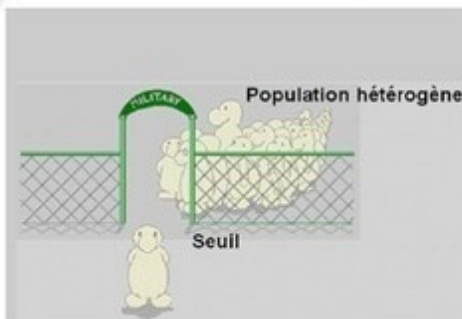
Analyse multiparamétrique unicellulaire



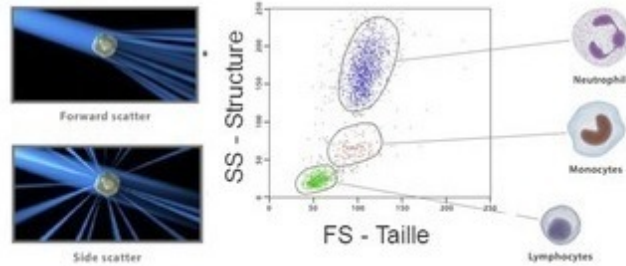
Paramètres morphologiques (optique)



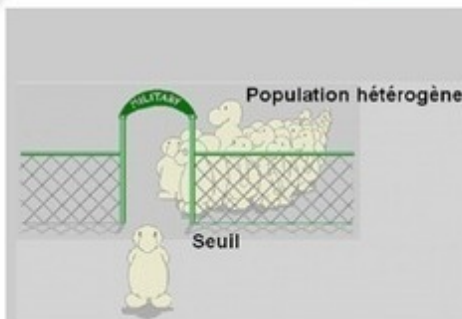
Analyse multiparamétrique unicellulaire



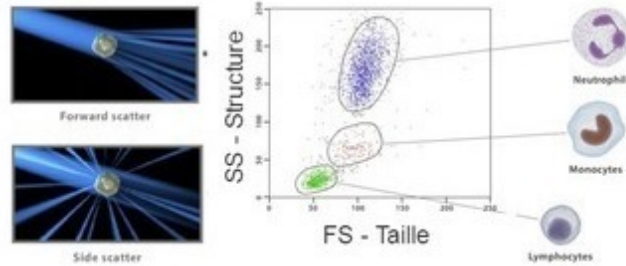
Paramètres morphologiques (optique)



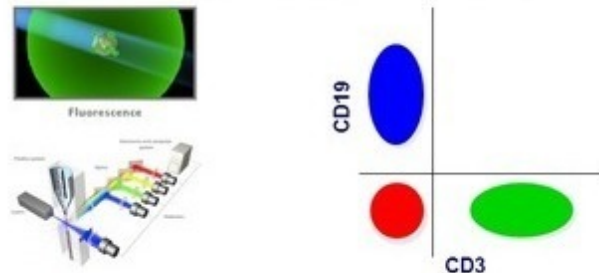
Analyse multiparamétrique unicellulaire



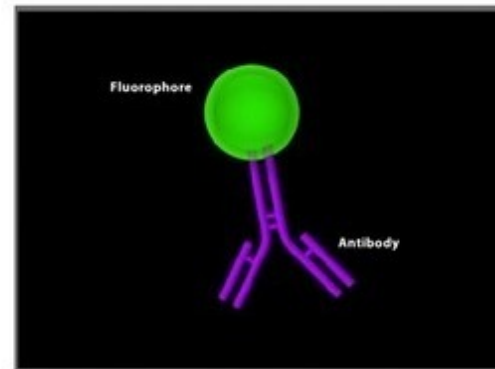
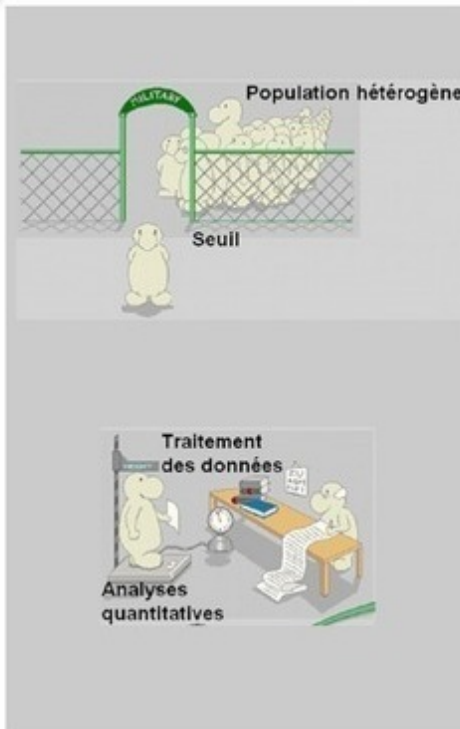
Paramètres morphologiques (optique)



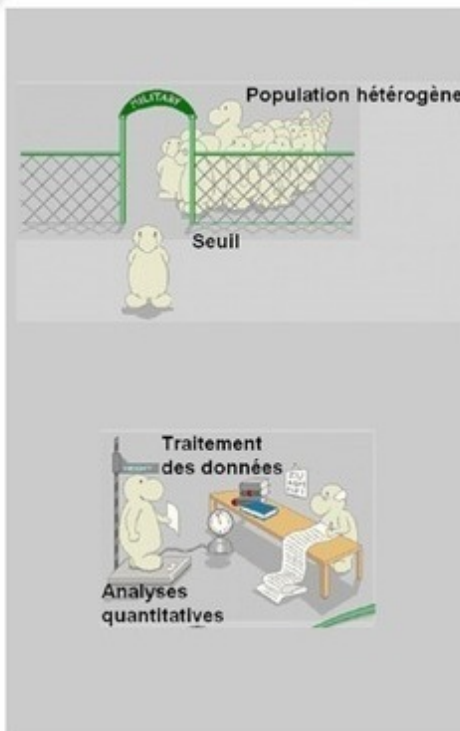
Paramètres d'expression (fluorescence)



Analyse multiparamétrique unicellulaire



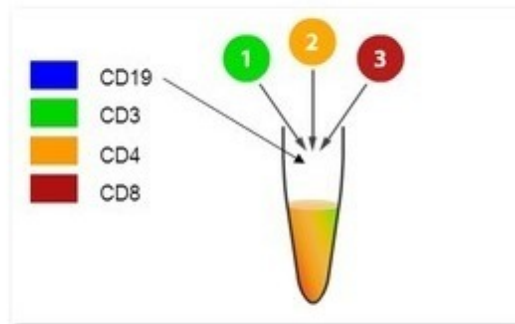
Analyse multiparamétrique unicellulaire



Principe de la cytométrie en flux

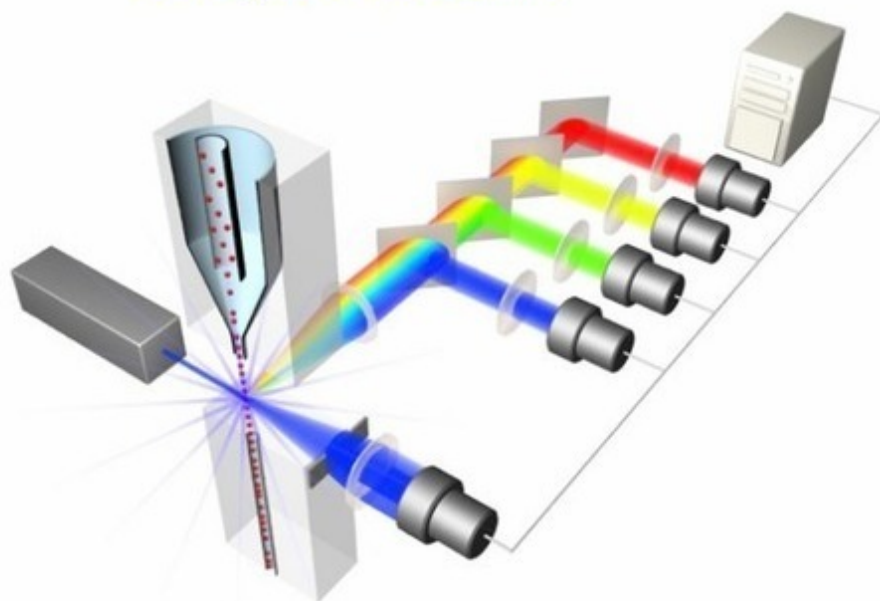
En pratique,

1 - Marquage suspension cellulaire



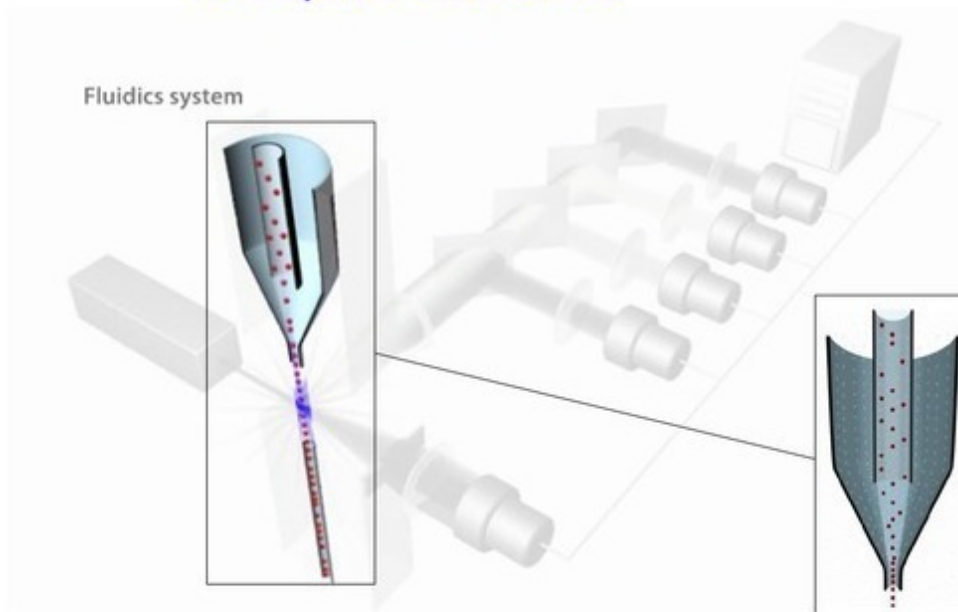
Principe de la cytométrie en flux

2 - Acquisition des données



Principe de la cytométrie en flux

2 - Acquisition des données

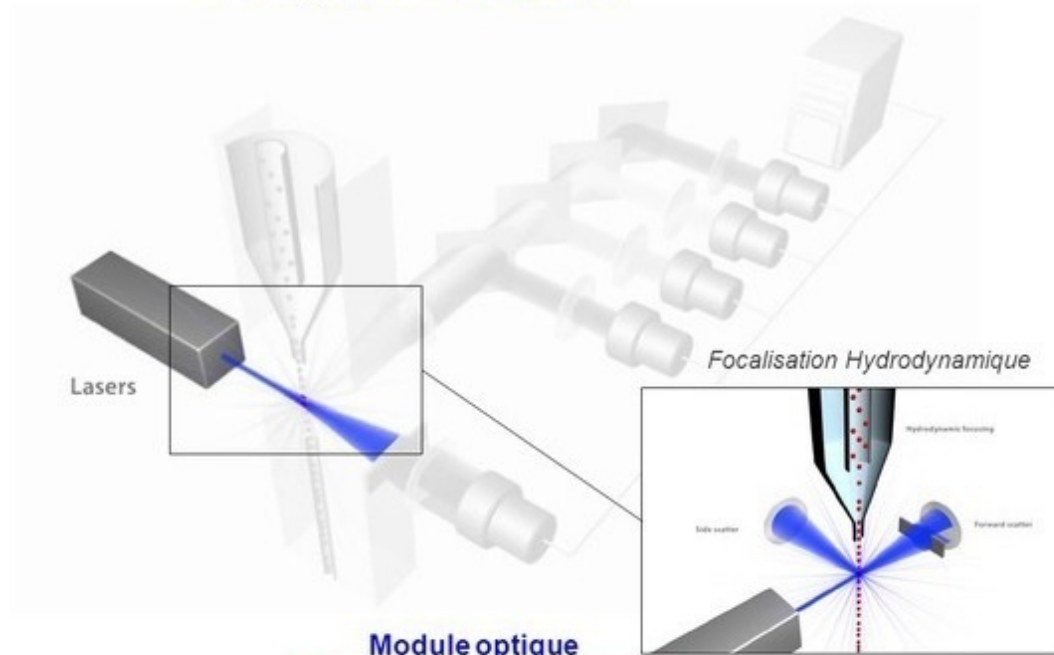


Module fluidique

présentation des cellules dans la chambre de focalisation (Flow cell)

Principe de la cytométrie en flux

2 - Acquisition des données

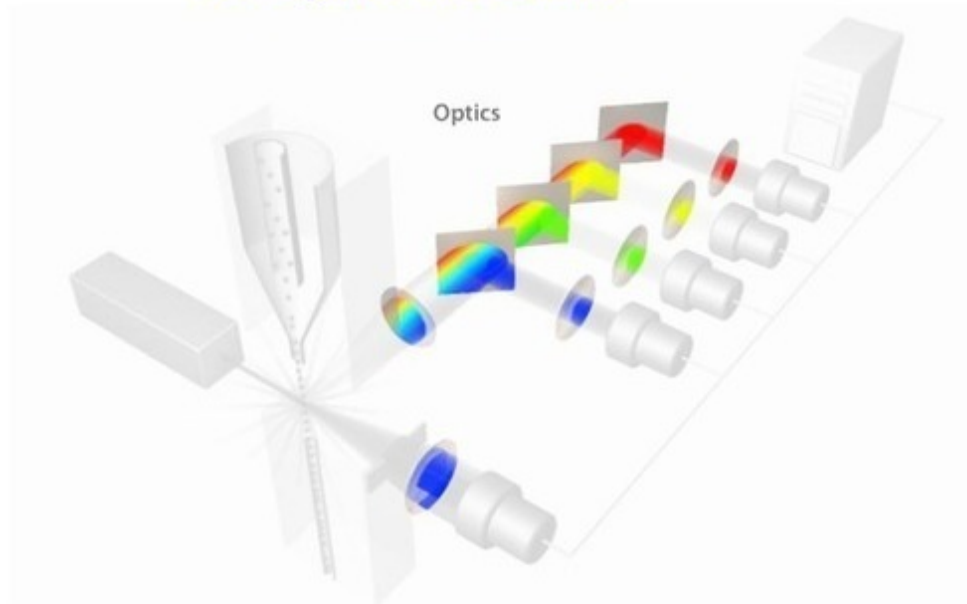


Module optique

- 1) Source d'excitation (laser)
Point d'interrogation

Principe de la cytométrie en flux

2 - Acquisition des données



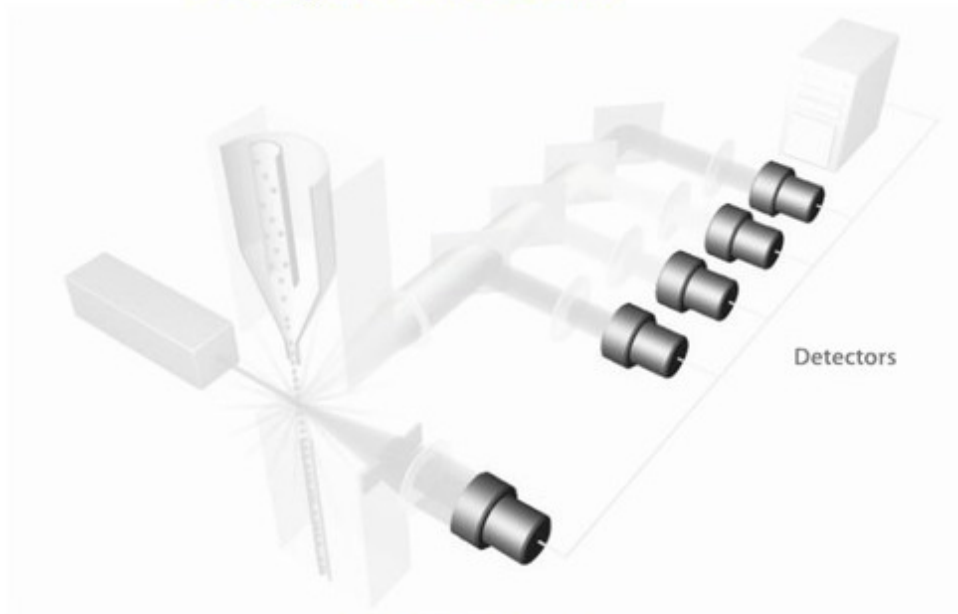
Module optique

2) Circuit optique collecteur (miroirs, filtres optiques)

Collection, séparation, canalisation signal lumineux ("réponse")

Principe de la cytométrie en flux

2 - Acquisition des données



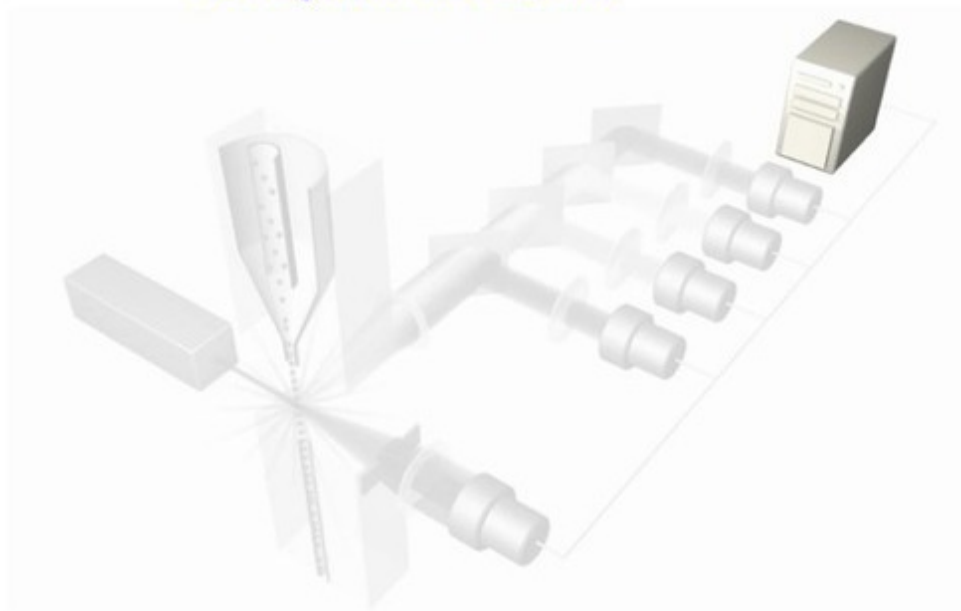
Module optique

3) Photomultiplicateurs :

collection et conversion signal optique / signal numérique - 2018 - L. LHERMITTE

Principe de la cytométrie en flux

2 - Acquisition des données



Module électronique

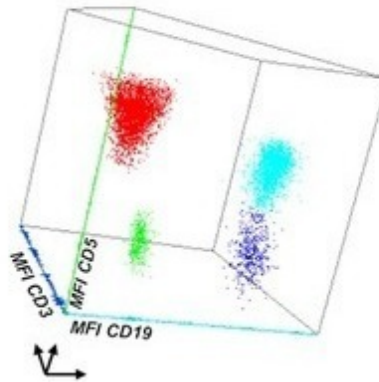
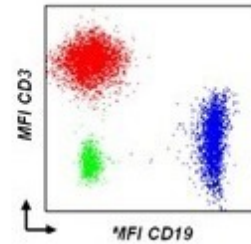
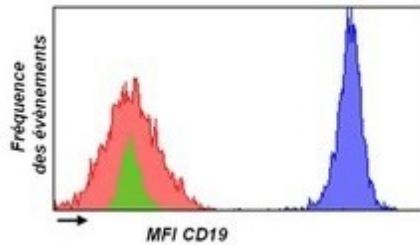
Ordinateur

Recueil et traitement du signal, Analyse des données

CCP - 2018 - L. LHERMITTE

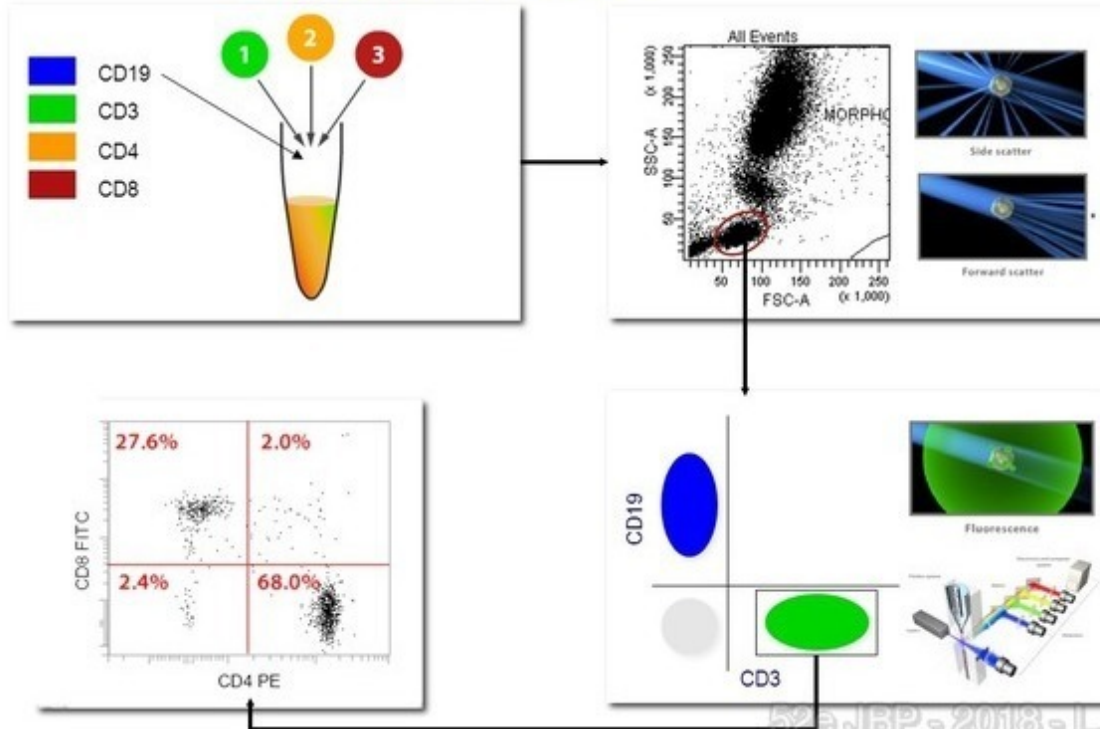
Principe de la cytométrie en flux

3 - Analyse des données



Principe de la cytométrie en flux

3 - Analyse des données

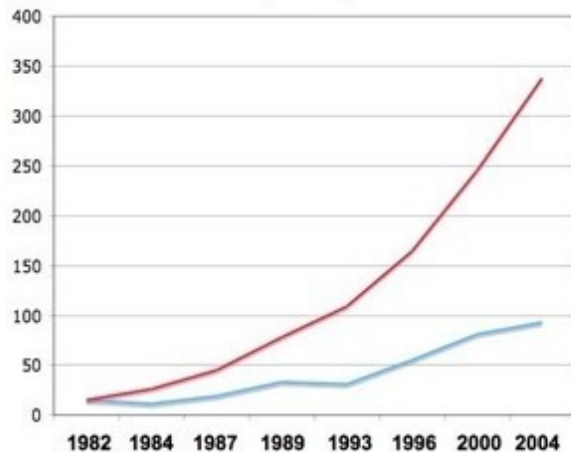


CHAPITRE 2

Une (r)évolution technologique

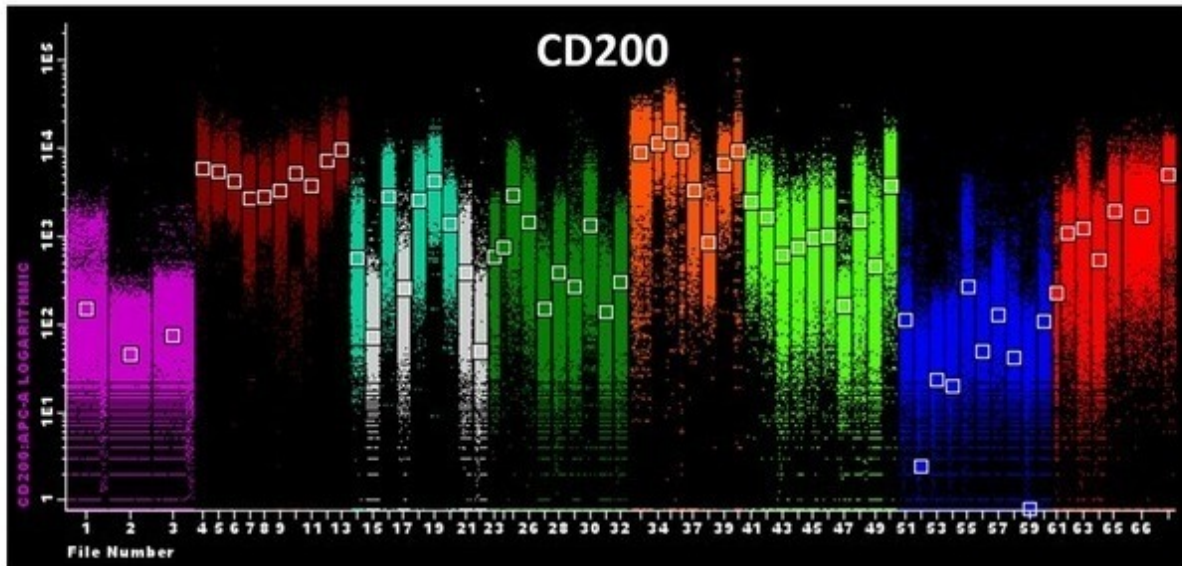
Vers la cytométrie multiparamétrique

Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops (HLDA)



— Nombre de nouveaux clusters
— Nombre total de clusters

- Augmentation exponentielle des Anticorps monoclonaux (CD)
- Protocoles de perméabilisation :
 - ↔ Accès aux antigènes intracellulaires
 - Ag extracellulaires = 10% du pool protéique cellulaire
 - Ag extracellulaires = 90% du pool protéique cellulaire



BL

CLL

DLBCL

FL

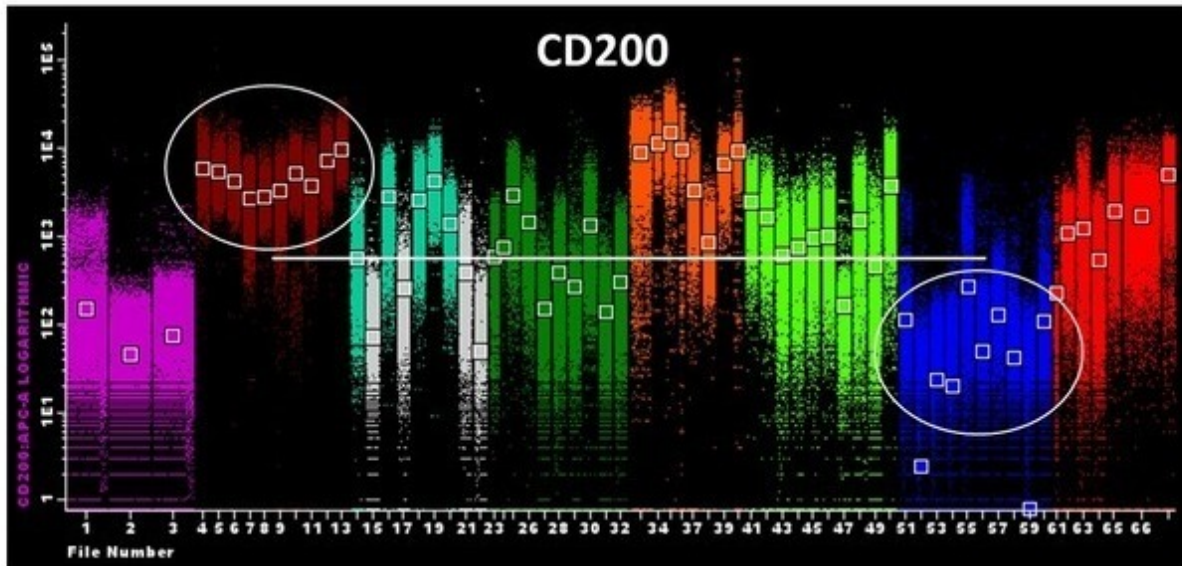
HCL

LPL

MCL

MZL

Data from S. Boettcher, Kiel, Germany



BL

CLL

DLBCL

FL

HCL

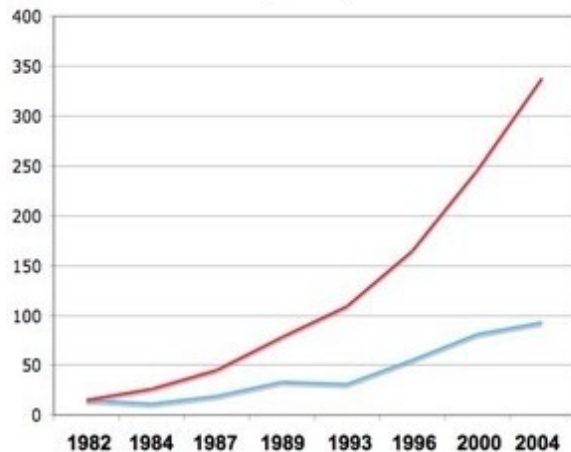
LPL

MCL

MZL

Data from S. Boettcher, Kiel, Germany

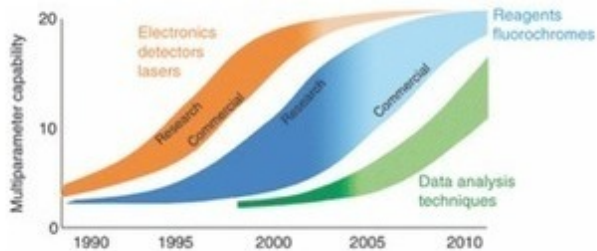
Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops (HLDA)



— Nombre de nouveaux clusters
— Nombre total de clusters

- Augmentation exponentielle des Anticorps monoclonaux (CD)
- Protocoles de perméabilisation :
 - ↔ Accès aux antigènes intracellulaires
 - Ag extracellulaires = 10% du pool protéique cellulaire
 - Ag extracellulaires = 90% du pool protéique cellulaire

Avancées technologiques



Chattopadhyay P.K., Roederer M., BSI, 2008

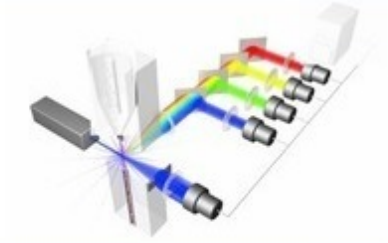
Fluidique



Instruments plus rapides, robustes, reproductibles

Évènements rares

Optique



- Chimie des fluorochromes
Élargissement gamme fluorochromes disponibles
- Technologie des lasers
Plus de sources d'excitation

Plus de couleurs

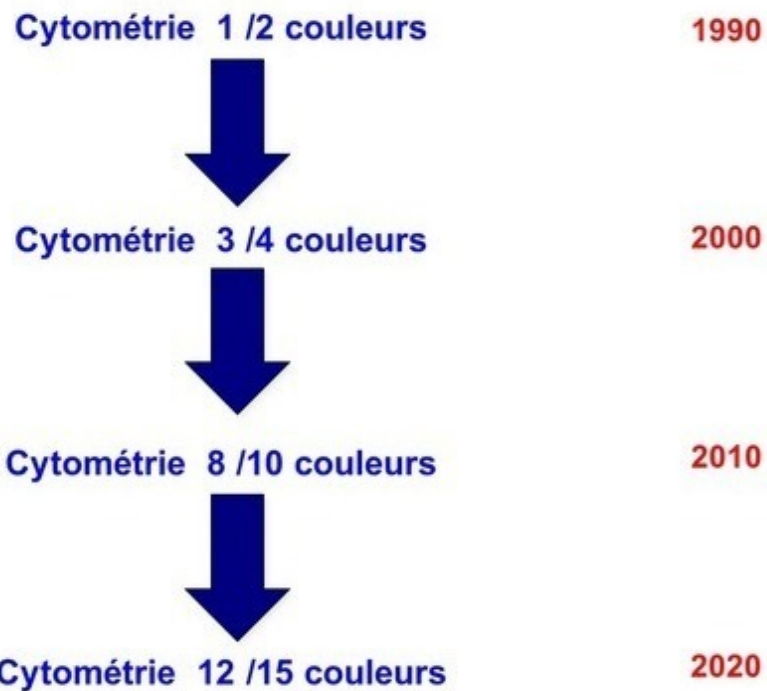
Informatique



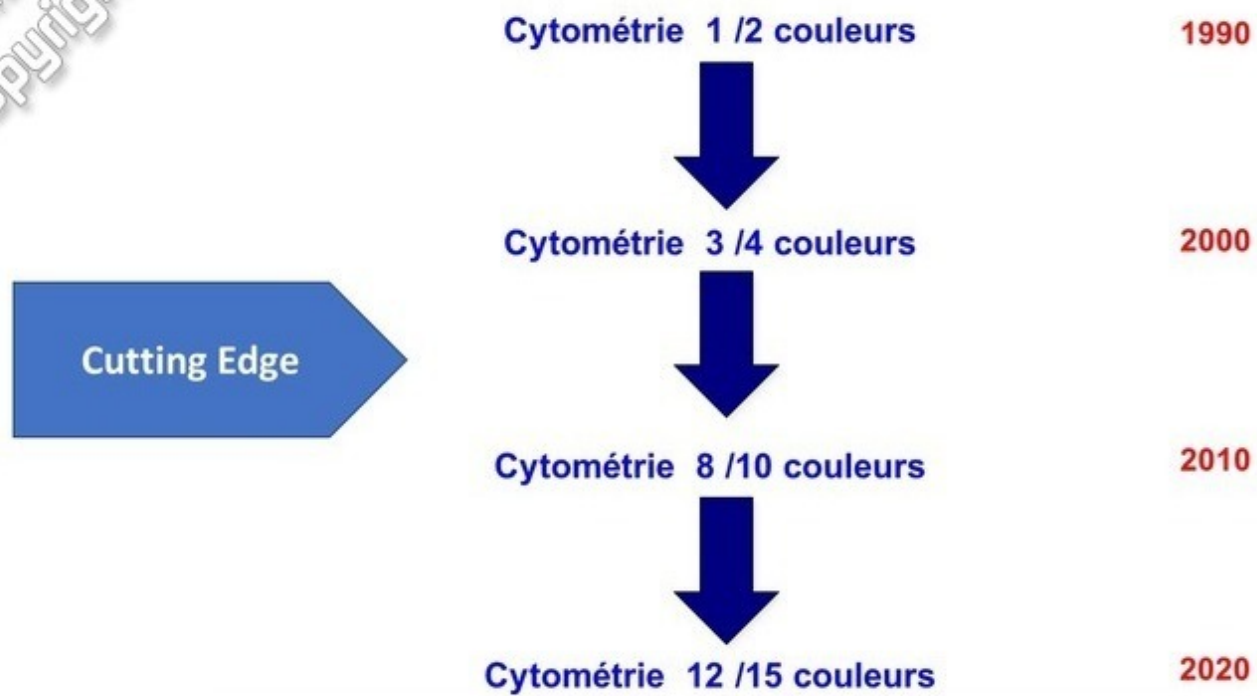
- Hardware
 - Software
Nouveaux logiciels d'acquisition & d'analyse
- Faisabilité du plus de couleurs !*

Intégration multiparamétrique & traitement d'un large volume de données

La Cytométrie multiparamétrique haut débit

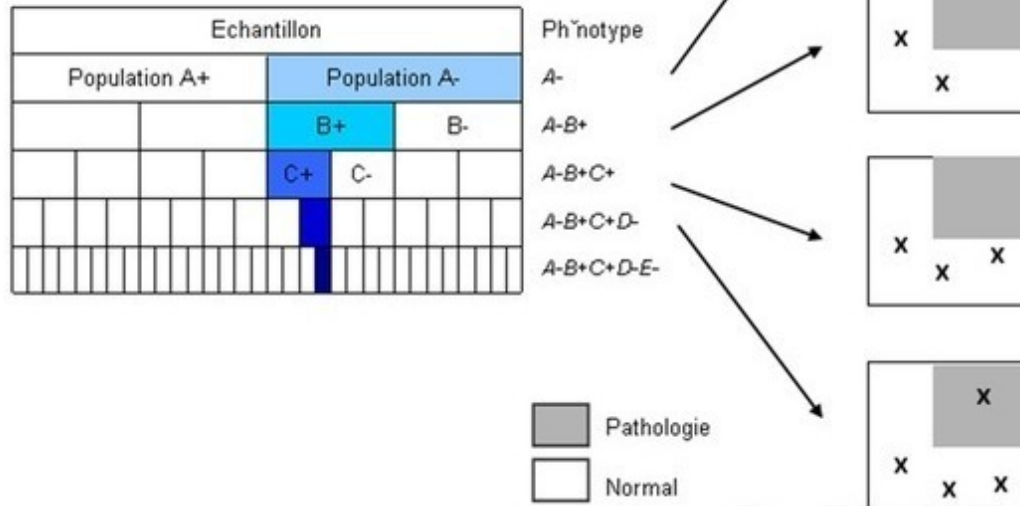


La Cytométrie multiparamétrique haut débit



Quel est l'intérêt d'augmenter le nombre de couleurs ?

La Cytométrie multiparamétrique haut débit



Chattopadhyay P.K., Roederer M., BSI, 2008

Author's
copyright ©

Exemples d'application

Diagnostic

Application diagnostique : screen des hémopathies lymphoïdes matures

- Tube 8 couleurs
- 11 anticorps (multiplexage)
- Dissection populations et sous-populations lymphocytaires

FITC	PE	PerCP-Cy5,5	PE-Cy7	APC	Alex 700	PO	Pacific Blue
Kappa+ CD8	Lambda+ CD56	CD19	CD5	CD10	CD3	CD45	CD20+CD4

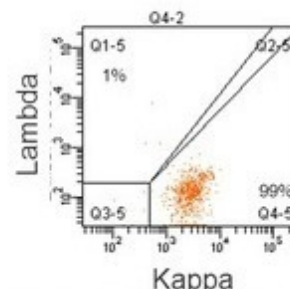
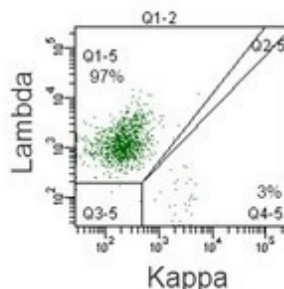
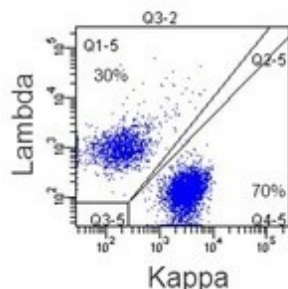
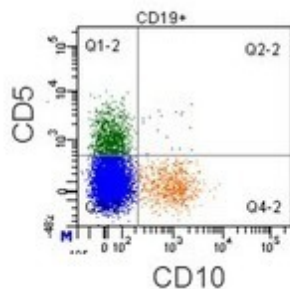
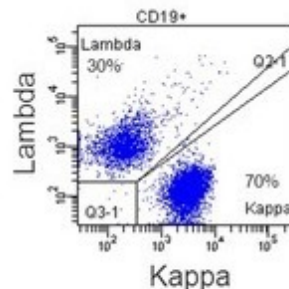
	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Pac Blue	Pac Or
Lymphos B 5-10- Kappa	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos B 5-10- Lambda	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos B 5+10- Kappa	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos B 5+10- Lambda	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos B 5-10+ Kappa	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos B 5-10+ Lambda	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos T CD4+	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos T CD8+ CD56-	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Lymphos T CD8+ CD56+	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue

Application diagnostique : screen des hémopathies lymphoïdes matures

Détection de 2 populations clonales minoritaires

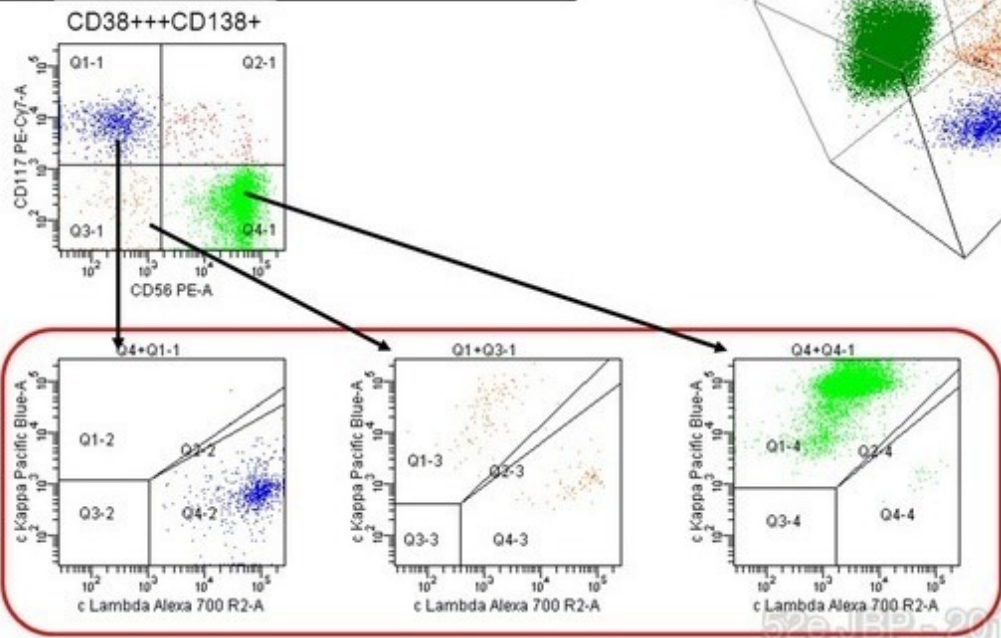
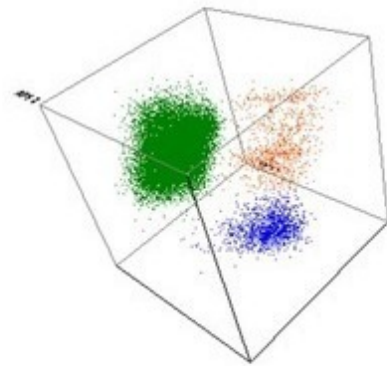
Sang (lymphocytes = 1150/mm³)

Focus (« Fenêtrage »)
sur Lymphocytes B



Application diagnostique : screen des hémopathies lymphoïdes matures

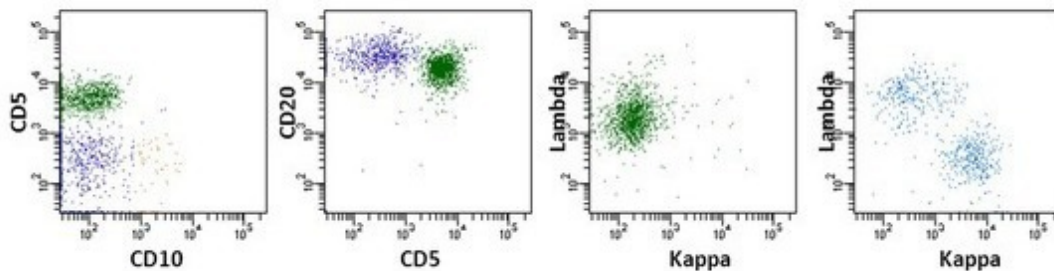
- Plasmocytes clonaux Kappa 56+ 117- 28- 19- 20-
- Plasmocytes clonaux Lambda 56- 117+ 28+ 19+ 20+
- Plasmocytes polyclonaux résiduels



Application diagnostique : screen des hémopathies lymphoïdes matures

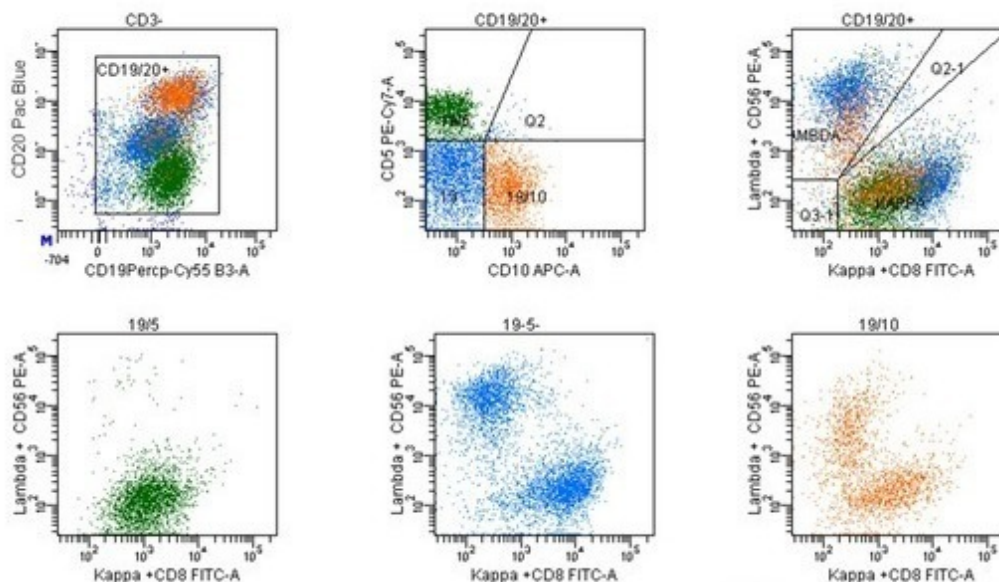
Détection de « smoldering LLC » ↔ MBL

Patiente 65 ans, 1950 lymphocytes, 12% B

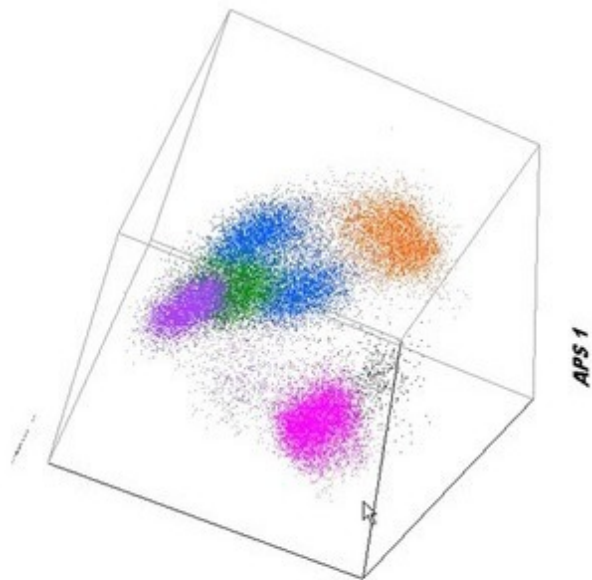


Application diagnostique : screen des hémopathies lymphoïdes matures

« Adénogramme Phénotypique »



Author's
copyright ©



Centrocytes Polyclonaux



Immunoblastes polyclonaux



Clone LLC



Lymphocytes T CD8



Lymphocytes T CD4



Lymphocytes T CD4+ CD10+ (Th)

52e JBP - 2018 - L. LHERMITTE

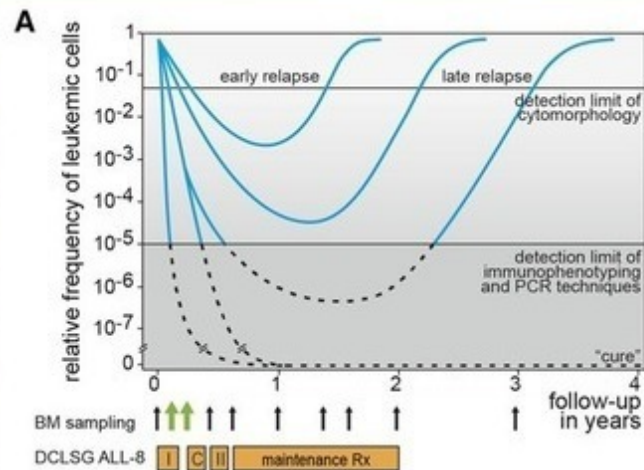
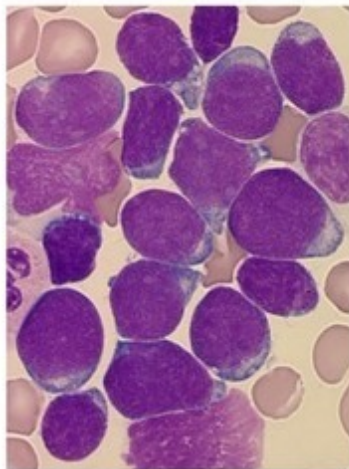
Author's
copyright ©

Exemples d'application

Maladie Résiduelle

Application de suivi : Maladie Résiduelle des hémopathies

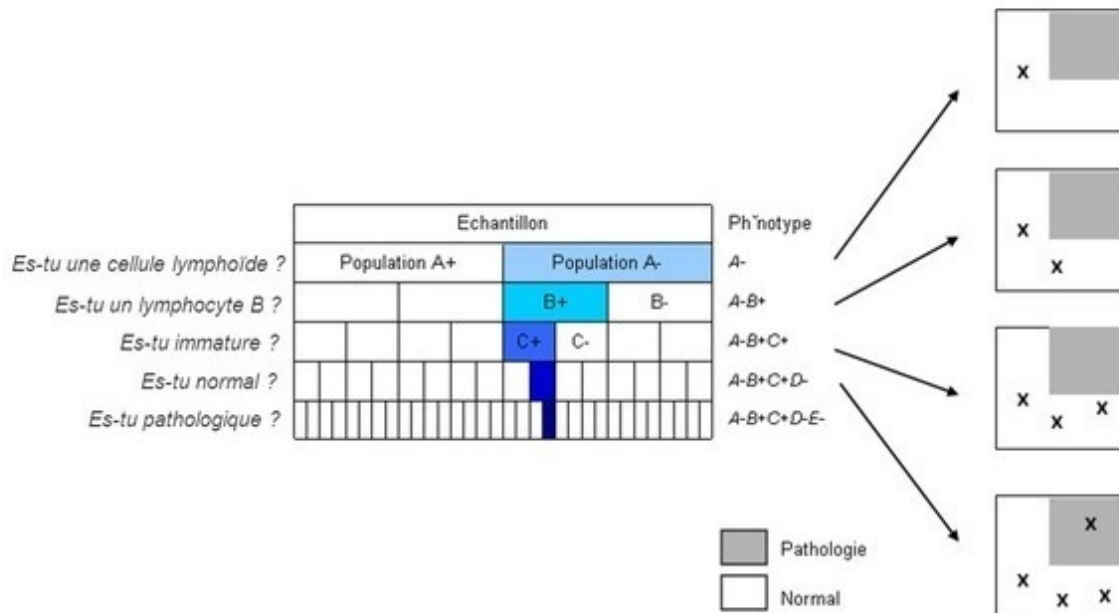
Exemple du suivi de la maladie résiduelle des leucémies aigües lymphoblastiques B (LAL-B)



Evaluation moelle post-induction / post-consolidation :

- Population lymphoïde B immature pathologique (MRD éventuelle)
- Population lymphoïde B immature physiologique (régénérative)

Application de suivi : Maladie Résiduelle des hémopathies

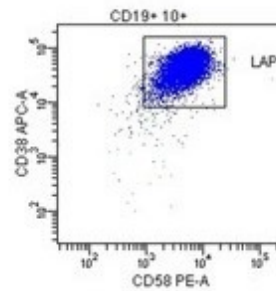
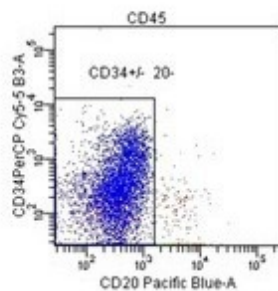
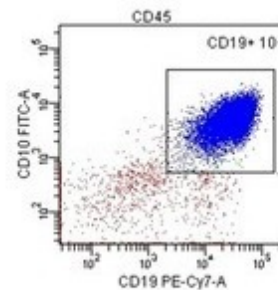
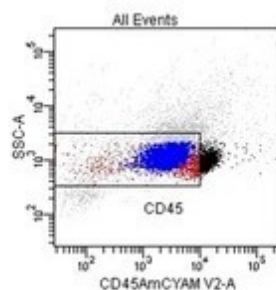
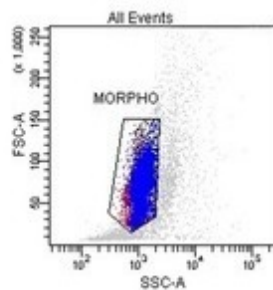


Evaluation moelle post-induction / post-consolidation :

- Population lymphoïde B immature pathologique (MRD éventuelle)
- Population lymphoïde B immature physiologique (régénérative)

Application de suivi : Maladie Résiduelle des hémopathies

Stratégie 8 couleurs: Analyse au diagnostic

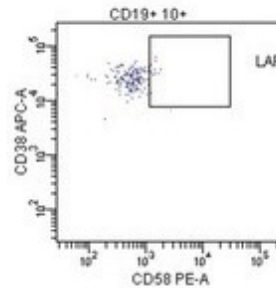
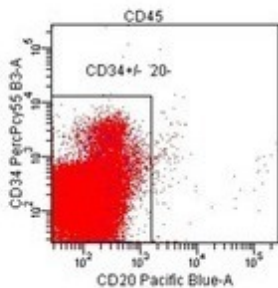
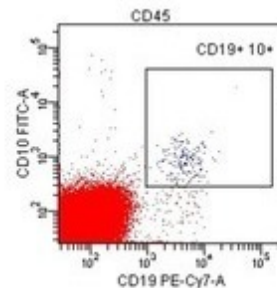
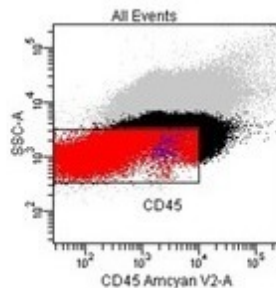
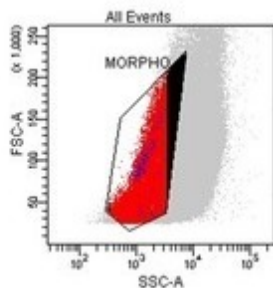


Tube_002

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	16,789	###	100.0
MORPHO	13,674	81.4	81.4
CD45	12,250	89.6	73.0
CD19+ 10+	11,191	91.4	66.7
CD34+/- 20-	11,128	99.4	66.3
LAP	11,012	99.0	65.6

Application de suivi : Maladie Résiduelle des hémopathies

Stratégie 8 couleurs: Analyse au point de suivi (MRD)

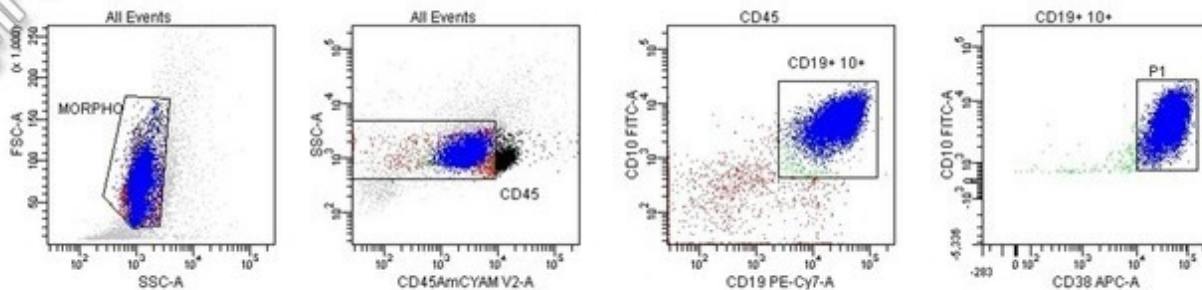


Tube: Tube_002

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	505,116	###	100.0
MORPHO	142,270	28.2	28.2
CD45	112,071	78.8	22.2
CD19+ 10+	176	0.2	0.0
CD34+/- 20-	172	97.7	0.0
LAP	11	6.4	0.0

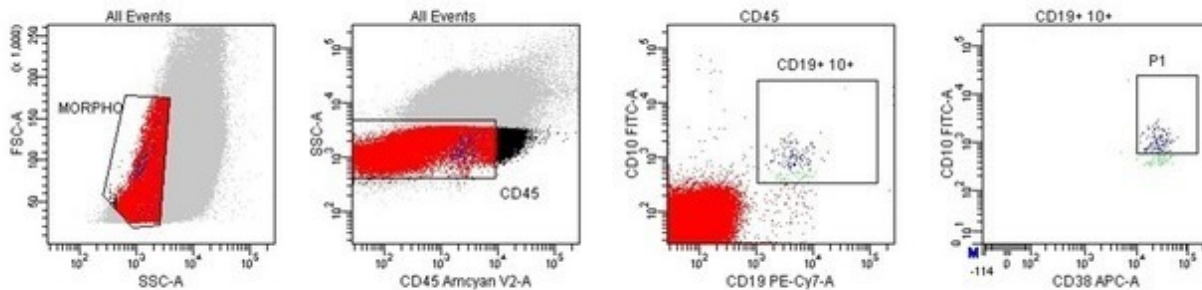
Author's
copyright

Stratégie 4 couleurs: Analyse au diagnostic



CD38

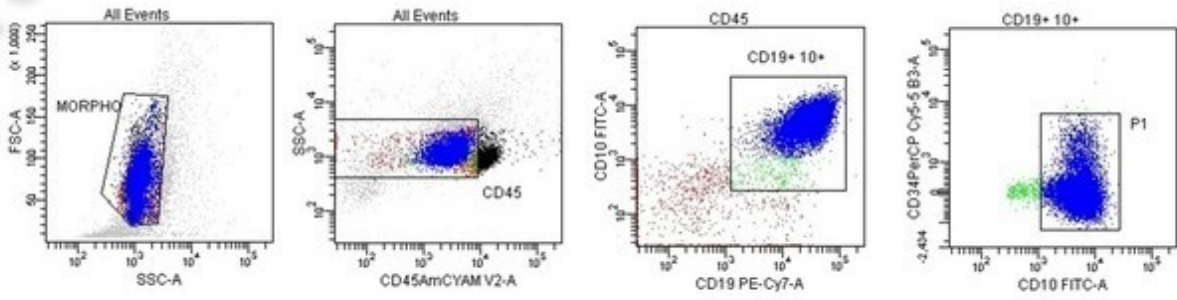
Stratégie 4 couleurs: Analyse au point de suivi (MRD)



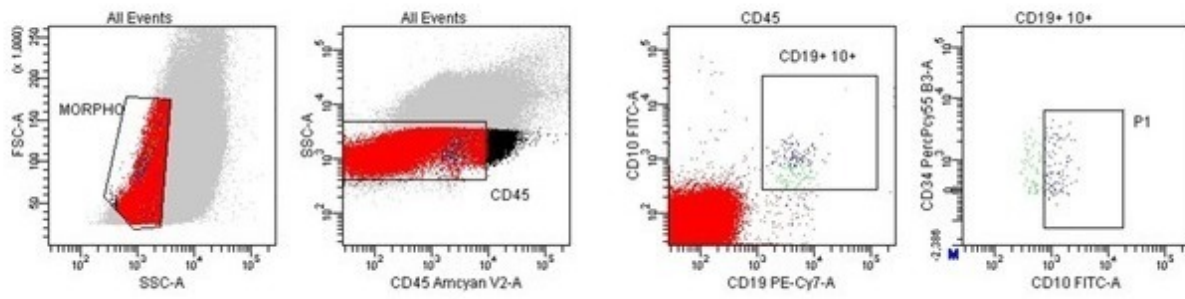
Author's
copyright

Stratégie 4 couleurs: Analyse au diagnostic

CD34



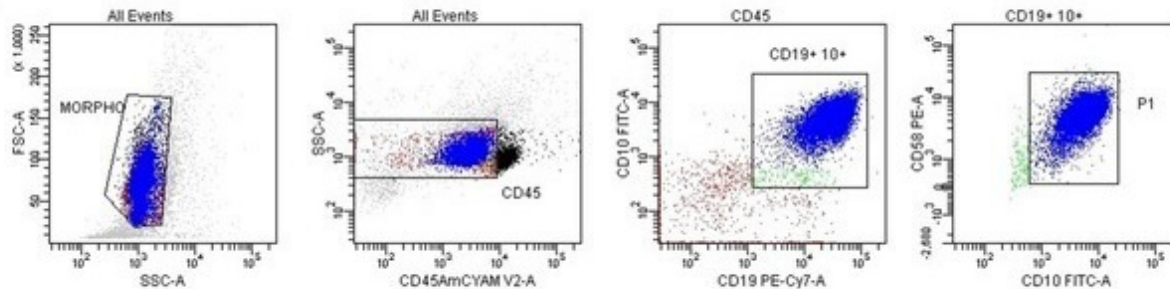
Stratégie 4 couleurs: Analyse au point de suivi (MRD)



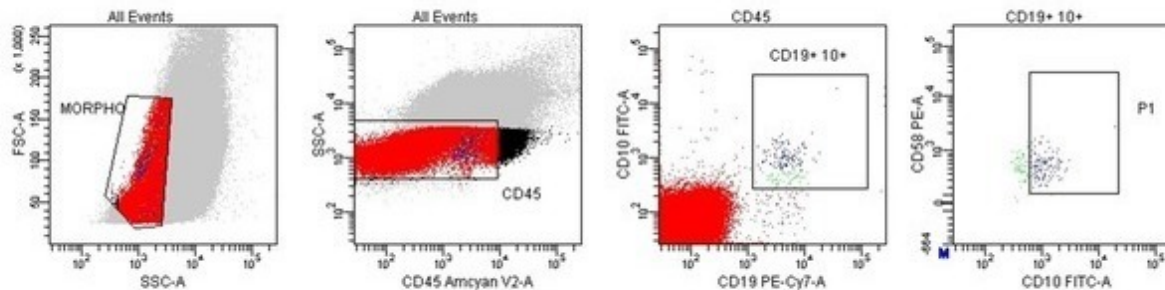
Author's
copyright

Stratégie 4 couleurs: Analyse au diagnostic

CD58



Stratégie 4 couleurs: Analyse au point de suivi (MRD)



Nécessité d'avoir un maximum de marqueurs combinés ensemble pour

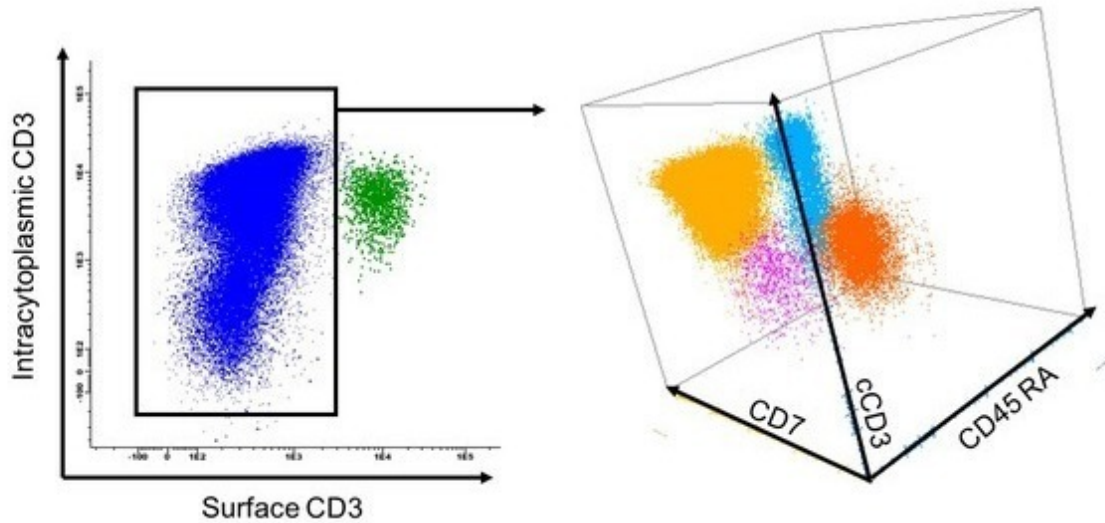
MRD robuste

Author's
copyright ©

Exemples d'application

Exploration de l'hétérogénéité intracлонale

Applications futures : Hétérogénéité intraclonale



Mieux comprendre la maladie...

Applications de la CMF : Aujourd'hui

0 – Dépistage hémopathies

e.g. B/T/NK

1 - Assignement de lignée

B vs T vs M

2 - Stade de différenciation dans la lignée

Hémopathies lymphoïdes B

3 - Clonalité

B (κ/λ) / T (*répertoire V β*)

4 - Malignité

Aberration phénotypique, asynchronisme

5 - Pronostic

CD10 dans les LAL-B

6 - Théranostique

Expression CD20, CD33, CD52

1. Hémopathies malignes immatures

- Confirmation diagnostic leucémie aigüe
- Appartenance de lignée et typage LAL (stade de maturation)
(classification préthérapeutique)
- Recherche d'un phénotype anormal pour MRD (LAP)

2. Hémopathies lymphoïdes malignes matures & plasmocytaire

- Appartenance de lignée
- Typage du lymphome (stade de maturation et/ou phénotype aberrant)
- Monoclonalité (B)
- Caractérisation des MGUS & myélomes

3. Hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)

Applications de la CMF : et demain?

Emergence de nouvelles applications :

1. Phénotypage des monocytes
2. Caractérisation des MBL ?
3. Meilleure définition des hémopathies T matures
4. Myélodysplasies
5. Immunothérapies :
 - Théranostique : CD30, autres ...
 - Suivi :
 - Des promesses :
 - environnement immunitaire au diagnostic et au suivi
 - CAR-T cells : suivi des CAR et mesure prédiction de leur efficacité
 - Des angoisses : anti-CD19, anti-CD38

Author's
copyright ©

CHAPITRE 3

Une nouvelle problématique

L'analyse des données

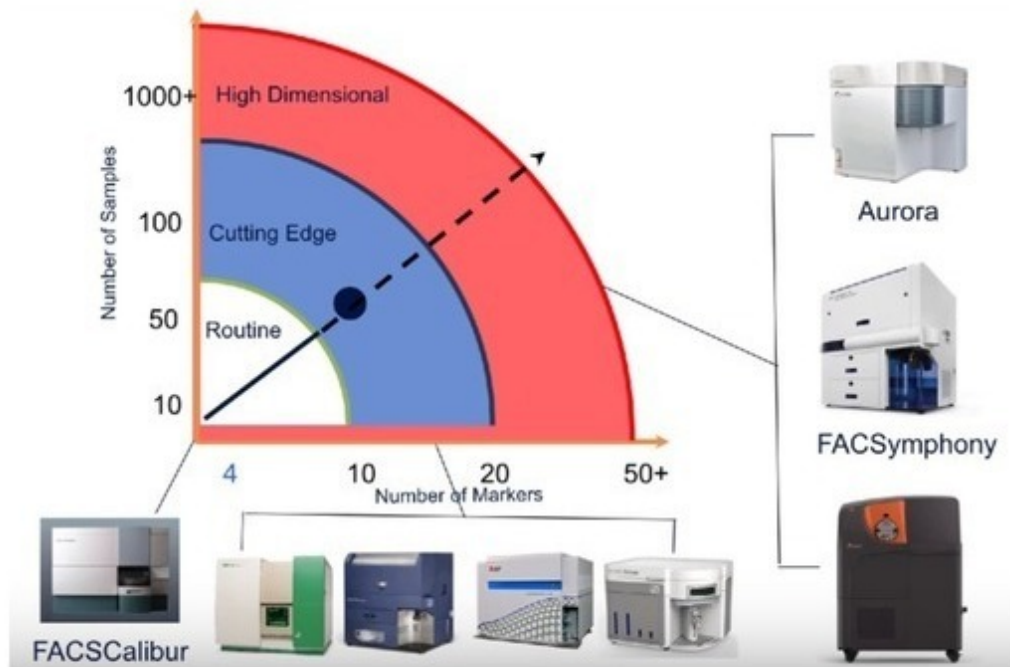
CHAPITRE 3

Une nouvelle problématique

L'analyse des données

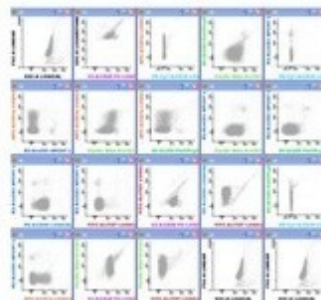
Ou une nouvelle opportunité ???

Problématique : Analyse des données



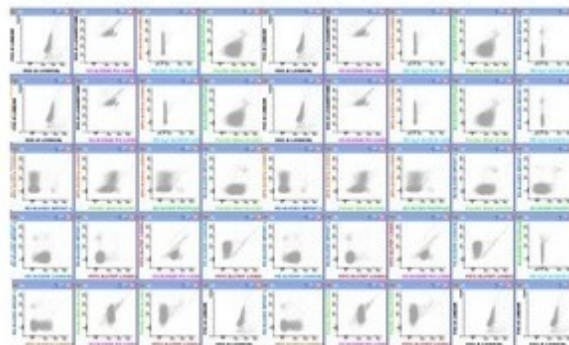
Cytométrie 6 paramètres
(4 couleurs)

15 Dot Plots possibles



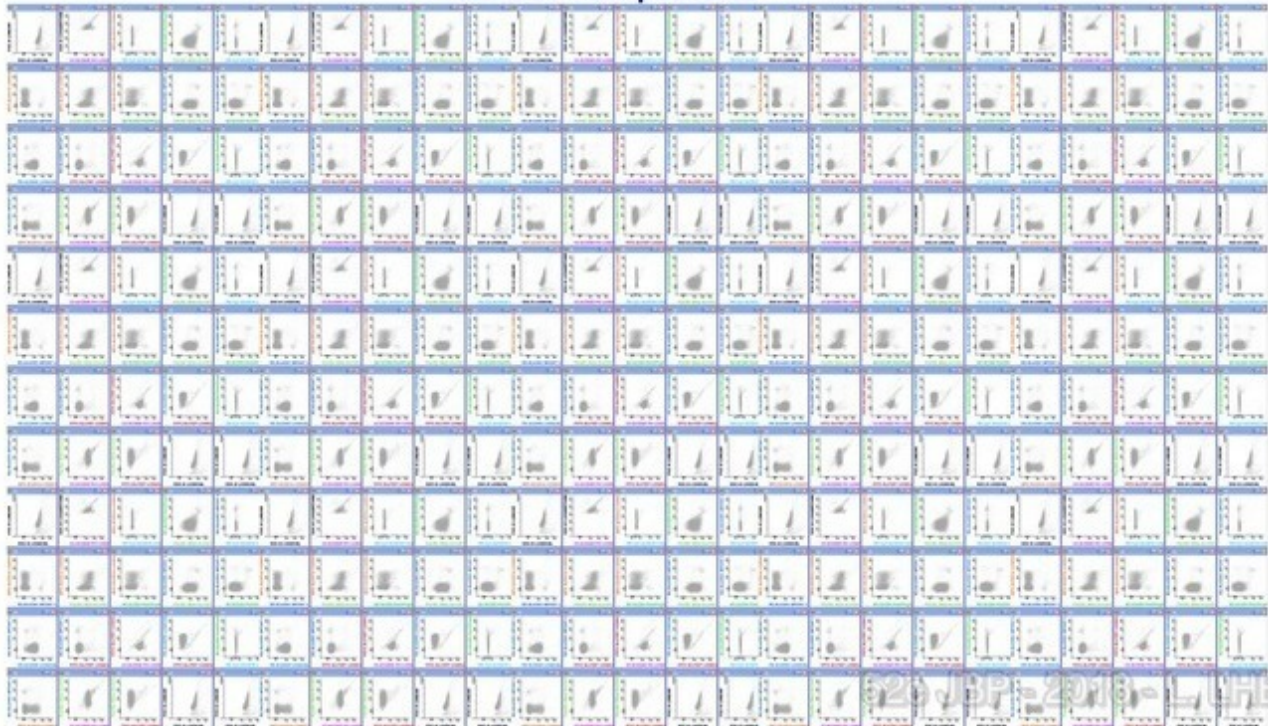
Cytométrie 10 paramètres
(8 couleurs)

45 Dot Plots possibles



Problématique : Analyse des données

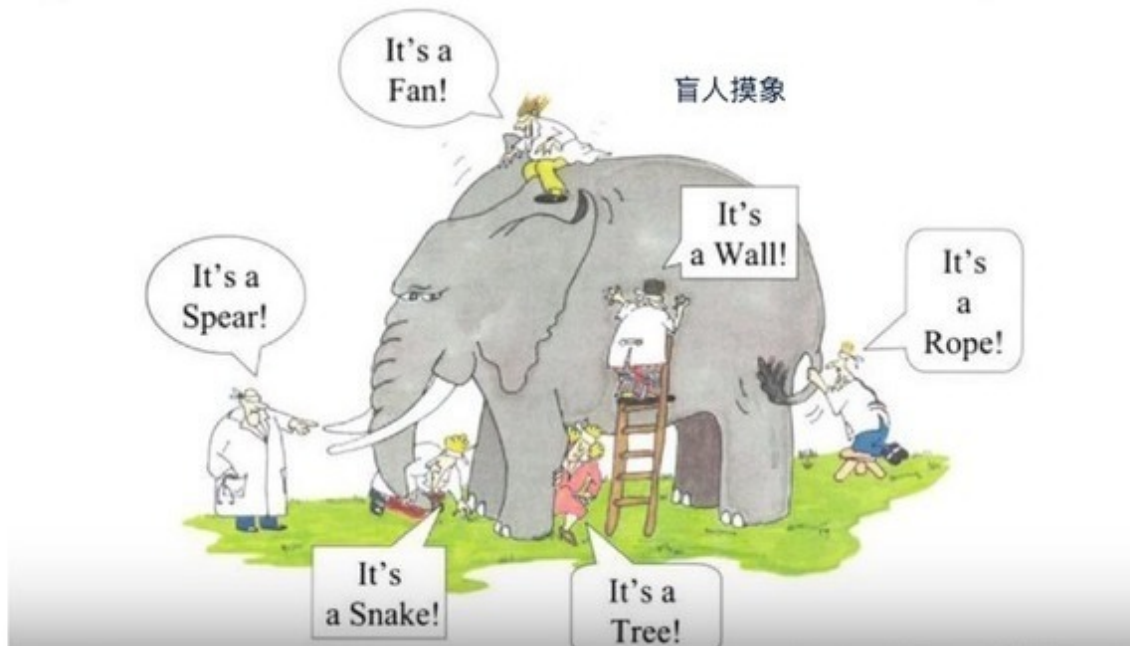
Cytométrie 30 paramètres
> 300 Dot Plots possibles



Problématique : Analyse des données

High-dimensional distribution

Blind men and an elephant



It may well be that high-dimensional data are difficult to analyze

Supervised Approaches

- Wanderlust
- CITRUS



Unsupervised Approaches

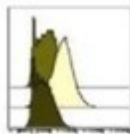
- PCA
- viSNE
- PhenoGraph
- SPADE
- **FlowSOM**

It may well be all these tools are not easy to understand

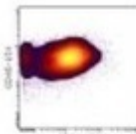
Problématique : Analyse des données

Data pre-processing

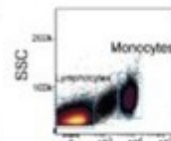
- compensation
- transformation



Histograms



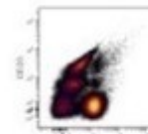
Contour plots



Gating



Annotation



Auto-comp

Data Analysis

- clustering
- dimensionality reduction



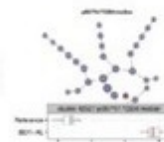
SPADE



viSNE



Sunburst



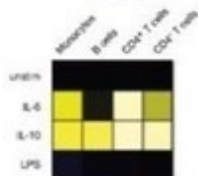
CITRUS



FlowSOM

Customization

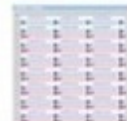
- characterization
- API



Heatmaps



DROP



Plate



Export Statistics

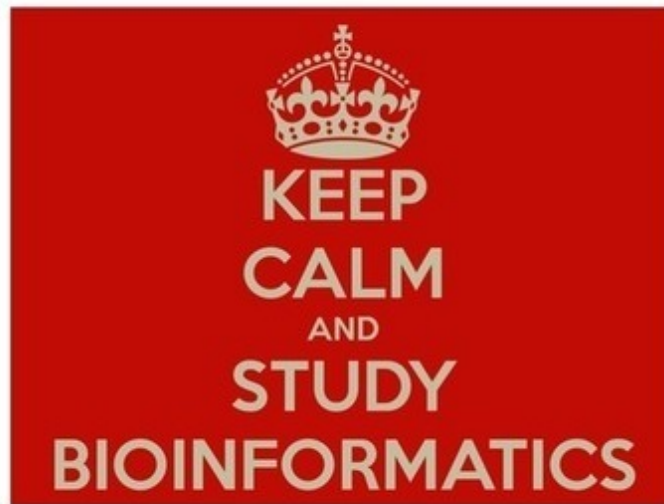


Cytobank API

It may well be all these tools are not easy to choose....

Problématique : Analyse des données

It may well be that high-dimensional data are difficult to analyze
It may well be all these tools are not easy to understand
It may well be all these tools are not easy to choose



Okay... Mais pour quelles promesses ???

« Pattern-learning » & « pattern-recognition »

➤ Construction de bases de données de référence :

- Identification automatique des populations
 - Très pertinent pour l'immunologie
 - Beaucoup plus 'challenging' pour l'(onco-)hématologie

⇔ « automated gating »

- Orientation diagnostique :
 - Compare aux pathologies déjà « vues »

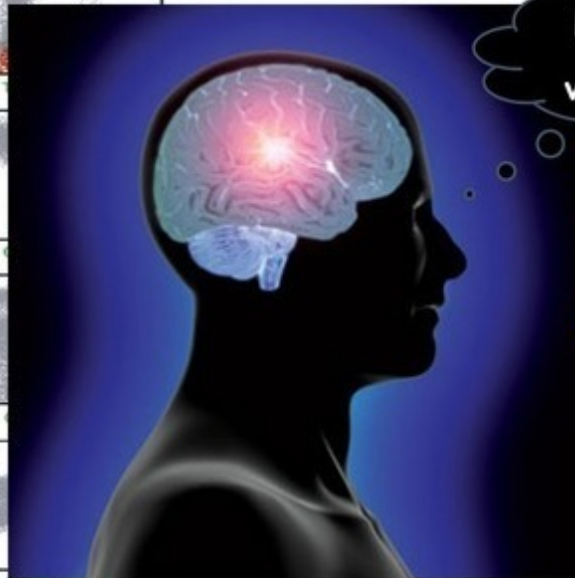
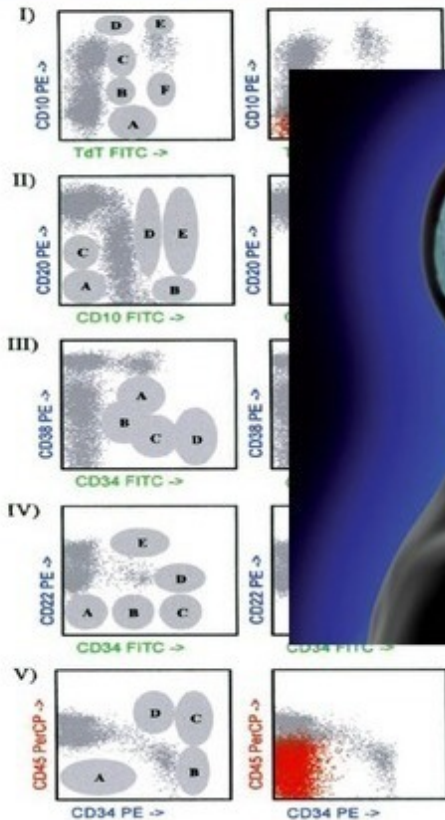
⇔ « diagnosis classification »

➤ Construction d'une « base de données diagnostique » individuelle

- On donne au logiciel en entrée le diagnostic
- Le logiciel apprend à reconnaître la maladie résiduelle

⇔ « Minimal residual disease assesment »

Problématique : Analyse des données



Physiologique
vs Leucémique

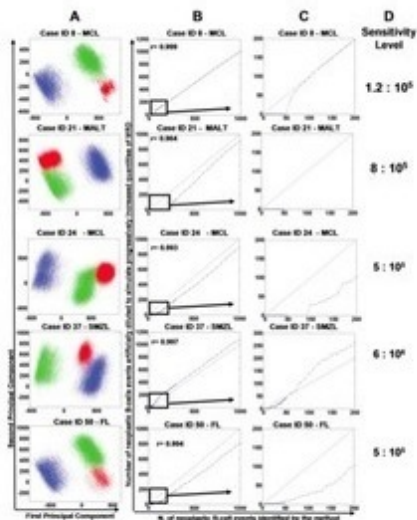
e B immature
(MRD leucémique)

e B immature
(régénérative)

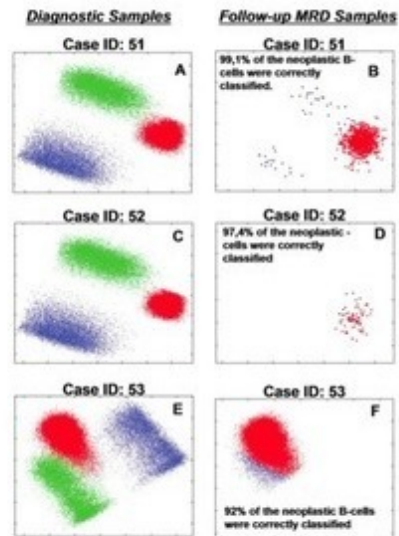
ations phénotypiques
normal/ pathologique

Problématique : Analyse des données

Diagnostic

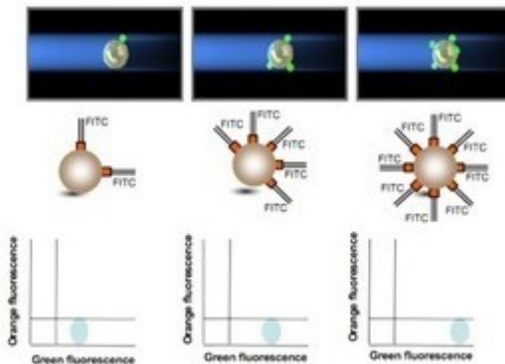


Maladie résiduelle



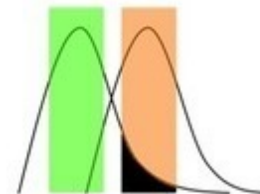
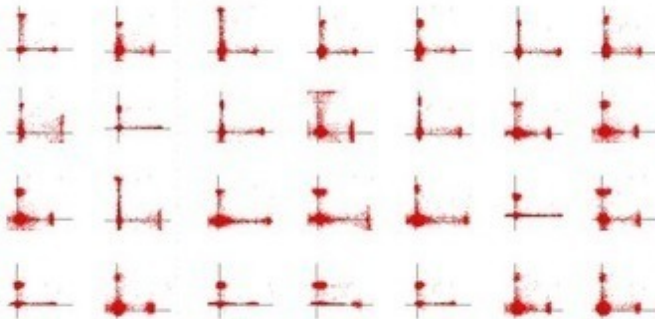
Problématique : Analyse des données : un ticket d'entrée

Réglage des Voltages



- Nécessité de standardisation des MFI
- « A une densité antigénique, une intensité de fluorescence »
- Paramétrage standardisé des instruments
- Progrès de la standardisation des instruments en France (FranceFlow)
- 24 centres francophones alignés

Réglage des Compensations



Author's
copyright ©

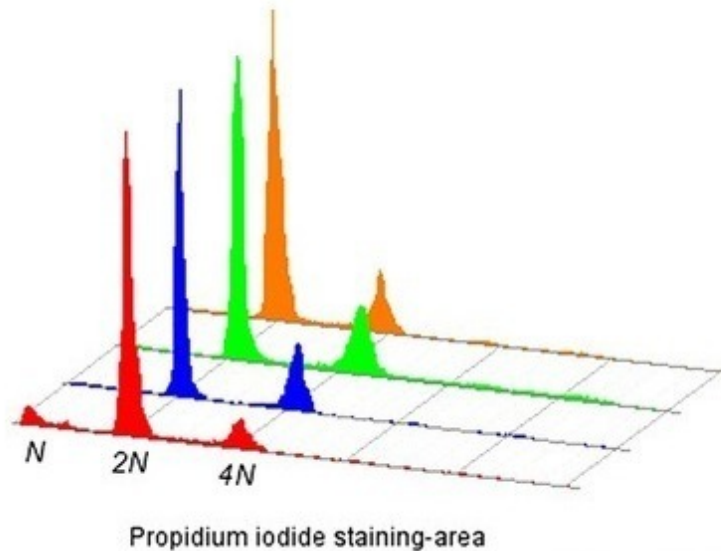
CHAPITRE 4

La Cytométrie, un technologie modulaire

La CMF : un outil modulable (analytes)

Combinaison à des analyses moléculaires

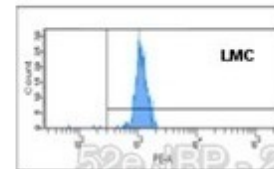
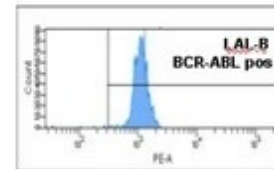
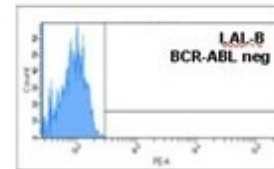
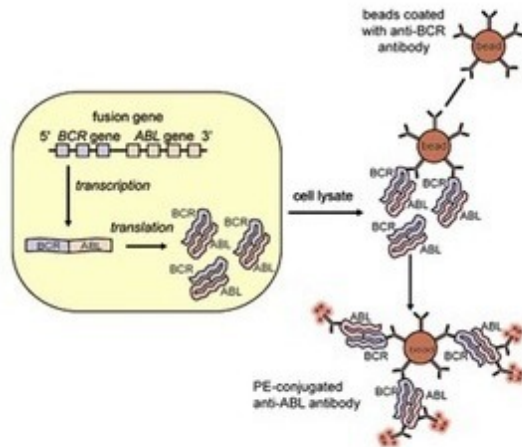
- Cycle cellulaire / Index ADN



La CMF : un outil modulable (analytes)

Combinaison à des analyses moléculaires

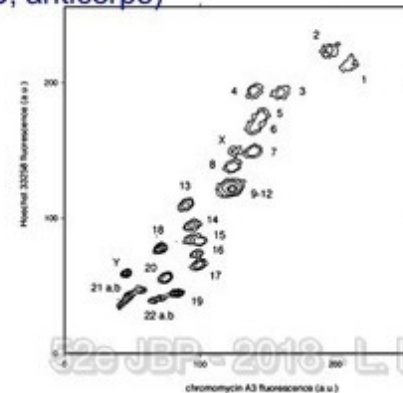
- Cycle cellulaire / Index ADN
- Microbilles de détection des protéines chimériques (EuroFlow)



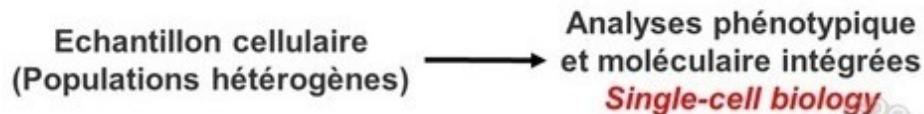
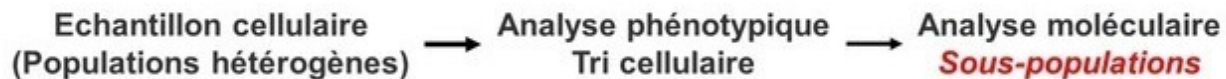
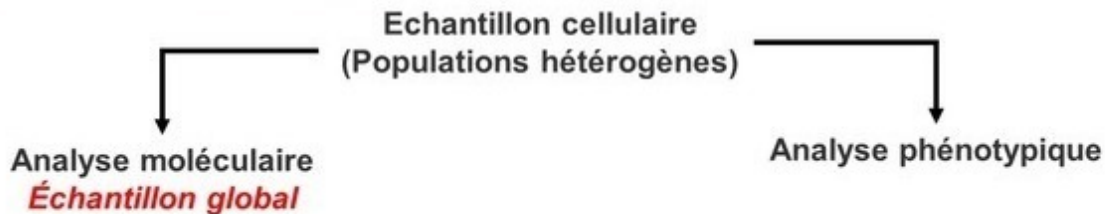
La CMF : un outil modulable (analytes)

Combinaison à des analyses moléculaires

- Cycle cellulaire / Index ADN
- Microbilles de détection des protéines chimériques (EuroFlow)
- Flow-FISH
 - PNA / LNA (Peptidic / Locked nucleic acid)
 - Mesure de la longueur des télomères
 - Détection & sensibilité bactérienne (ARN 16S, anticorps)
 - Détection & sensibilité virale, fongique, parasitaire
 - Caryotype cytométrique et tri de chromosomes (& microchromosomes)



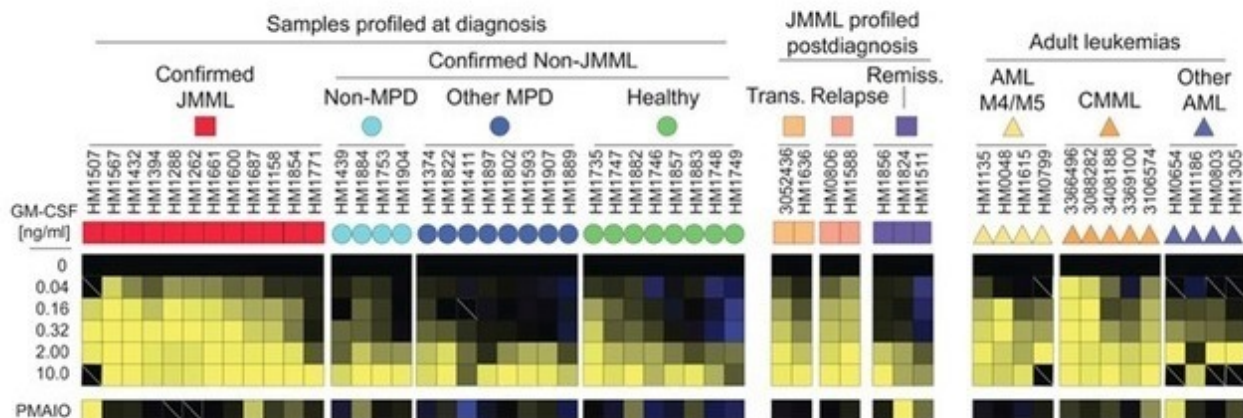
Combinaison à des analyses moléculaires



La CMF : un outil modulable (analytes)

Combinaison à des analyses biochimiques

- Analyse phosphoprotéomique



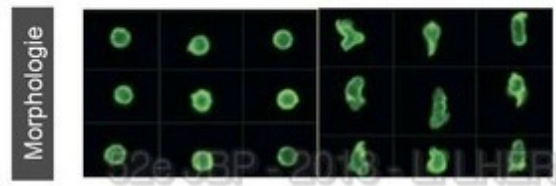
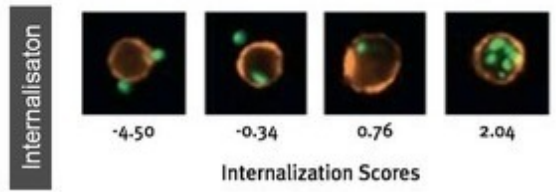
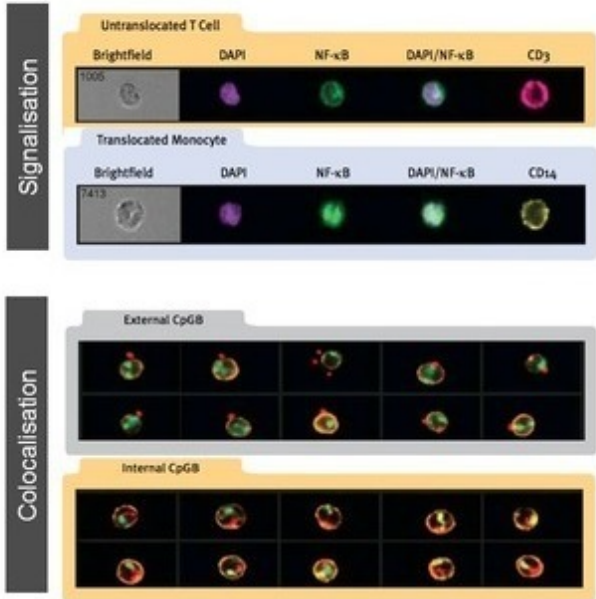
Kotecha & Nolan, Cancer Cell 2008

52e JBP - 2018 - L. LHERMITTE

La CMF : un outil modulable (analytes)

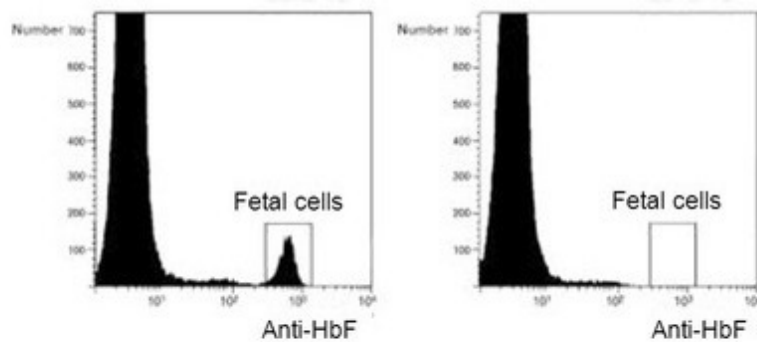
Combinaison à des analyses morphologiques

- Analyse phénotypique et morphologique à 1000 evts /s
- = « cytomètre en flux et confocal »



La CMF : un outil modulable (analytes)

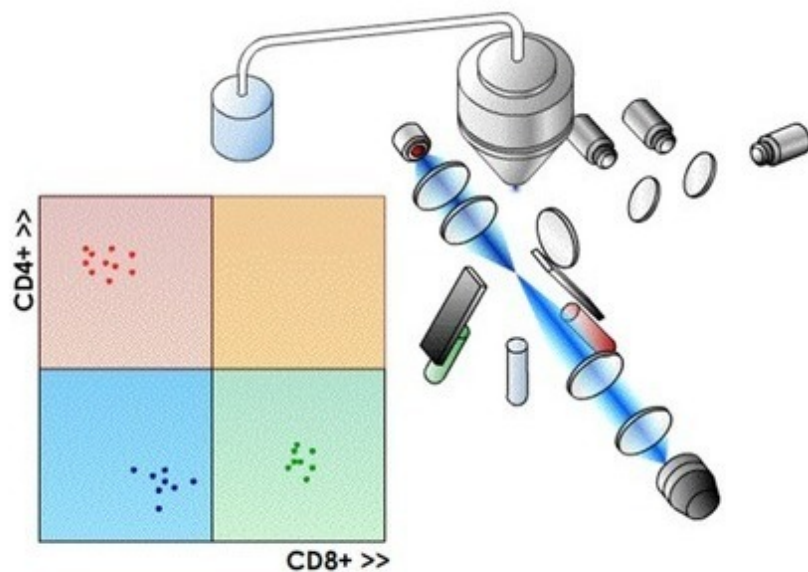
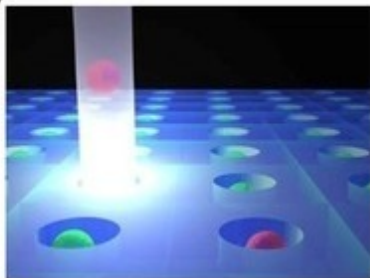
- Hématologie
- Immunologie
- Gynécologie-obstétrique (*test de Kleihauer phénotypique*)



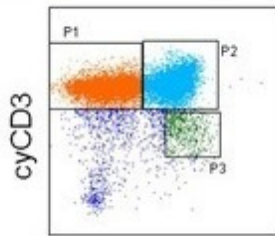
La CMF : un outil modulable (en aval)

Combinaison à un module de tri

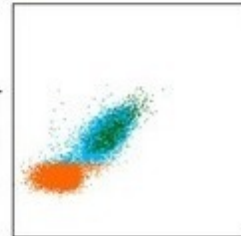
Tri cellulaire pour
Analyses moléculaires (RQ-PCR, transcriptome...)
Culture cellulaire
...



La CMF : un outil modulable (en aval)



smCD3



CD3

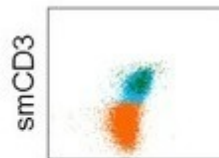
Hétérogénéité sur

CD5

CD99

TdT

CD1a



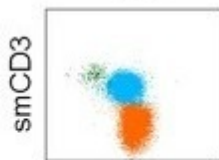
CD5



CD10



CD99



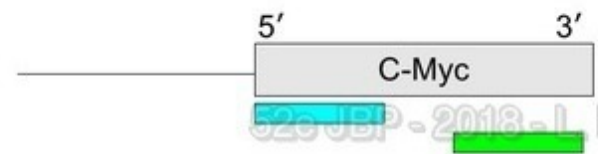
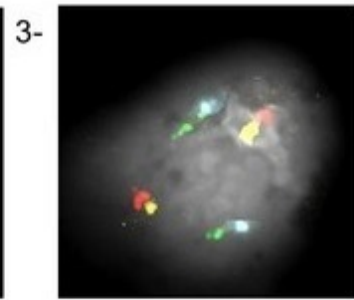
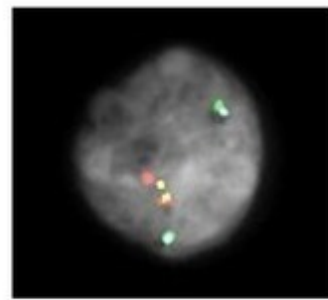
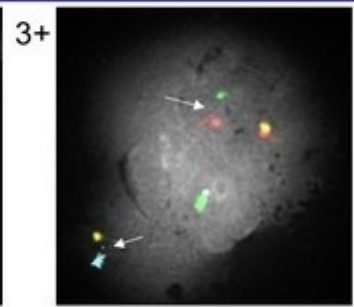
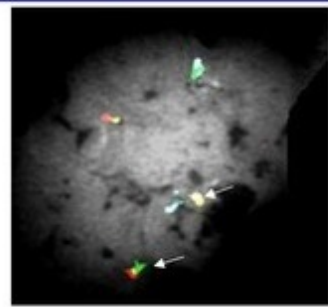
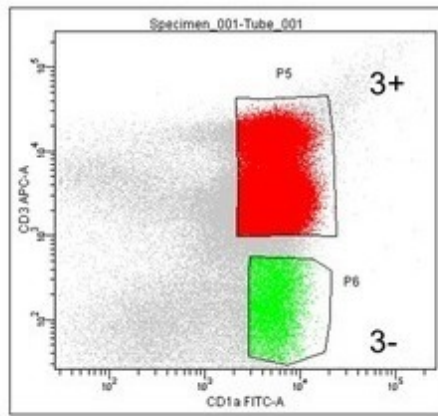
TdT



CD1a

La CMF : un outil modulable (en aval)

Author's
copyright

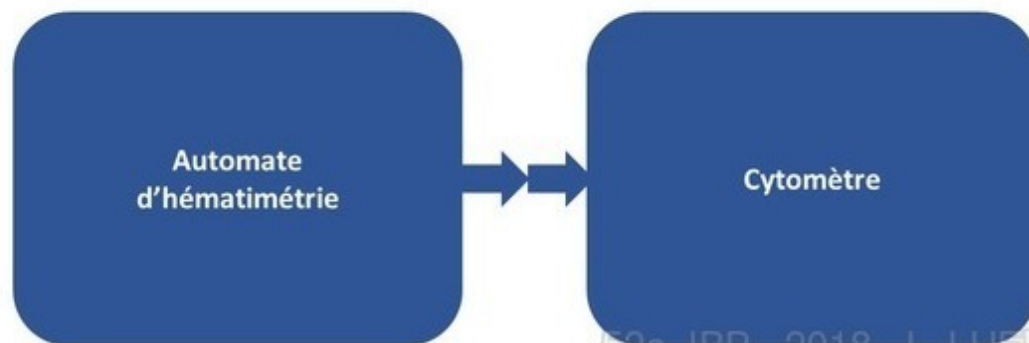


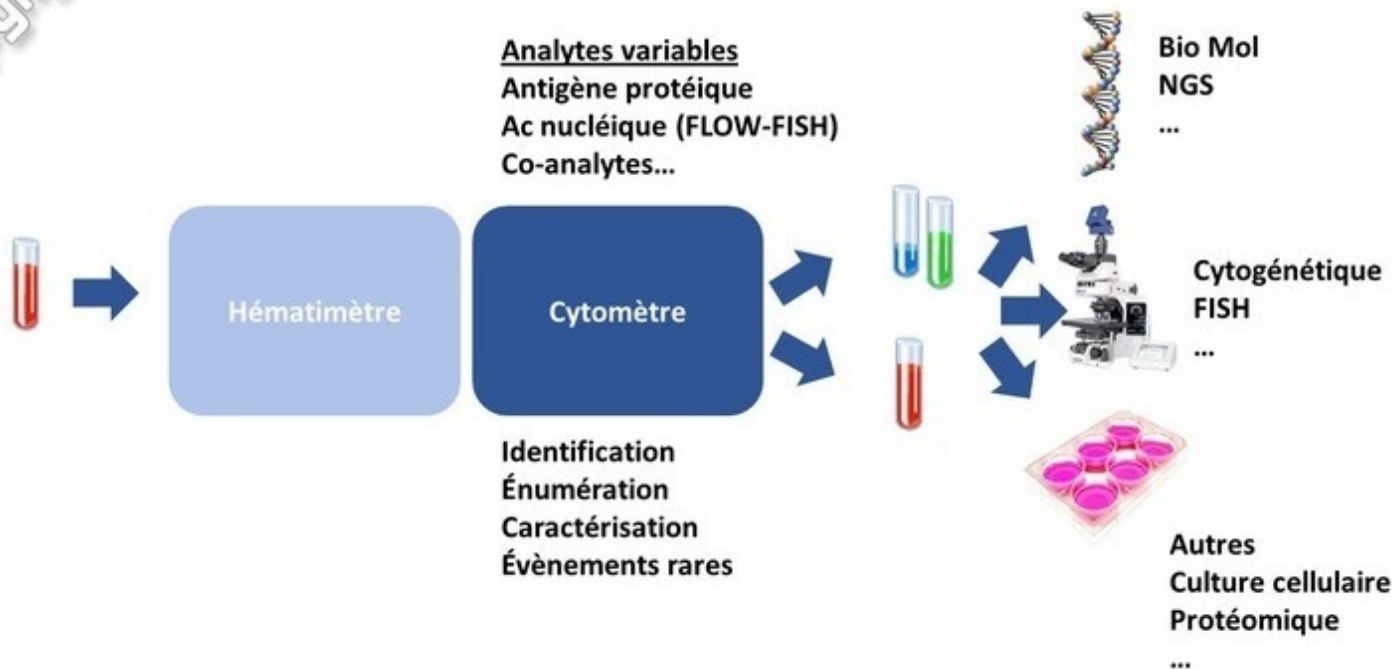
La CMF : un outil modulable (en amont)

Système intégré



Système couplé





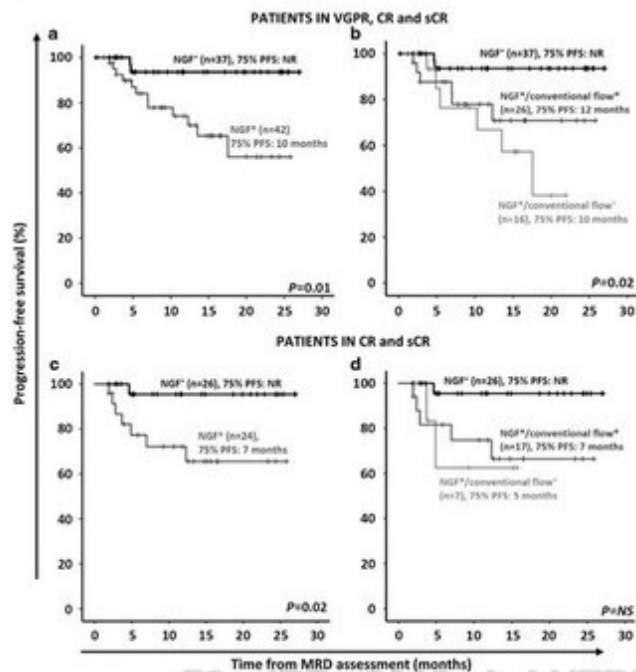
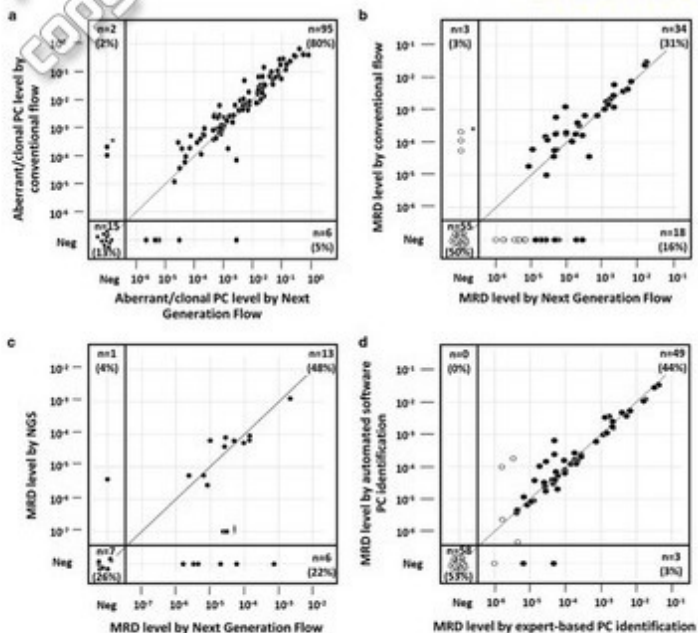
- **Mais où va-t'on ?**
- **C'est bien la question**

- **Plétorrhe de nouveaux instruments chacun avec leurs forces**
 - **Standardisation / traçabilité / accréditation**
 - **Fluidique : Vitesse d'acquisition (ex. focalisation mixte), régurgitation...**
 - **Résolution optique : photodiodes à avalanches, cytomètre spectral...**
 - **Nombre de couleurs**
 - **Automatisation hématimétrie > marquage > cytométrie**
 - **Ergonomie (compacité)**
 - **...**
 - **Bref... le marché se diversifie dans de multiples directions !**

Le mot de la fin...

Mais où va-t'on ?

NGF NEXT GENERATION FLOW



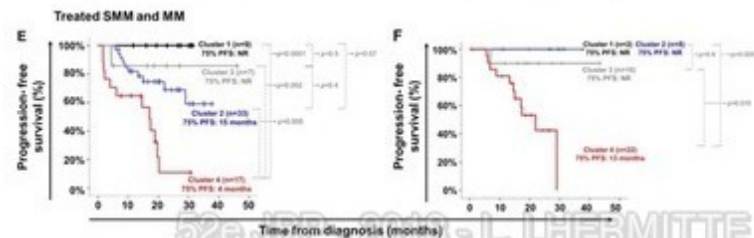
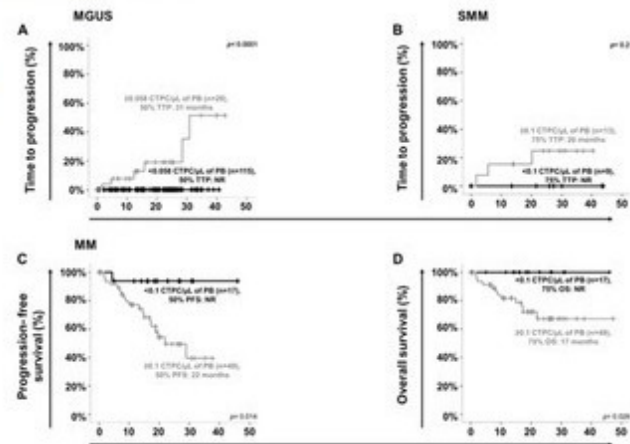
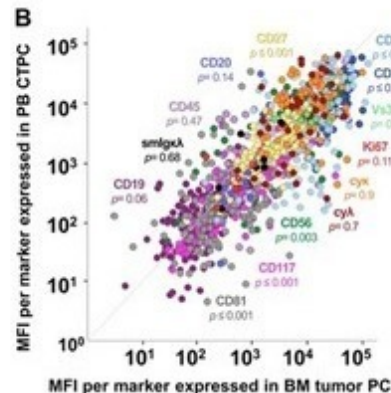
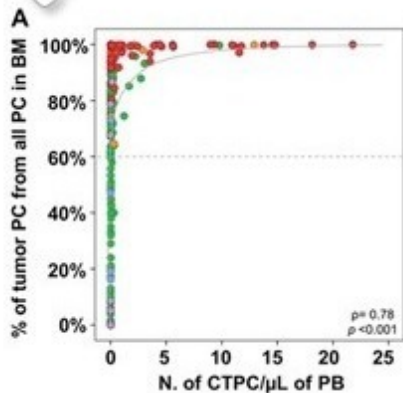
"Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma"

Flores-Montero J, Leukemia, 2017

Le mot de la fin...

Mais où va-t'on ?

NGF NEXT GENERATION FLOW



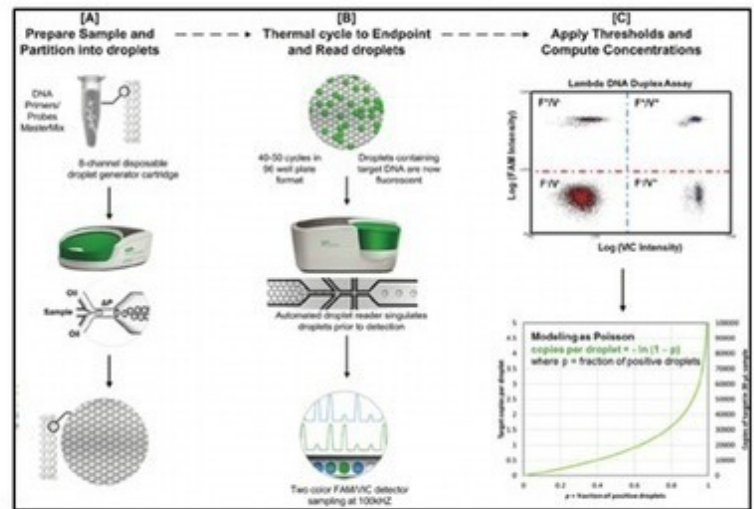
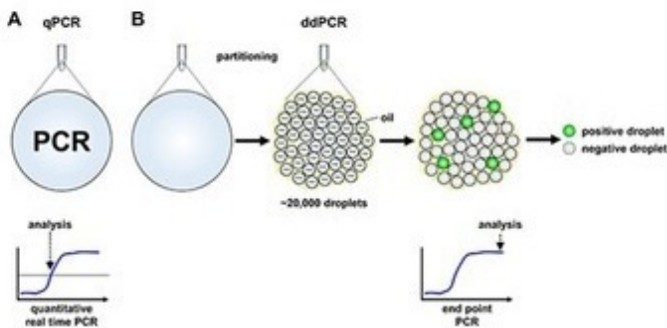
"Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC)"

Sanoja-Flores L, Blood Cancer J, 2017

Le mot de la fin...

Mais où va-t'on ?

Convergence des technologies : technologies hybrides (ex. droplet PCR)



Merci pour votre intention



« A toi d'inventer le possible. »
Proverbe Africain.