

DES de Biologie Médicale
Enseignement d'Immunologie



ED06

Cas Cliniques en Cytométrie & Immunologie cellulaire

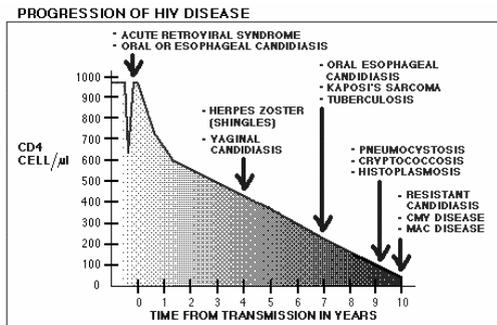
Phnom Penh
Septembre 2009

Michelle Rosenzwajg
Service de Biothérapies/UPMC CNRS
UMR7211 INSERM U959
Pitié-Salpêtrière - Paris - France
michelle.rosenzweig@upmc.fr

Intérêt de la numération CD4/CD8
pour le suivi des patients VIH+

Intérêts du dosage CD4/CD8

- C'est un marqueur de progression du déficit immunitaire:



NUMERATION DES LT CD4+/CD8+

1. Sang total (50-100 μ l)

10⁷-20⁷

2. Marquage
Incubation avec les anticorps couplés à un fluorochrome
Ex: CD45-FITC, CD3-PC5, CD4-PE, CD8-ECD

10⁷-20⁷

3. Lyse des hématies+ fixation

4. Addition des billes fluorescentes

30 min-1 heure
40-50 prélèvements

5. Analyse
10 000 cellules/1-3 min

Automatisation +++
Il existe des kits commercialisés (mélanges d'anticorps et billes de quantification)

Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)

1- Préparateur d'échantillons
Sang+ Anticorps+billes

2-Incubation et
Lyse des globules rouges

3-Passage au cytomètre avec logiciel automatisé

Résultats

NUMERATION DES LT CD4+/CD8+

•Les résultats sont exprimés en pourcentage de lymphocytes et peuvent être transformés en nombre de cellules/ μ l de sang à partir de la NFS

Cytométrie
% de CD4+ / lymphocytes

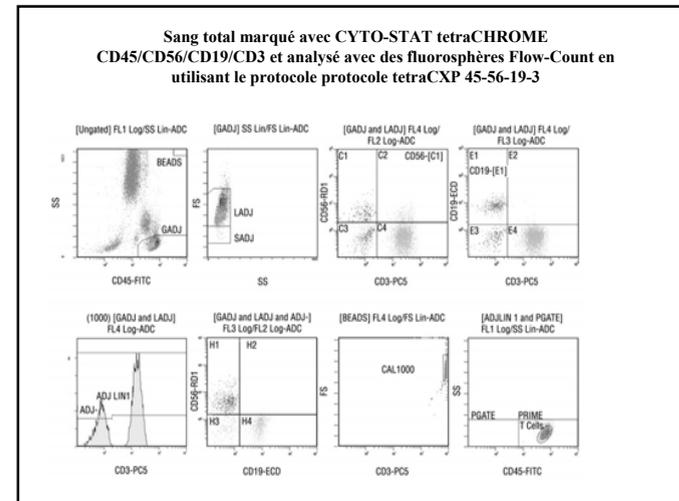
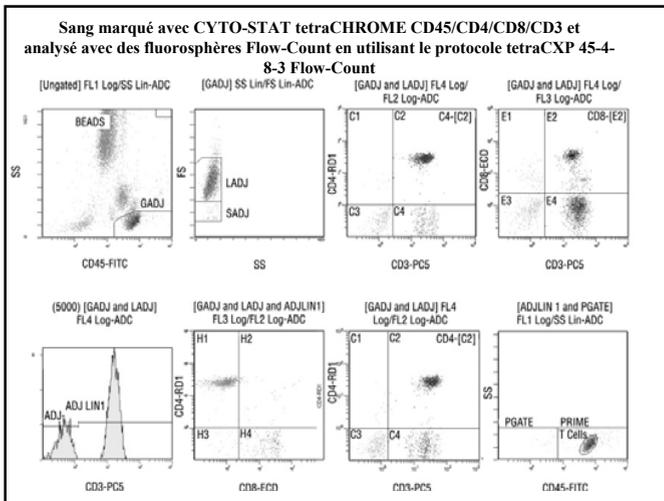
NFS: Lymphocytes/ μ l

$$CD4+/\mu l = \text{Lymphocytes}/\mu l \times \% \text{ de } CD4+$$

Ou bien

•Mesure de la valeur absolue par l'addition de de billes fluorescentes dont la quantité est connue

$$CD4+/\mu l = \frac{\text{Nb } CD4+ \text{ comptés}}{\text{Nb de billes comptées}} \times \text{cc billes}$$



Résultats

CXP Patient Panel Report		Your Facility Name	
02/16/2003 3:45pm		20 Harvard Street, Boston, MA 02119	
Sample ID: 0213079997471	Name: Jon Doe	Panel Name: IntraCXP TBNK Assay	Patient: 13579
Complete: Y	Sex: M	Physician: Jane Smith, MD	D.O.B.: 17Apr1976
LMD File Name(s): 021307999747101Jan2003	Sample Type: Whole blood	Analysis Date / Time: 01Jan2003 10:04am	CD4: 112 CD8: 333
IC 550 SR: 12345	Hematology Date / Time: 01Jan03 10:04am	WBC: $7.33 \times 10^9 / \mu\text{L}$	LY %: 35.06
CXP v1.0: IntraCXP v1.0	RBC: $4.835 \times 10^6 / \mu\text{L}$	HQ %: 9.37	NE %: 48.00
Analysis Date / Time: 01Jan2003 10:04am	PLT: $263.5 \times 10^3 / \mu\text{L}$	EO %: 6.00	BA %: 0.67
User ID: BCL			

Description	Region	Cell Pop	% Pos	Cells/µL	% Pos	Expected Range
Any Total CD4+ (T cells)	LY	70.00	11.2	5040	330-1800	
CD3+CD4+ (Helper T cells)	LY	44.30	700	2543	330-1800	
CD3+CD8+ (Suppressor T cells)	LY	23.79	376	948	45-1200	
CD3+CD56+ (NK Cells)	LY	7.62	118	236	15-401	
CD19+ (B cells)	LY	14.80	231	436	15-750	
CD4 CD8 Ratio	44	1.86				
% Total Lymphocytes (T+B+NK)	49	93.06		96-100		
CD3+ Ratio/ly Check	44	2.45		0-10		
CD3+ IntraPanel Check	49	1.80		0-2		

Comments:

Cas Cliniques

Cas n°1

NFS: Lymphocytes	6600/mm ³
CC billes du kit	1020/mm ³
	<i>Evénements Comptés par le cytomètre</i>
Billes florescentes	1100
Lymphocytes	7636
CD3+	4012
CD3+CD4+	1610
CD3+CD8+	4243
Rapport CD4/CD8	

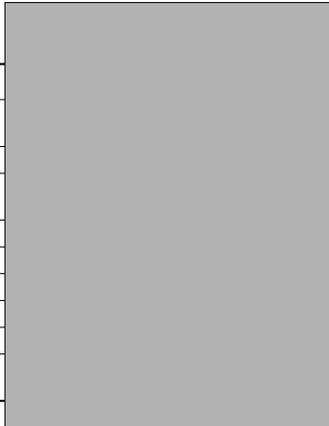
Cas n° 2

NFS: Lymphocytes	2450/mm ³
CC billes du kit	1020/mm ³
	<i>Evénements Comptés par le cytomètre</i>
Billes	1668
Lymphocytes	3909
CD3+	3469
CD3+CD4+	1096
CD3+CD8+	2308
Rapport CD4/CD8	1668

Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)

Cas n° 3

NFS:	
Lymphocytes	2450/mm ³
CC billes dns le	1020/mm ³
	<i>Événements Comptés</i>
Billes	1480
Lymphocytes	3864
CD3+	2933
CD3+CD4+	172
CD3+CD8+	2685
Rapport CD4/CD8	



Observation n°4

Mme F, 57 ans

NFS:

Leucocytes = 8500 mm³

Lymphocytes: 40% soit 3400/mm³

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes: 3200mm³

CD3+ = 32% 1024/mm³

CD3+CD4+ = 16% 512/mm³

CD3+CD8+ = 12% 384/mm³

CD19+ = 60% 1920/mm³

- 1) Interprétation des pourcentages
- 2) Interprétation des valeurs absolues et diagnostics évoqués.
- 3) Quels examens feriez vous pour le confirmer et qu'en attendez vous?

Observation n°5

Mr Z, 31 ans

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes: 1380 / mm³

CD3+ = 76%

CD3+CD4+ = 4%

CD3+CD8+ = 67%

- 1) Interprétation des pourcentages et valeurs absolues.
- 2) Calculer le rapport CD4/CD8
- 3) Quel diagnostic évoquez vous? Comment le confirmer?

Observation n°6

Mr M, 36 ans, transplantation hépatique

NFS:

Leucocytes = 2215/ mm³

Lymphocytes: 20% soit 443/mm³

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes: 450 / mm³

CD3+ = 8%

CD3+CD4+ = 2%

CD3+CD8+ = 8%

CD3+ = 35/mm³

CD3+CD4+ = 9/mm³

CD3+CD8+ = 22/mm³

- 1) Interprétation des pourcentages et valeurs absolues.
- 2) Quel diagnostic évoquez vous?

Serum antilymphocytaire

Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)

Observation n° 7

Mr N, 45 ans, Candidose buccale+ toxoplasmose cérébrale

NFS:

Leucocytes =	26/06/04 3480/ mm3	28/09/04 3970/ mm3
Lymphocytes:	42% soit 1462/mm3	46% soit 1826/mm3

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes:	1435 / mm3	1865/mm3
CD3+CD4+ =	10 %	10 %
CD3+CD8+ =	58 %	61 %

- 1) Interprétation des pourcentages et valeurs absolues.
- 2) Quel diagnostic évoquez vous? Quels examens complémentaires feriez vous pour le confirmer
- 3) Vous désirez explorer l'immunité cellulaire de ce patient, par quels examens pourriez vous avoir une idée de son statut immunologique?

CD3+CD4+ = 143/mm3	CD3+CD4+ = 186/mm3
CD3+CD8+ = 832/mm3	CD3+CD8+ = 1138/mm3

SIDA
Sérologie VIH
Charge virale

Test de prolifération

Observation n° 8

L, 7 ans, fièvre + angine

NFS:

Leucocytes = 9000/ mm3
Lymphocytes: 45% soit 4050/mm3

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes: 3990 / mm3
CD3+= 65%
CD3+CD4+ = 38 %
CD3+CD8+ = 25 %
CD19+= 25 %

- 1) Interprétation des pourcentages et valeurs absolues.
- 2) S'il s'agissait d'un adulte ces résultats vous seraient-ils normaux?

Observation n° 9

Mr D, 43 ans, tuberculose chez un patient VIH+

NFS:

Leucocytes = 6500/ mm3
Lymphocytes: 51% soit 3315/mm3

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes: 3285 / mm3
CD3+= 89%
CD3+CD4+ = 5 %
CD3+CD8+ = 71 %

- 1) Interprétation des pourcentages et valeurs absolues.
- 2) Comment expliquez vous que la somme des CD3+CD4+ et des CD3+CD8+ soit inférieure à la valeur des CD3+

Observation n° 11

Mme X, 77 ans

NFS:

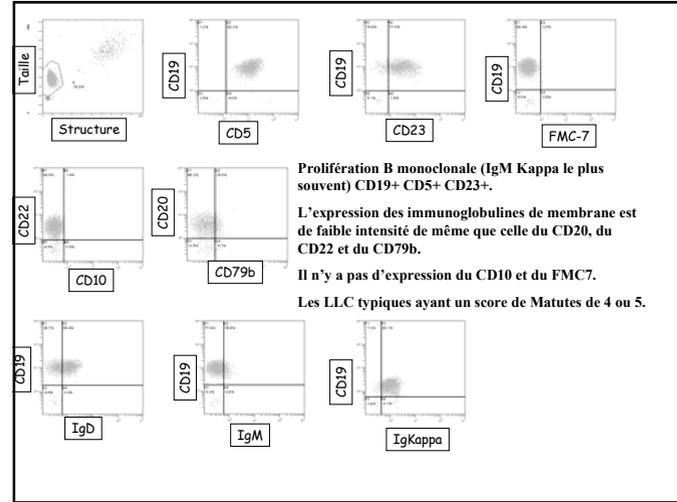
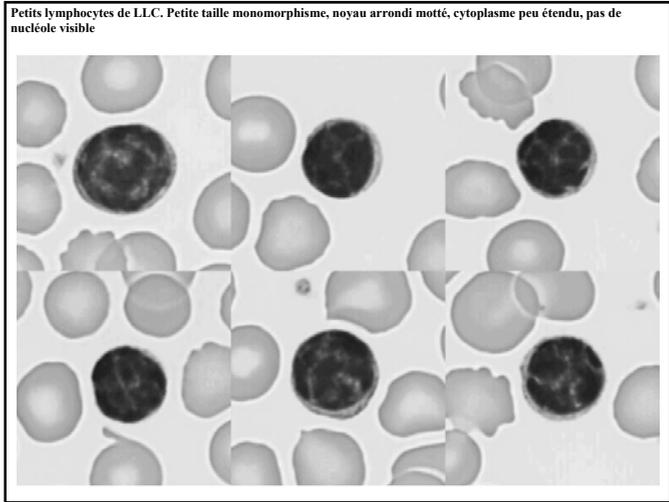
Leucocytes = 10000 mm3
Lymphocytes: 72% soit 7200/mm3

Immunophénotypage en cytométrie de flux

Lymphocytes: 7250/mm3
CD3+ = 20%
CD3+CD4+ = 10%
CD3+CD8+ = 8 %
CD16+CD56+ = 4%
CD19+ = 75%

- 1) Interprétation des résultats
- 2) diagnostics évoqués. Que feriez vous pour le confirmer?

Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)



Syndromes LymphoProlifératifs (LLC, LNH ...): Score de Matutes

Marqueurs	1 point	0 point
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
CD22/CD79b	Faible intensité	Modérée/Forte
Ig	Faible intensité	Modérée/Forte

LLC Typique score = 4 ou 5
Autre SLP score = 0, 1 ou 2

Homme (60 ans)

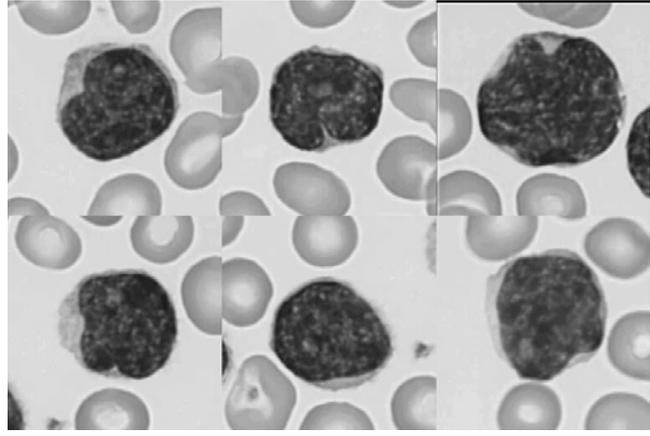
NFS
Leucocytes 31.7
 Hématies 3.21
 Hémoglobine 9.9
 Hématocrite 29.2
 Plaquettes 306

FORMULE LEUCOCYTAIRE
 Polynucléaires éosinophiles 1.0 0.3
 Polynucléaires basophiles 0.0 0.0
Lymphocytes 68.0 21.6 La plupart étant des lymphocytes clives
 Monocytes 9.0 2.9

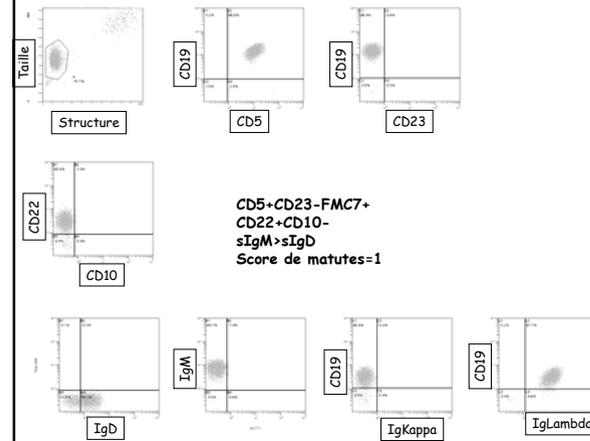
Myelogramme
 Présence dans une moelle riche d'une infiltration par des cellules lymphoïdes le plus souvent assez matures : de taille moyenne, à noyau à chromatine assez dense, rond ou parfois très irrégulier, parfois nucléolé, avec la présence de cellules de plus grande taille à chromatine fine et nucléolée et de cellules franchement blastiques. Localisation médullaire d'un lymphome à cellules plutôt matures mais avec un contingent de cellules jeunes.

Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)

Cellules très polymorphes (variables d'un malade à l'autre). Noyau à chromatine modérément dense, nucléole inconstant, surtout caractérisé par un contour irrégulier ; cytoplasme modérément basophile.



LNH B: Lymphome du manteau



Femme de 68 ans: Bilan d'une hyperlymphocytose

Leucocytes	18.5	10 ⁹ /l
Hématies	3.85	10 ¹² /l
Hémoglobine	11.7	g/dl
Hématocrite	35.9	%
Plaquettes	173	1 0 ⁹ /l

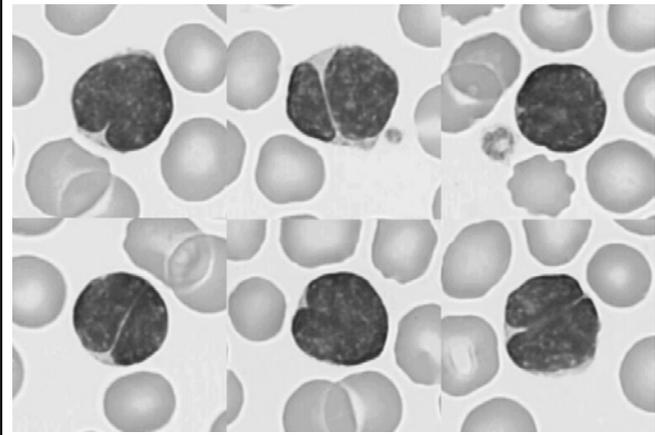
FORMULE LEUCOCYTAIRE

Polynucléaires neutrophiles	18.0	3.3	(1.7-7.5)
Polynucléaires éosinophiles	2.0	0.4	(0-0.5)
Polynucléaires basophiles	0.0	0.0	(0-0.1)
Lymphocytes	76.0	14.1	(1.5-4)

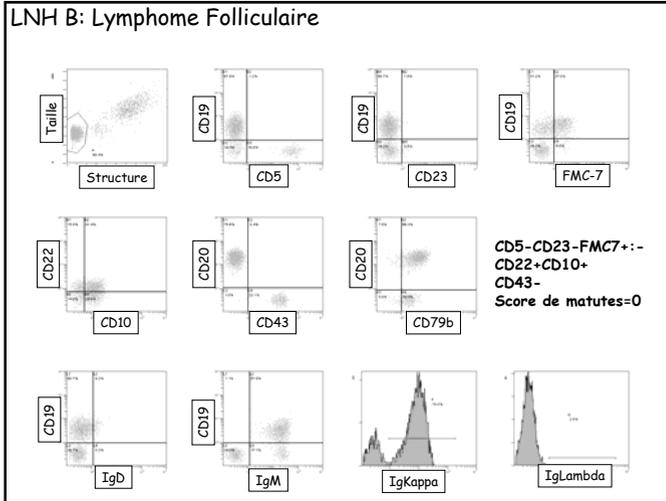
La grande majorité des lymphocytes sont à haut rapport nucléocytoplasmique et à noyau encoché.

Monocytes	4.0	0.7	(0.4-1)
-----------	-----	-----	---------

Phase leucémique de lymphome folliculaire. Cellules caractérisées par leur petite taille avec rapport N/C très élevé (cytoplasme parfois presque invisible). Les cellules les plus caractéristiques ont une encoche nucléaire très étroite.



Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)



Femme 66 ans (Splénomégalie++)

NUMERATION GLOBLAIRE

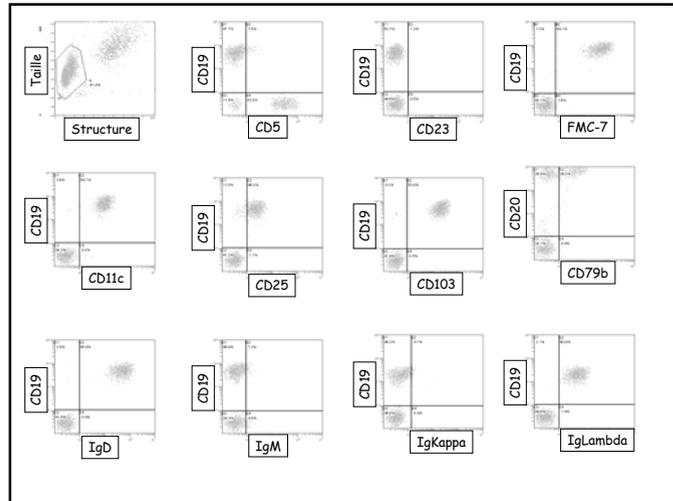
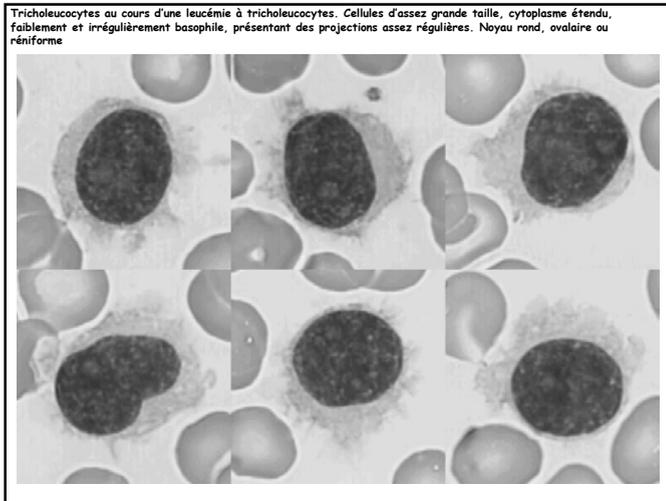
Leucocytes	3.4	10 ⁹ /l
Hématies	3.93	10 ¹² /l
Hémoglobine	11.7	g/dl
Hématocrite	35.3	%
Plaquettes	59	10 ⁹ /l

FORMULE LEUCOCYTAIRE

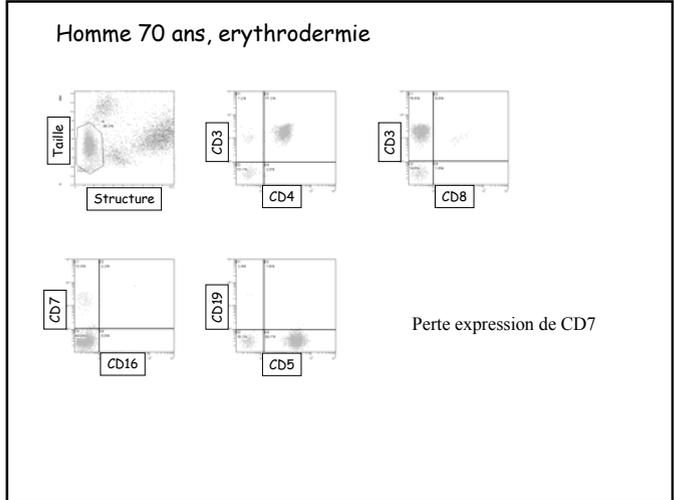
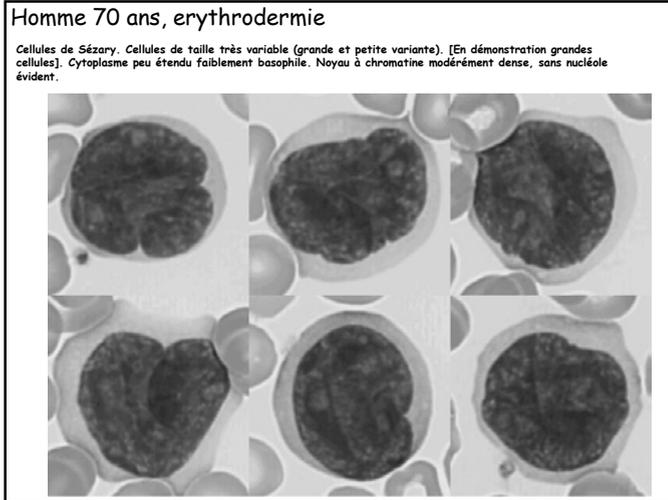
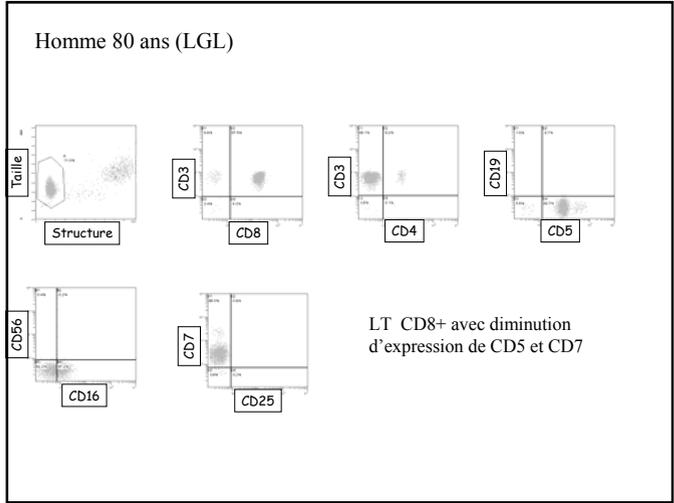
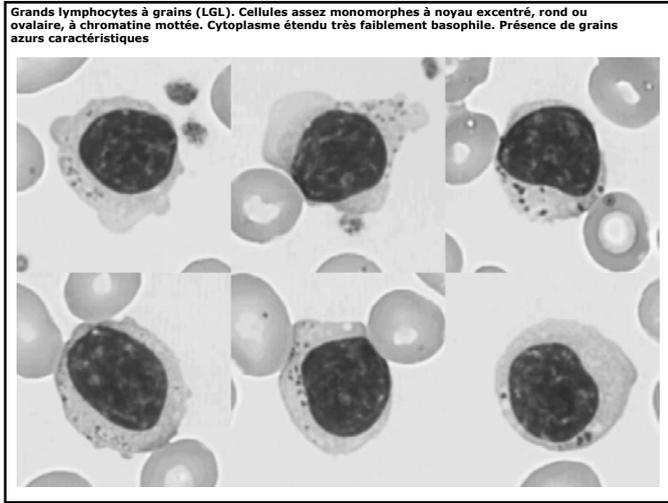
Polynucléaires neutrophiles	31.0	1.1	(1.7-7.5)
Polynucléaires éosinophiles	2.0	0.1	(0-0.5)
Polynucléaires basophiles	0.0	0.0	(0-0.1)
Lymphocytes	44.0	1.6	(1.5-4)
Monocytes	0.0	0.0	(0.4-1)
Cellules atypiques	23.0	0.8	

DE TYPE LYMPHOÏDE, ATYPIQUES, ÉVOQUANT SOIT DES LYMPHOCYTES VILLEUX SOIT TRICHOLEUCOCYTES

Moelle de richesse moyenne infiltrées par 37% de cellules lymphoïdes mures à contour cytoplasmiques vilieux évoquant soit une leucémie à tricholeucocytes soit un lymphome splénique à lymphocytes vilieux. Ces cellules sont identiques à celles retrouvées dans le sang. Un immunophénotypage sanguin serait souhaitable.



Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)



Analyse phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes

Mr Y 22 ans

Exploration pour suspicion de déficit immunitaire

Résultats de l'immunophénotypage

LT CD3+:	65%	2795/mm³
LT CD3+CD4+:	43%	1849/mm ³
LT CD3+CD8+:	19%	817/mm ³
LT CD3+TCR α b	64%	2252/mm ³
LT CD3+TCR γ δ	1%	43/mm ³
NK CD16+CD56+:	2%	83/mm³
LB CD19+:	30%	1290/mm³

Mr Y 22 ans suite

LT CD4+:		
CD3+CD4+:	43%	1849/mm ³
CD4+CD45RA:	23%	989/mm ³
CD4+CD45RO:	20%	860/mm ³
CD4+CD28+:	42%	1806/mm ³
CD4+DR+:	4%	172/mm ³
CD4+CD25+:	7%	301/mm ³

LB CD19+:	30%	1290/mm³
CD19+kappa+:	17%	731/mm ³
CD19+lambda+:	13%	559/mm ³

Mr Y 22 ans suite

Test de prolifération

	Témoin Autologue	Toxine Tétanique	PPD	Candidine	PHA
Cpm brut	30	3600	92	15548	38930
Cpm net		3570	62	15518	38900
Index (IP)		119	2	517	1296
Résultat					

Normes du labo pour un Ag nominal: cpm>3000 et IP >3

Normes du labo pour un mitogène: cpm>10000 et IP >35

Interpréter ces résultats et dire quelles sont vos hypothèses devant ces résultats?

Cours d'immunologie – DES Biologie médicale (USSL & USSC)

Mr B 25 ans infections virales à répétition

Résultats de l'immunophénotypage

LT CD3+: 65% 2795mm3
LT CD3+CD4+: 43% 1849/mm3
LT CD3+CD8+: 19% 817/mm3

LT CD4+
CD3+CD4+: 43% 1849/mm3
CD4+CD45RA: 40% 1720/mm3
CD4+CD45RO: 3% 129/mm3
CD4+CD28+: 5% 215/mm3

Interpréter ces résultats et dire quelles sont vos hypothèses devant ces résultats

Mr B 25 ans infections virales à répétition
 Tests de prolifération avec les Ag nominaux et PHA

	Témoin Autologue	Toxine Tétanique	PPD	Candidine	PHA
Cpm brut	30	110	92	80	35535
Cpm net		80	62	50	35505
Index (IP)		2.6	2	1.66	1183
Résultat					

Normes du labo pour un Ag nominal: cpm>3000 et IP >3
 Normes du labo pour un mitogène: cpm>10000 et IP >35

Interpréter ces résultats et dire quelles sont vos hypothèses devant ces résultats

Dans le cadre d'un bilan pré-greffe on réalise une MLR entre trois frères: Jean Michel (receveur), Pierre et Dominique (donneur?)

	Jean Michel*	Pierre*	Dominique*	Témoin*
Jean Michel				
Cpm	187	2760	6851	17732
IS	1	14,8	43	95
Pierre				
Cpm	6814	171	7050	93612
IS	40	1	45	547
Dominique				
Cpm	5650	9850	156	86462
IS	36	58	1	554

Interpréter ces résultats et que concluez vous devant ces résultats?

Si les résultats étaient les suivants, votre conclusion serait elle identique?

	Jean Michel*	Pierre*	Dominique*	Témoin*
Jean Michel				
Cpm	187	217	6851	17732
IS	1	1.2	43	95
Pierre				
Cpm	300	171	7050	93612
IS	1.7	1	45	547
Dominique				
Cpm	5650	9850	156	86462
IS	36	58	1	554