



## Stratégies de dépistage et de classification phénotypique des hémopathies lymphoïdes T matures

### Project Plan

**CytHem HPN** Groupe de travail sur l'Hémoglobinurie Paroxystique Nocturne

**CytHem SEZARY** Groupe de travail sur le Syndrome de Sézary

**CytHem QUESTIONS** Groupe de travail sur des Questions pratiques

**CytHem SMD** Groupe de travail sur les Syndromes Myélodysplasiques

**CytHem LMMC** Groupe de travail sur les Leucémies Myélomonocytaires Chroniques

**CytHem LAM** Groupe de travail sur les Leucémies Aiguës Myéloïdes

**CytHem LOC** Groupe de travail sur les Lymphomes Oculo-Cérébraux

**CytHem MYELOME** Groupe de travail sur les Syndromes Myélomateux

**CytHem SLP B** Groupe de travail sur les syndromes lymphoprolifératifs B

**CytHem NKT** Groupe de travail sur les hémopathies des cellules T matures et NK (hors syndrome de Sézary)

**CytHem LAL** Groupe de travail sur les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques

# CytHem NKT



**Mikael  
ROUSSEL**

Organisateur  
CytHem-NKT

Laboratoire d'Hématologie et  
INSERM U1236

Hôpital Universitaire Pontchaillou

Rennes - France



**Françoise  
SOLLY**

Organisatrice  
CytHem-NKT

Laboratoire central d'hématologie  
CHUV

Lausanne - Suisse



**Ludovic  
LHERMITTE**

Organisateur  
CytHem-NKT

Laboratoire d'Onco-hématologie

Hôpital Necker-Enfants-Malades

Paris - France

# CytHem NKT



## **Structuration du groupe NK/T**

*Toutes les hémopathies T matures hors Sezary*



## **Définition des axes thématiques**

*Répondre à des besoins communs dans la communauté*



## **Définition des objectifs**

*'Steps' & 'Milestones' du/des projet(s)*

# WHO classification

## Groupe hétérogène d'hémopathies dérivées de la lignée lymphoïde T ou NK au stade mature

- 9 familles
- Critères de classification:
  - Cellule d'origine / stade de différenciation
  - Présentation clinique
  - Localisation de la maladie
  - Cytomorphologie
- Non-séparé en 2 catégories:
  - Certaines entités ↔ spectre NK, T, phénotype hybride ou intermédiaire  
Ex. lymphome NK/T extranodal
  - Certaines entités : distinction NK / T difficile à déterminer

# WHO classification

## 9 familles

1. **Leucémies T ou NK matures**
2. Lymphoproliférations et lymphomes T cutanés
3. **Lymphoproliférations et lymphomes T intestinaux**
4. **Lymphome hépatospléniques T $\gamma\delta$**
5. **Lymphome anaplasique à grandes cellules**
6. **Lymphome Tfh nodal**
7. **Autres lymphomes T périphériques**
8. Lymphomes T et NK EBV+
9. Lymphoproliférations et lymphomes NK et T EBV+ de l'enfant

# WHO classification

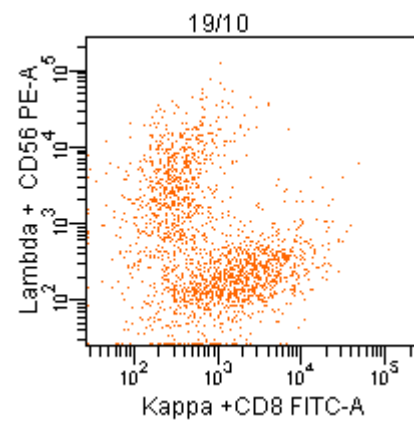
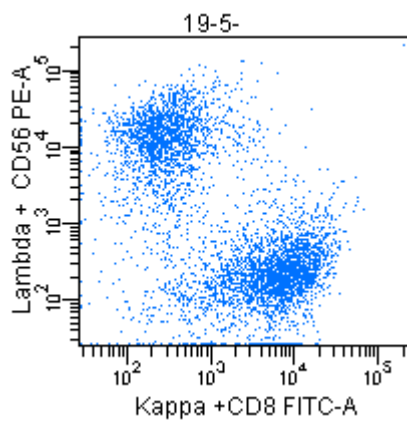
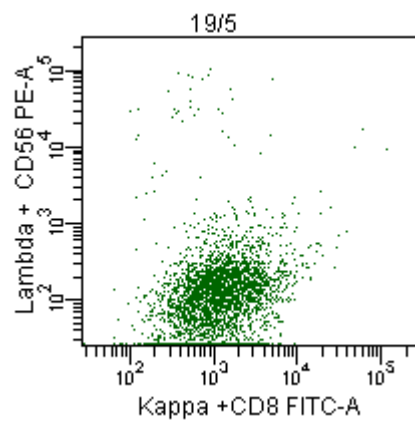
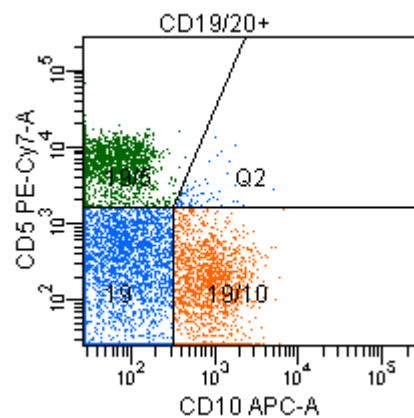
## 6 maladies

1. Leucémie prolymphocytaire T
2. Leucémie à LGL T
3. Leucémie à LGL NK
4. Leucémie / Lymphome T de l'adulte
5. Syndrome de Sezary
6. Leucémie à NK agressive

# Positionnement de la cytométrie en flux

<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>Percp-Cv5,5</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>APC</b>	<b>Alex 700</b>	<b>PO</b>	<b>Pacific Blue</b>
Kappa+ CD8	Lambda+ CD56	CD19	CD5	CD10	CD3	CD45	CD20+CD4

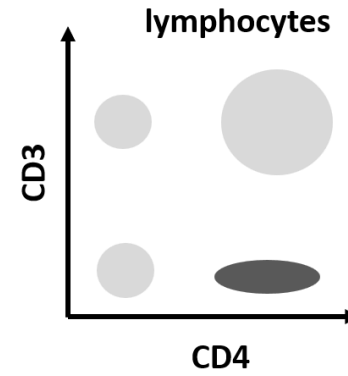
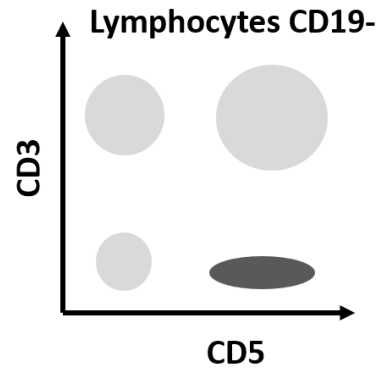
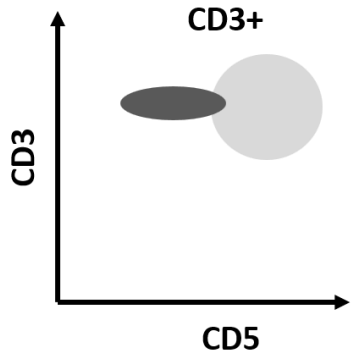
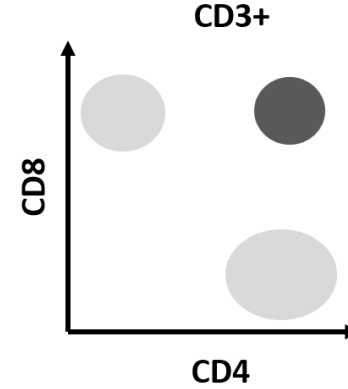
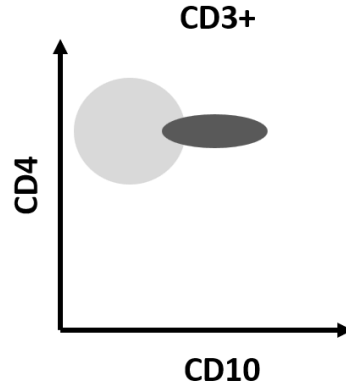
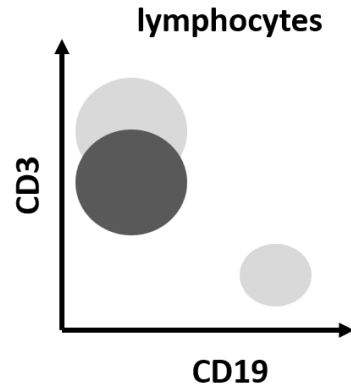
# Positionnement de la cytométrie en flux



# Positionnement de la cytométrie en flux

<b>FITC</b>	<b>PE</b>	<b>Percp-Cv5,5</b>	<b>PE-Cy7</b>	<b>APC</b>	<b>Alex 700</b>	<b>PO</b>	<b>Pacific Blue</b>
Kappa+ CD8	Lambda+ CD56	CD19	CD5	CD10	CD3	CD45	CD20+CD4

# Positionnement de la cytométrie en flux



# Positionnement de la cytométrie en flux

- **Modulation des antigènes pan-T ++++++**

Perte d'un antigène pan-T: CD7 > CD3 > CD5 > CD2

Dépend de la population

- Hémopathies T CD8 ⇔ CD5++++
- Hémopathies T CD4 ⇔ CD7++++

Parfois up-regulation: CD7 CD2 CD5 (strong)

- **Aberration phénotypique**

Co-expression CD4/CD8

Phénotype TCRαβ+ CD4/CD8 DN

3- 4+ (HES)

4+ 56+ (ALCL)

- **Marqueurs spécifiques**

CD25+ DR+

ATLL

CD26-

SS

CD158k/KIR3DL2+ fort

SS

CD30+

ALCL

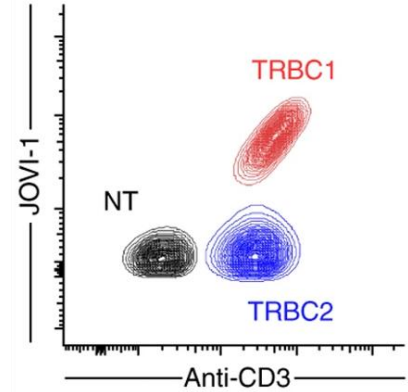
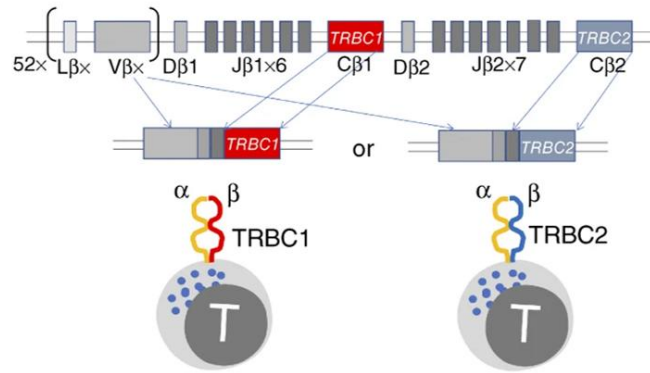
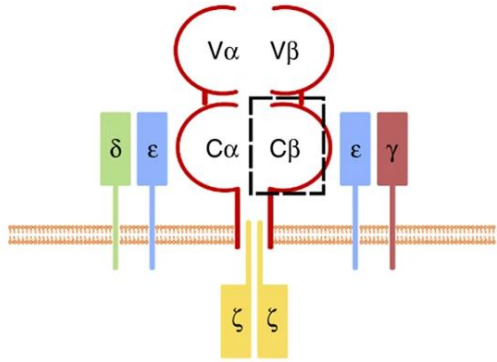
CD10+

nTFHL

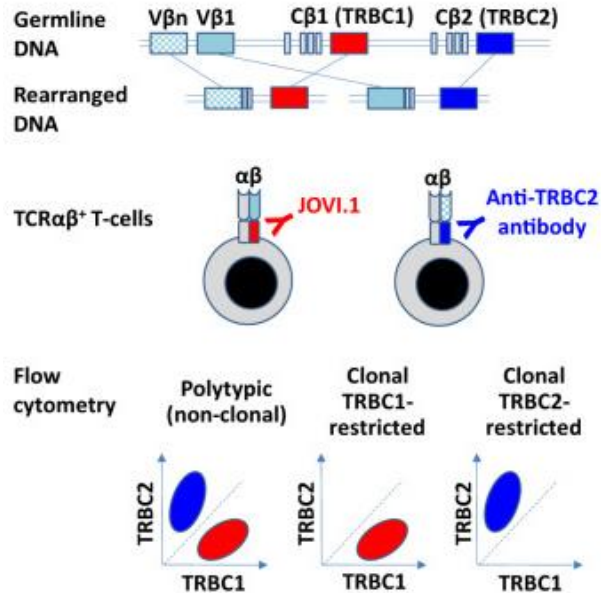
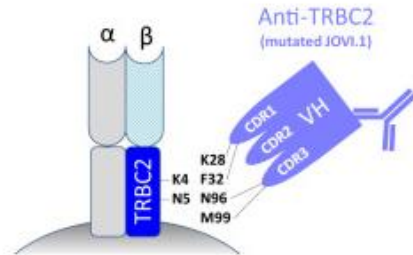
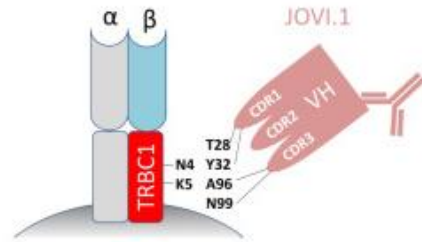
CD56+ CD16+ CD57+

T-LGLL

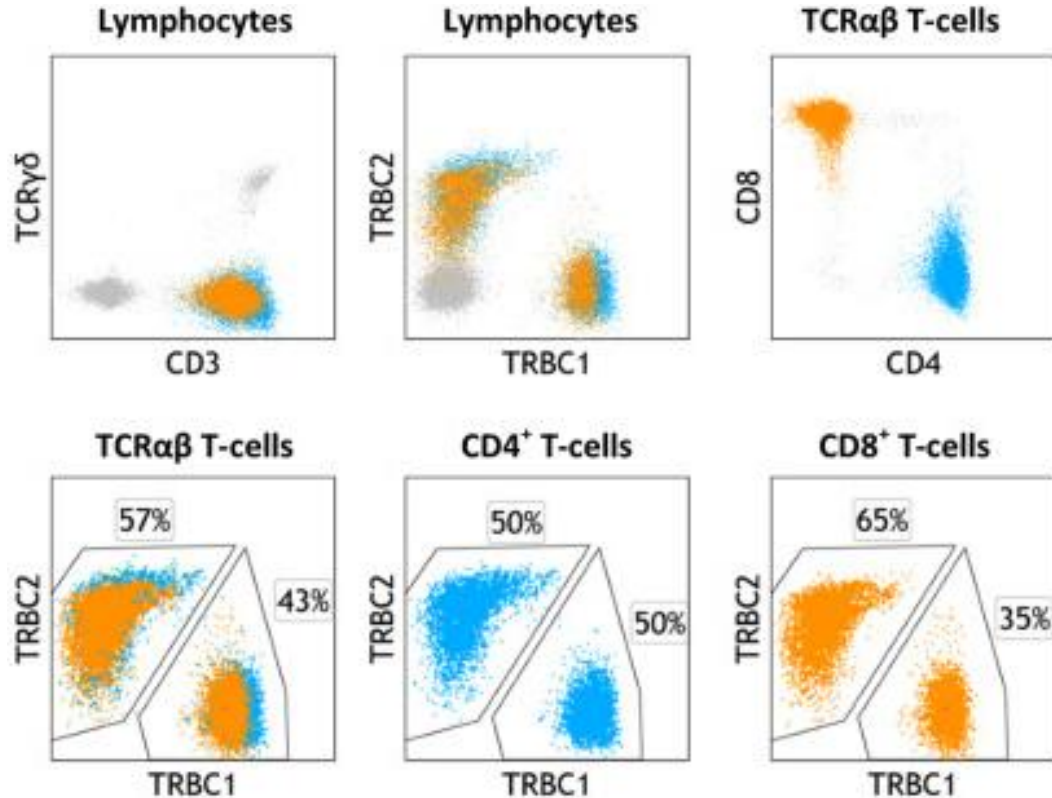
# TRBC1/TRBC2 : un game-changer ?



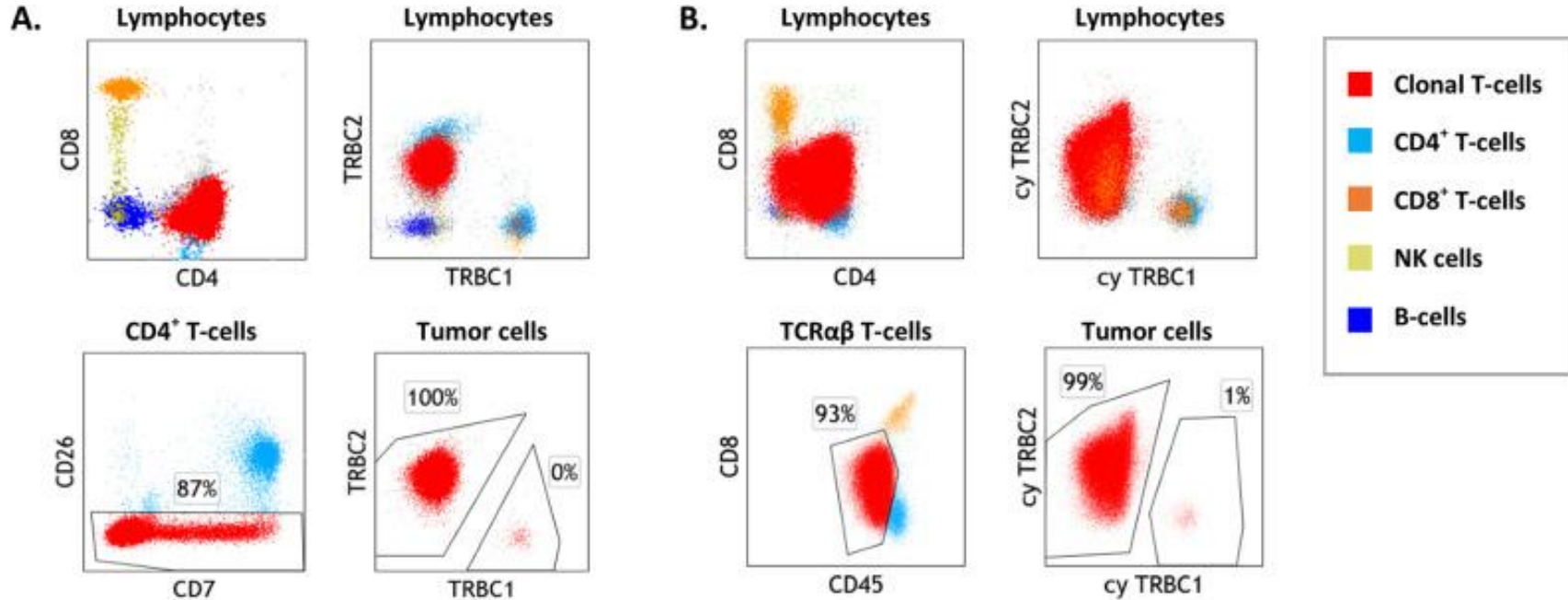
# TRBC1/TRBC2 : un game-changer ?



# TRBC1/TRBC2 : un game-changer ?



# TRBC1/TRBC2 : un game-changer ?



# TRBC1/TRBC2 : Un objectif commun



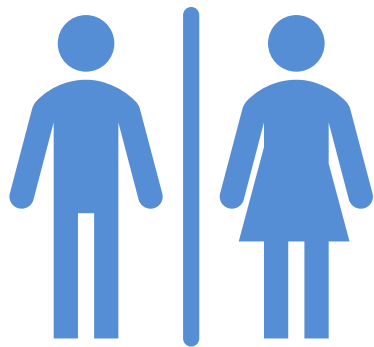
## **Apprivoiser & Généraliser l'utilisation de l'évaluation phénotypique de la polytypie des lymphocytes T**

*Faire tous à peu près la même chose*

*Démocratiser l'évaluation phénotypique de la polytypie*

*Mutualiser les tests et l'expérience*

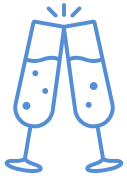
# TRBC1/TRBC2 : Un objectif commun



## Ret-Ex & Partage d'expérience

*Mikael Roussel Rennes,  
Rémi Letestu, Avicenne  
Françoise Solly, Lausanne  
Ludovic Lhermitte, Paris*

# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



## Intérêt de la combinaison TRBC1/C2 ? Intérêt subsetting ?

*TRBC1 développé avant TRBC2*



## Optimisation des marquages

*Obtenir des marquages résolutifs robustes  
Marquage séquentiels  
Gamme d'anticorps disponibles*



## Artefacts techniques

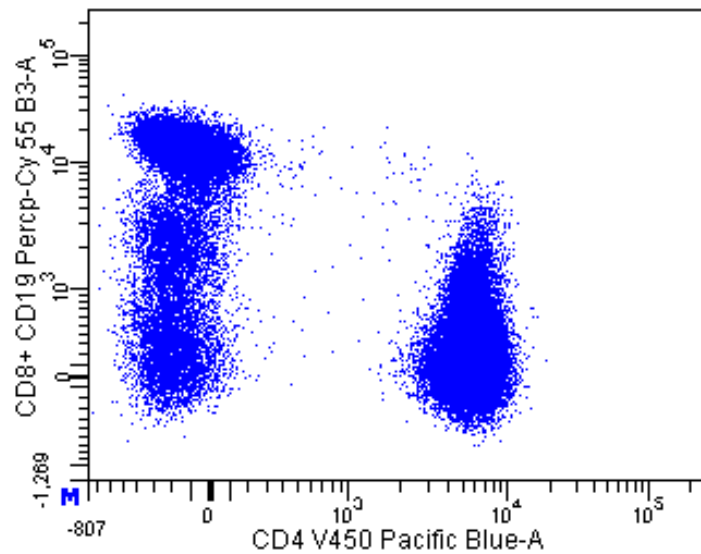
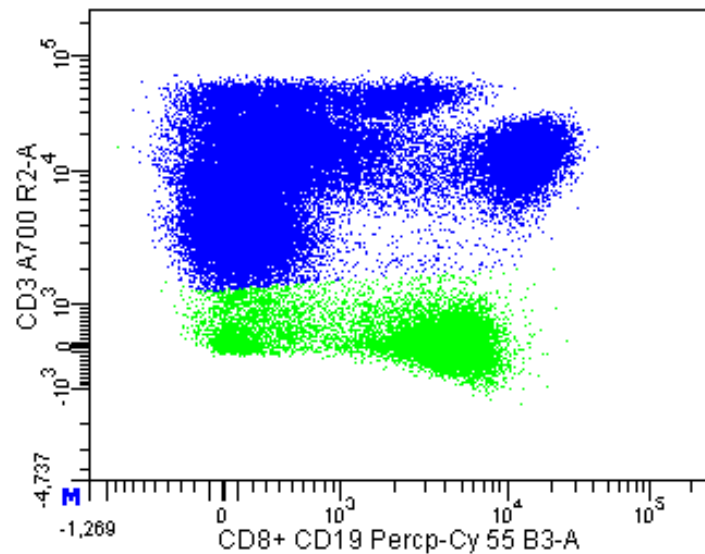
*FRET involontaire avec le CD3*



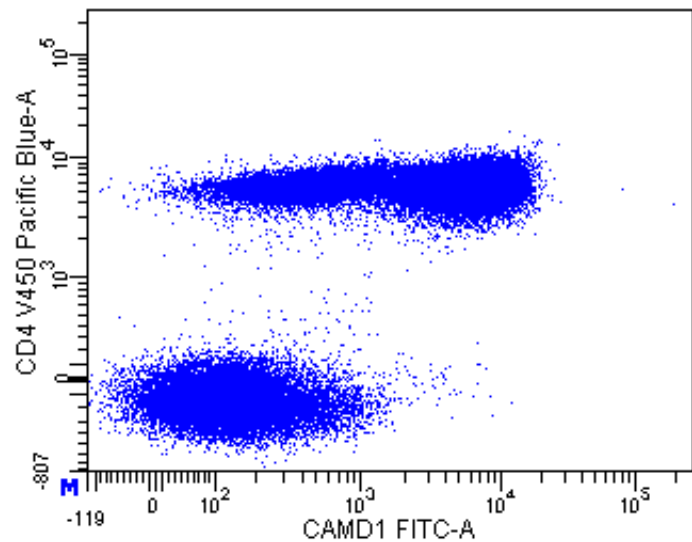
## Interprétation

*Définition des seuils  
Lymphoproliférations T réactionnelles*

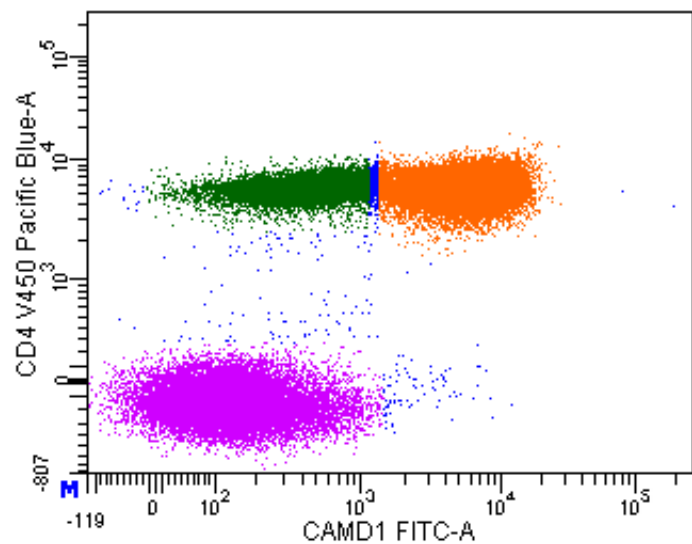
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



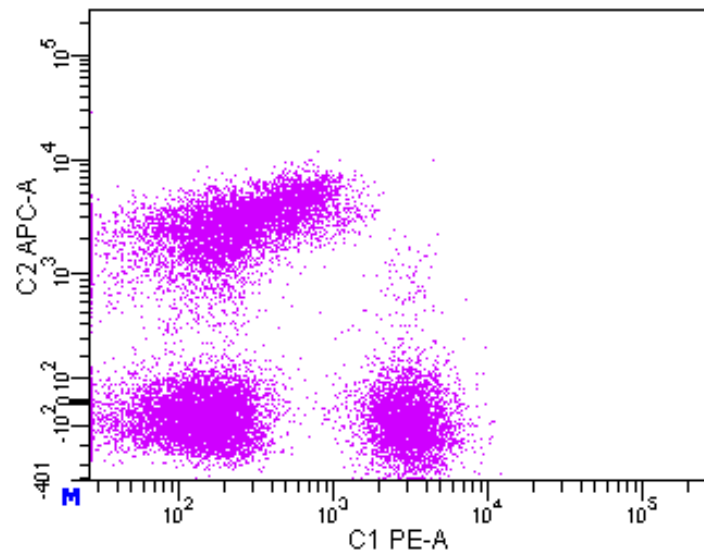
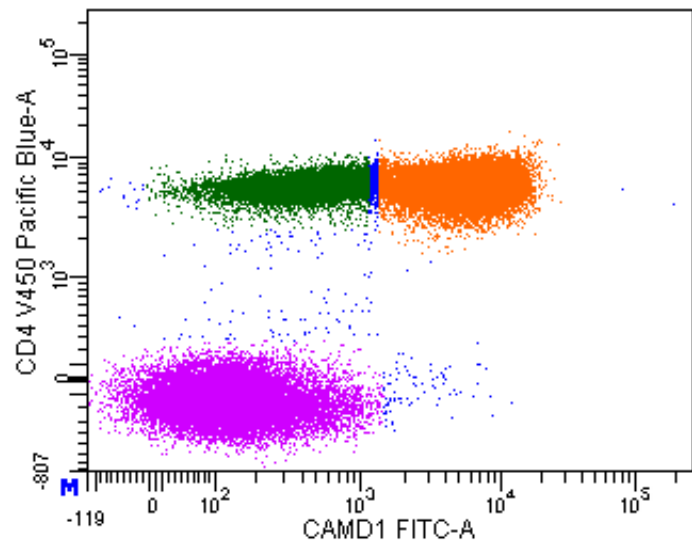
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



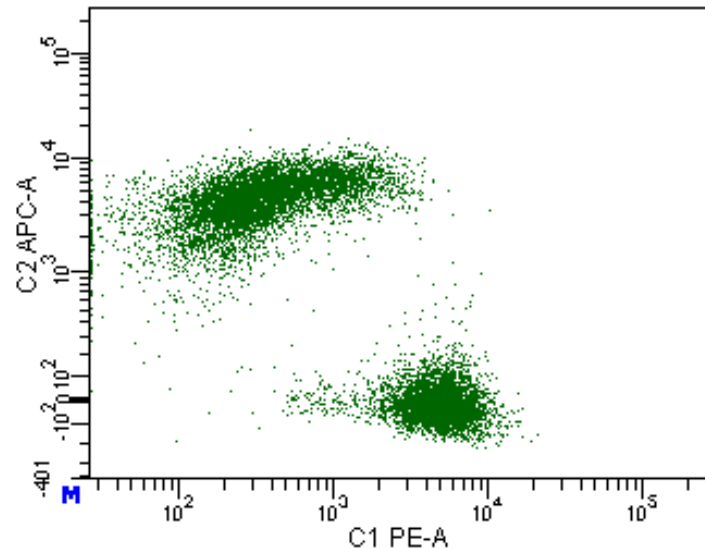
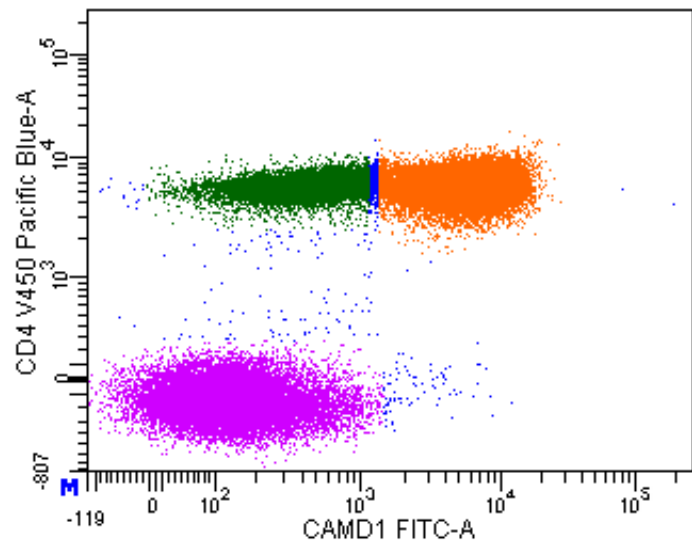
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



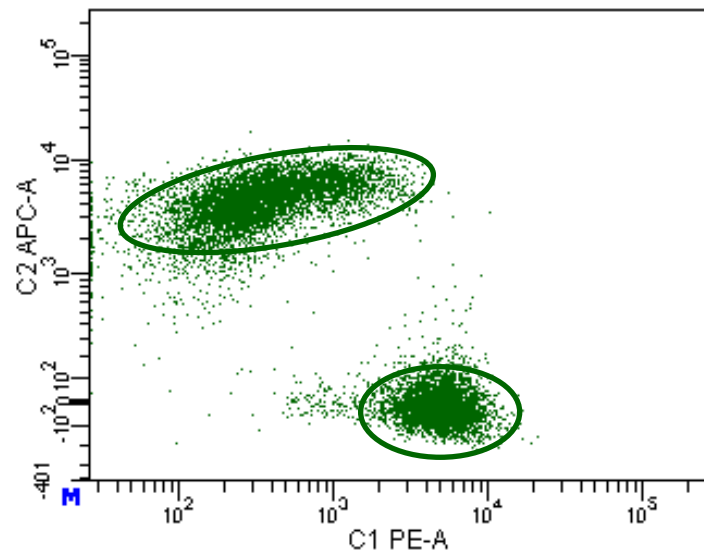
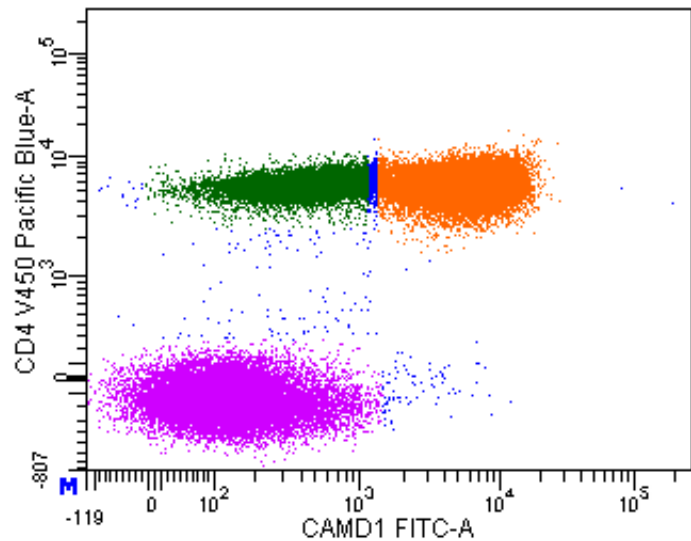
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



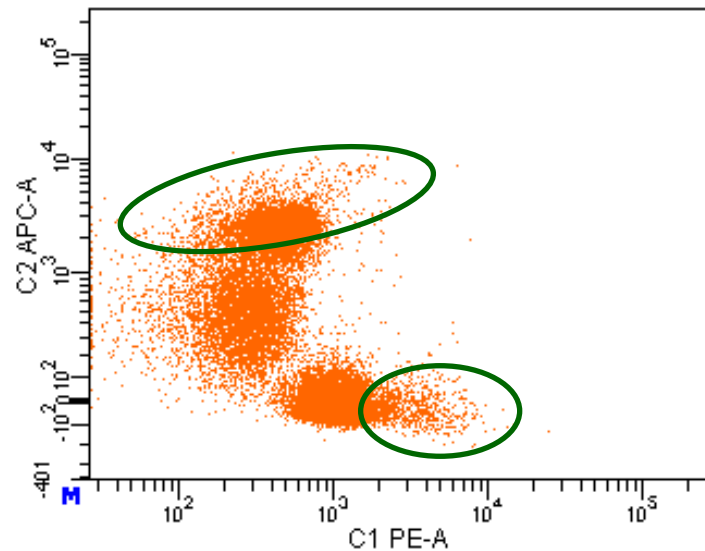
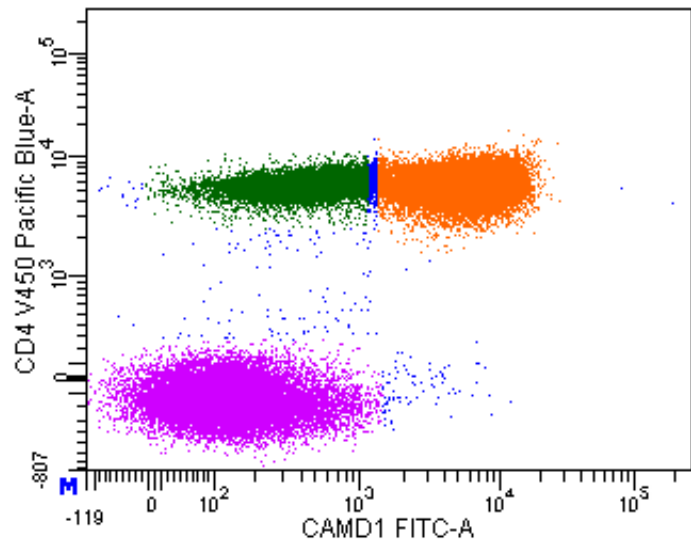
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



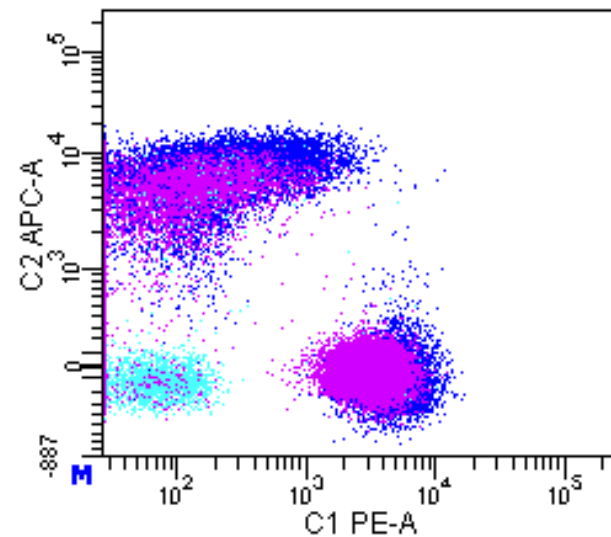
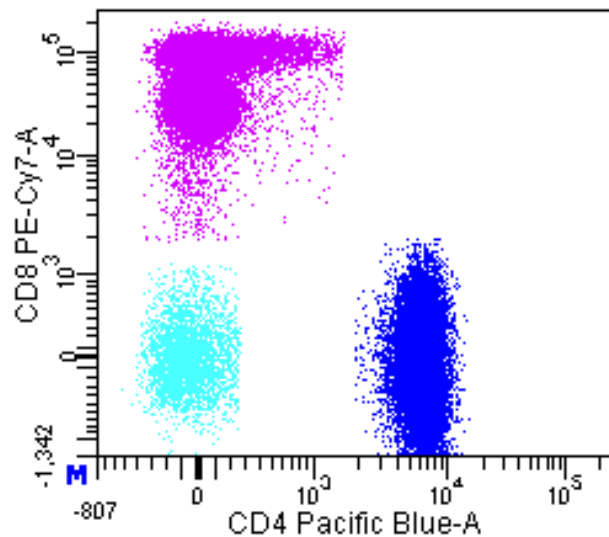
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



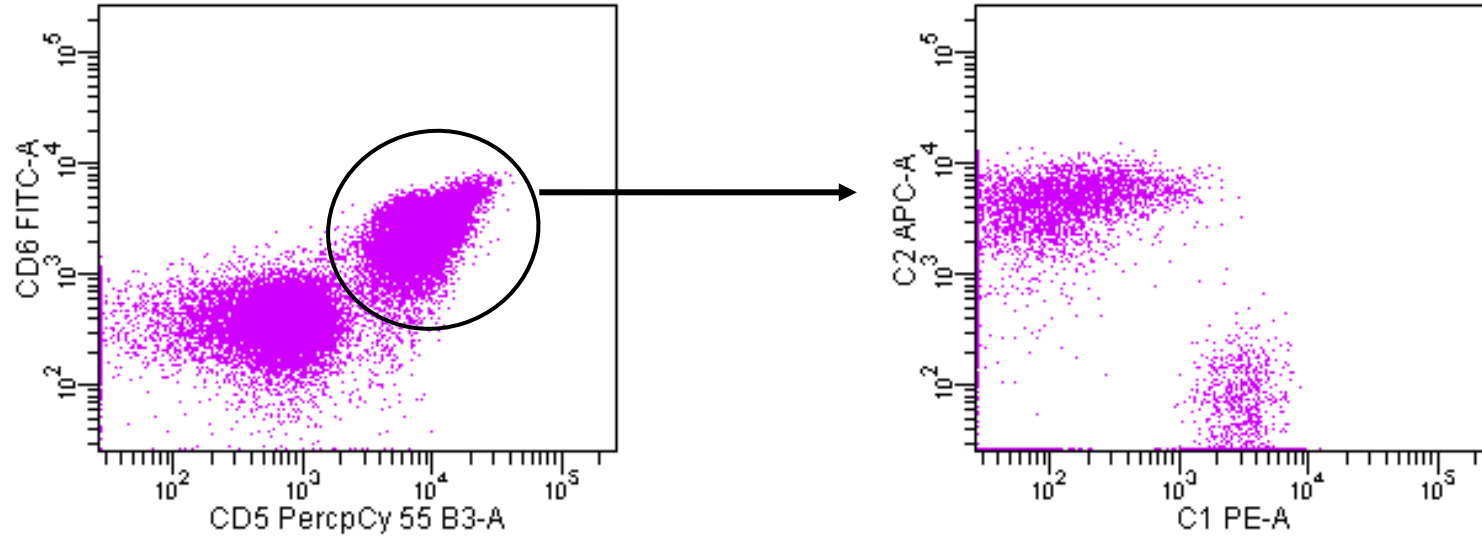
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



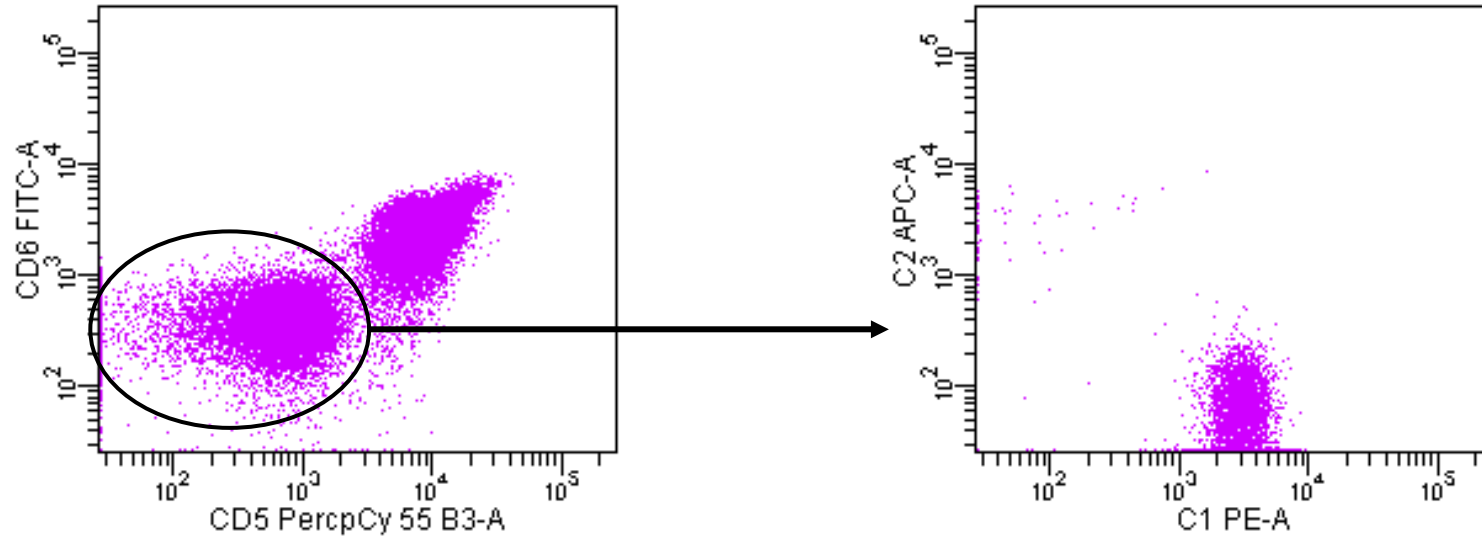
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



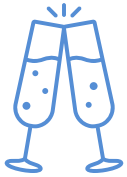
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



## Intérêt de la combinaison TRBC1/C2 ? Intérêt subsetting ?

*TRBC1 développé avant TRBC2*



## Optimisation des marquages

*Obtenir des marquages résolutifs robustes  
Marquage séquentiels  
Gamme d'anticorps disponibles*



## Artefacts techniques

*FRET involontaire avec le CD3*



## Interprétation

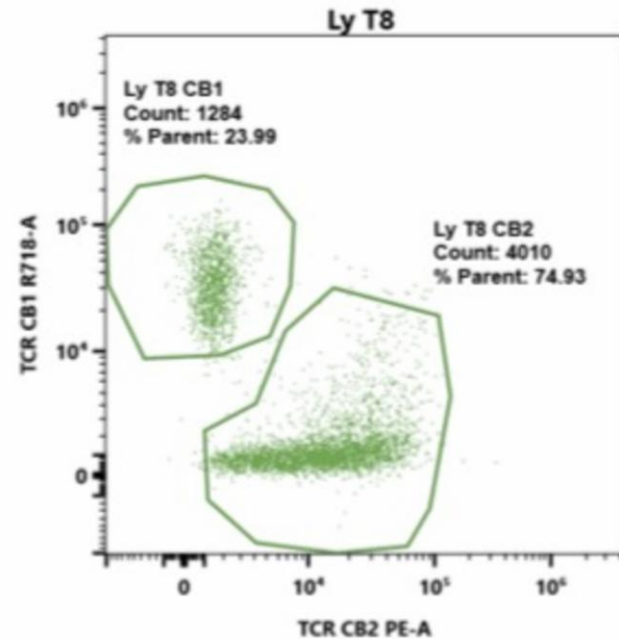
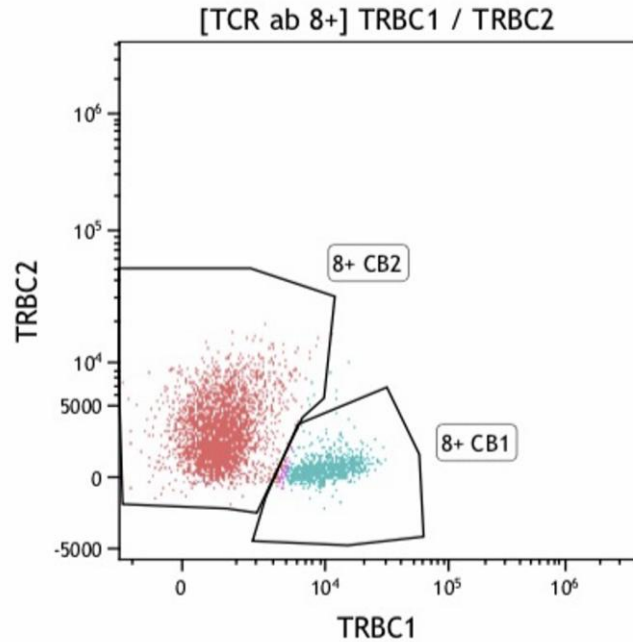
*Définition des seuils  
Lymphoproliférations T réactionnelles*

# TRBC1/TRBC2 : RET-EX

CD3+ CD8+ CD5low CD16+ CD56- CD57+

	Proportion de la population d'intérêt	Ratio C $\beta$ 2/C $\beta$ 1		Clonalité
		BD	Beckman Coulter	
Patient 1	13%	4,15	4,12	Positive
Patient 2	10%	2,87	3,22	Négative

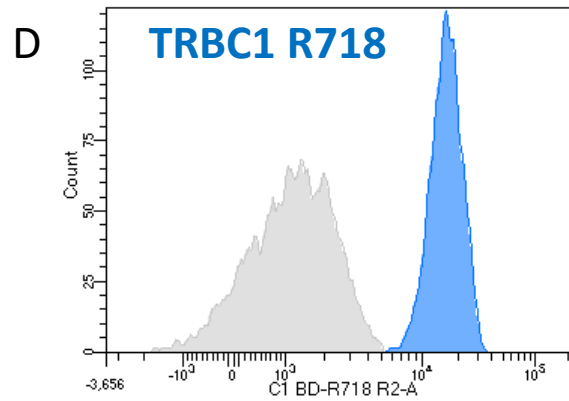
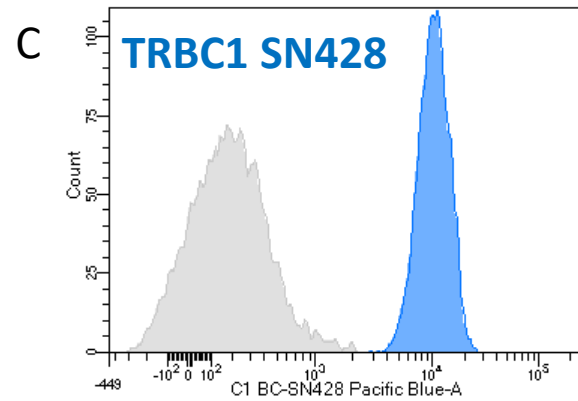
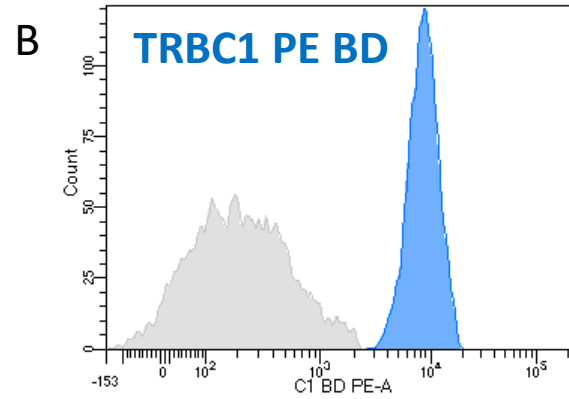
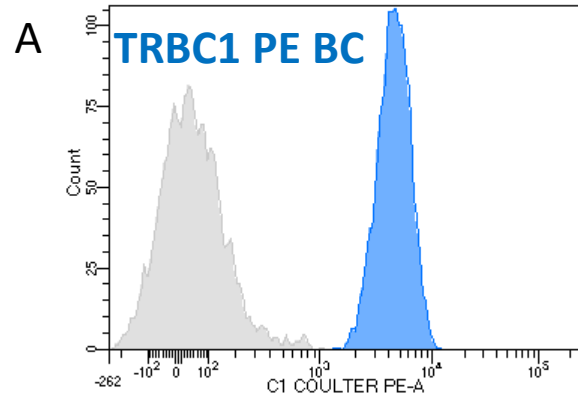
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



# TRBC1

Tubes	BV421 SN428	V500	FITC AF488	PE	PerCP Cy5.5	PE-Cy7	APC	AF700 R718
<b>A</b> (Routine)	4	45	6	<b>C1-BC-PE</b>	8	7	<b>C2-BC- APC</b>	3
<b>B</b>	20	45	8	<b>C1-BD-PE</b>	4	3	<b>C2-BC- APC</b>	/
<b>C</b>	<b>C1-BC- SN428</b>	45	8	20	4	3	<b>C2-BC- APC</b>	/
<b>D</b>	/	45	8	20	4	3	<b>C2-BC- APC</b>	<b>C1-BD- R718</b>

# TRBC1



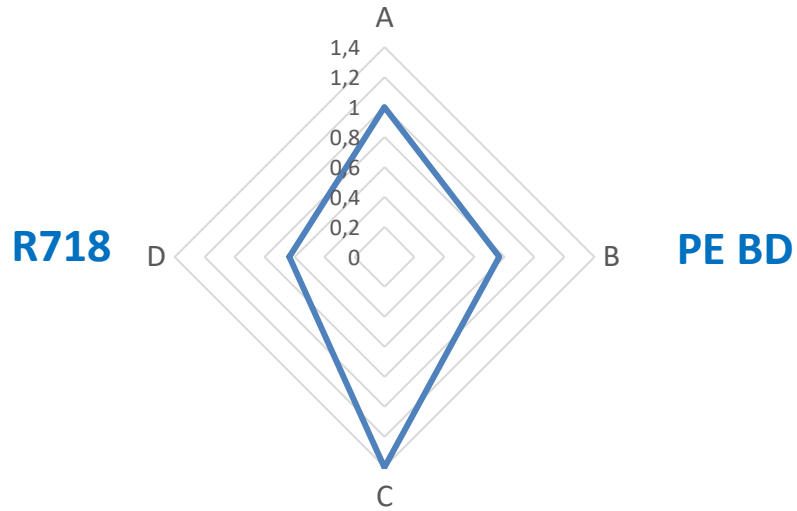
■ LT CD4+ TRBC1+

■ LT CD4+ TRBC2+

# TRBC1

**Stain index**

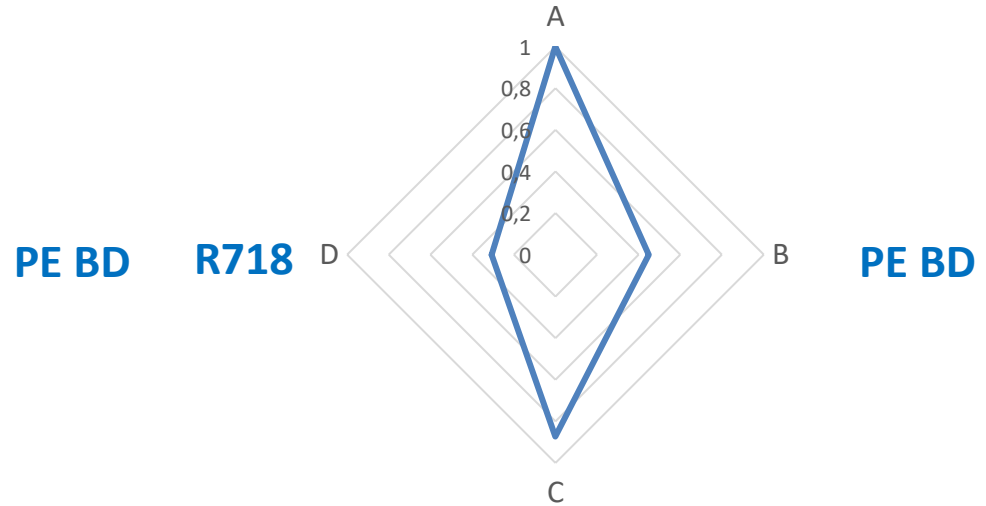
**PE BC**



**SN428**

**RFI**

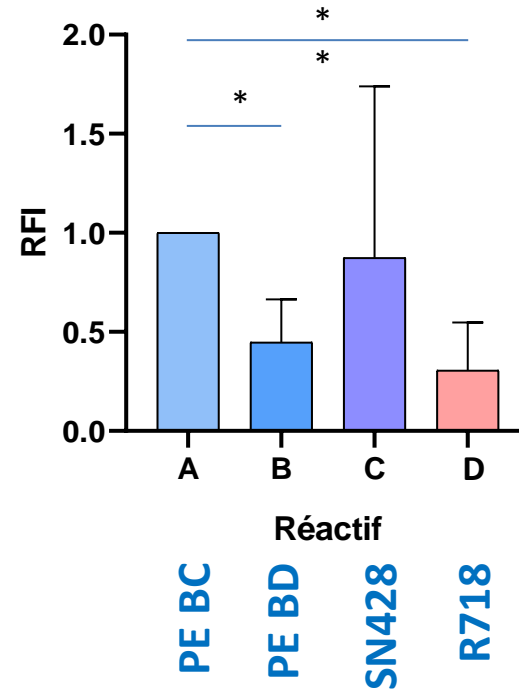
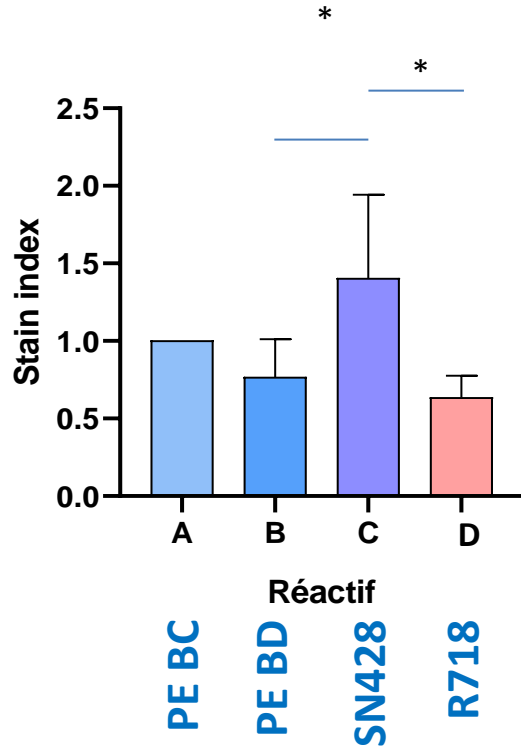
**PE BC**



**SN428**

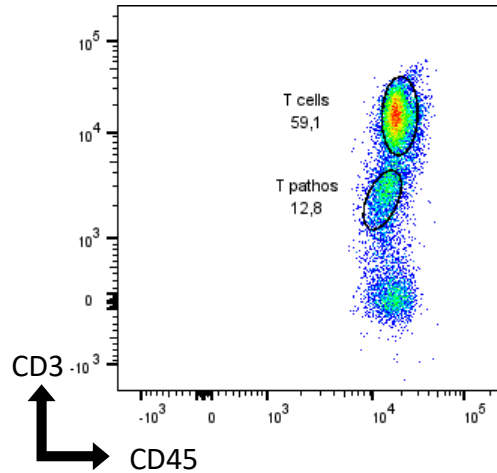
**L. Lhermitte / F. Cussigh, Paris**

# TRBC1

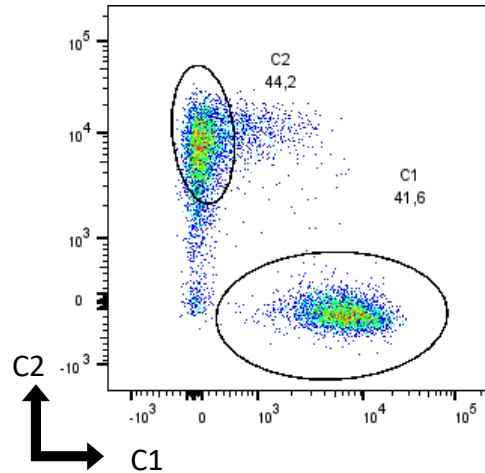


L. Lhermitte / F. Cussigh, Paris

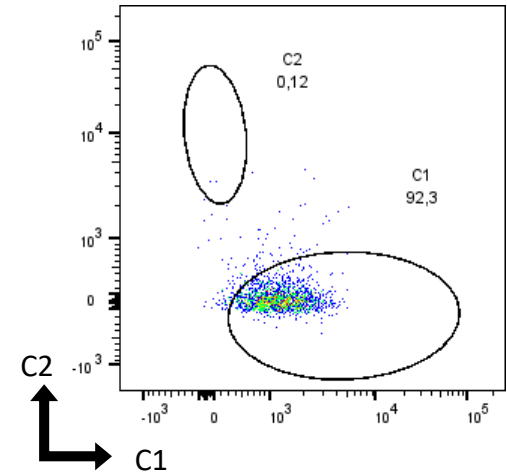
# TRBC1



LT pathologiques  
→ CD3 diminué

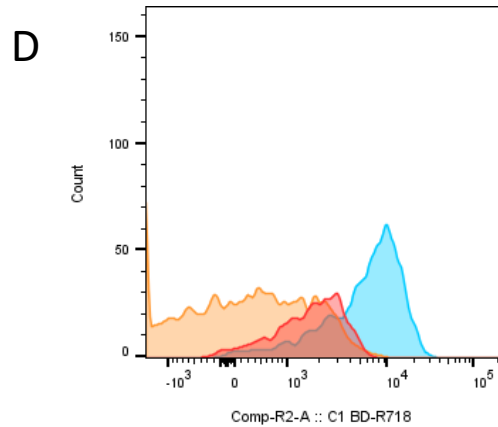
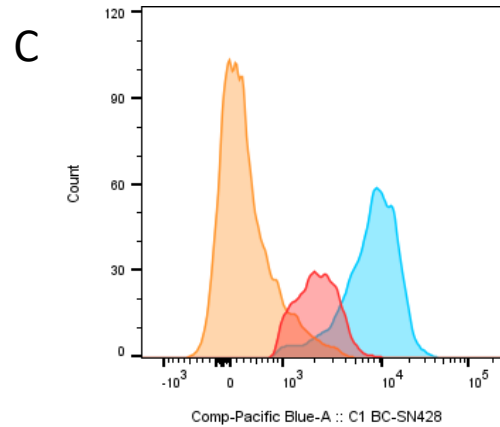
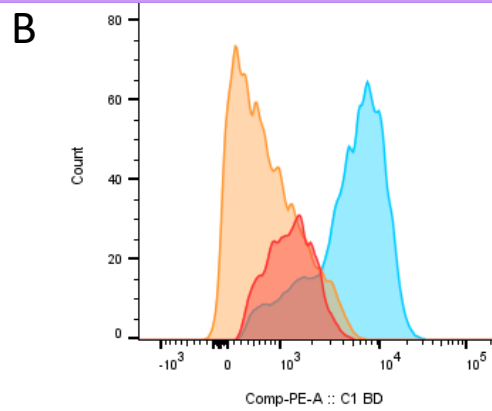
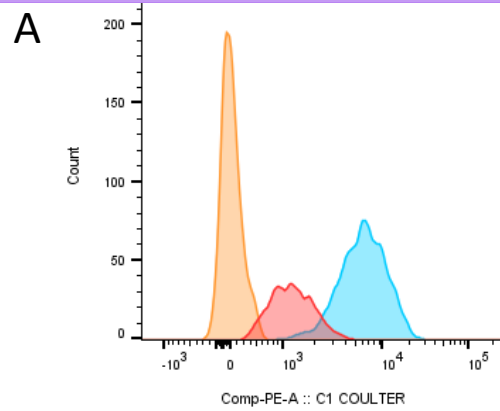


LT CD4 physiologique  
→ Polytypique C1 et C2



LT CD4 pathologique  
→ Monotypique C1 diminué

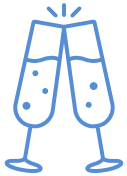
# TRBC1



- LT physio TRBC1+
- LT physio TRBC2+
- LT patho TRBC1dim

L. Lhermitte / F. Cussigh, Paris

# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



## Intérêt de la combinaison TRBC1/C2 ? Intérêt subsetting ?

*TRBC1 développé avant TRBC2*



## Optimisation des marquages

*Obtenir des marquages résolutifs robustes  
Marquage séquentiels  
Gamme d'anticorps disponibles*



## Artefacts techniques

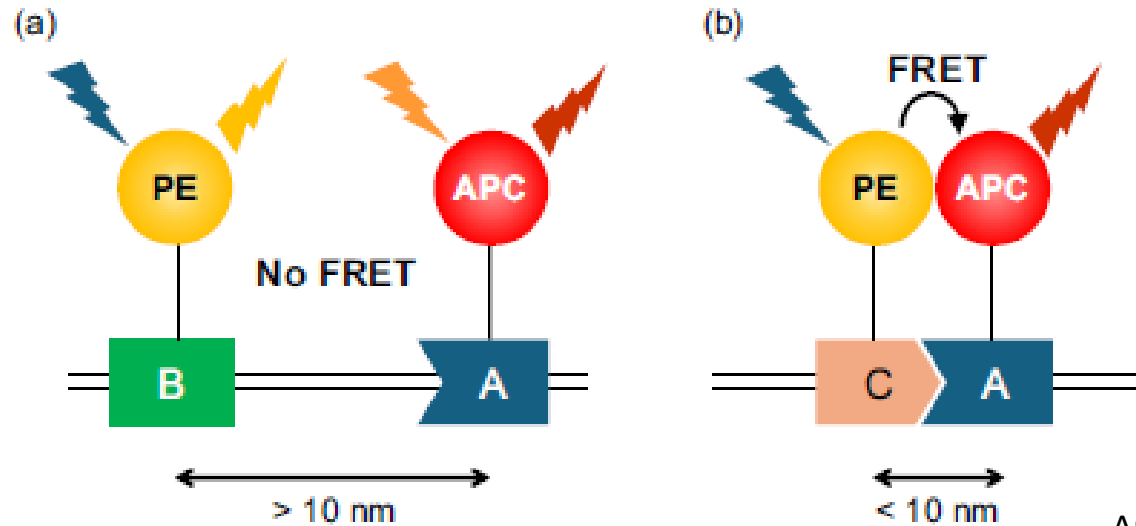
*FRET involontaire avec le CD3*



## Interprétation

*Définition des seuils  
Lymphoproliférations T réactionnelles*

# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



Antigen pairs with potential FRET interference:

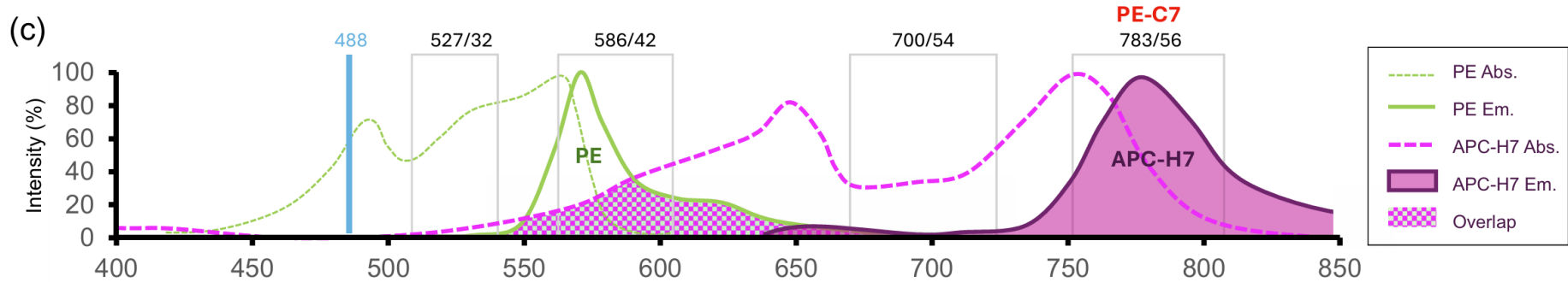
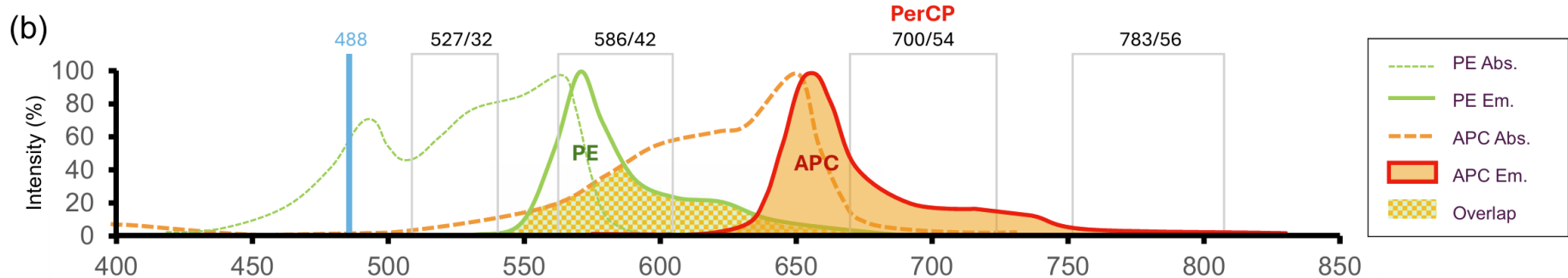
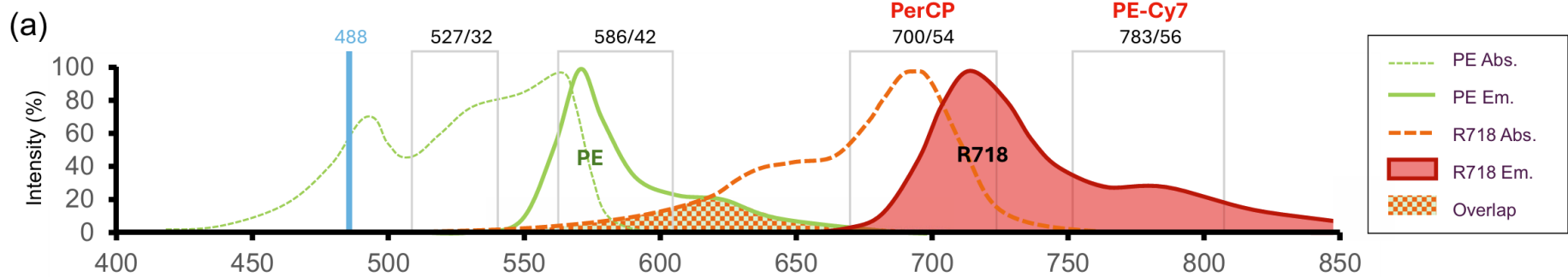
CD3/TRC1

CD3/TRBC2

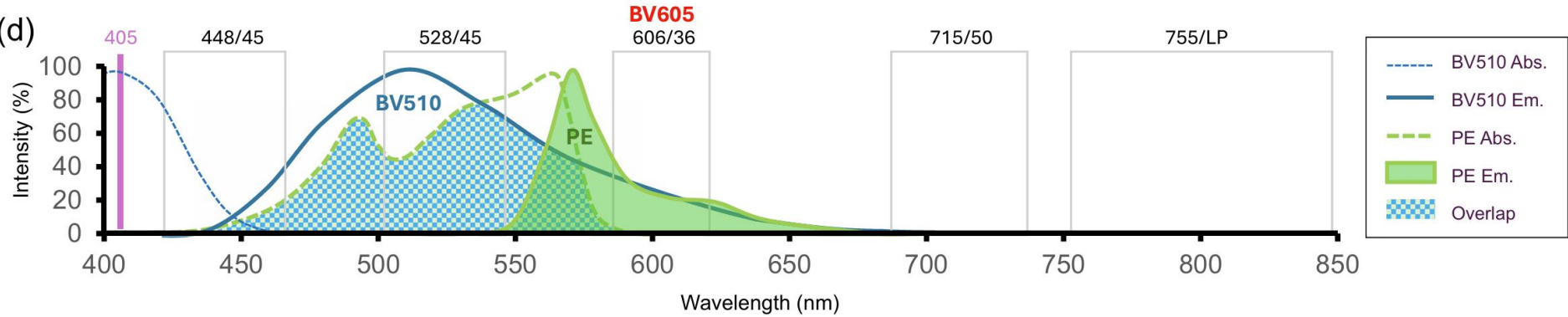
CD3/TCRVb

CD79/IgM

Wang HW et al, Cytometry B Clin Cytom 2026



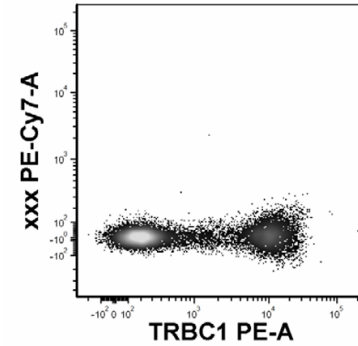
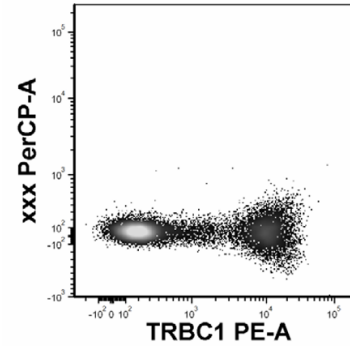
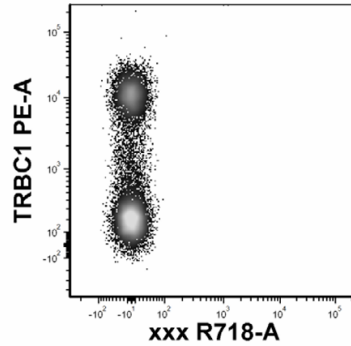
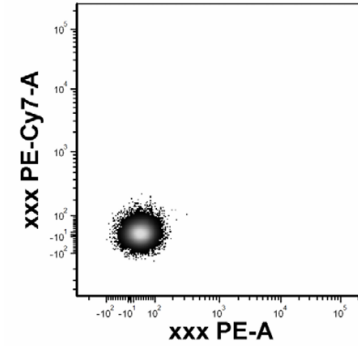
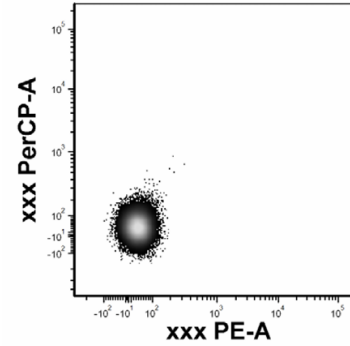
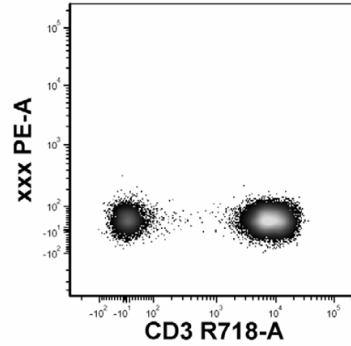
(d)



# TRBC1/TRBC2 : RET-EX

(a)

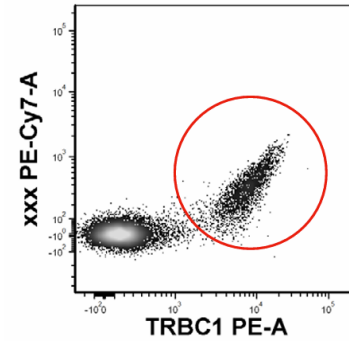
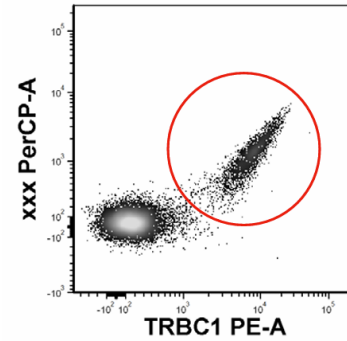
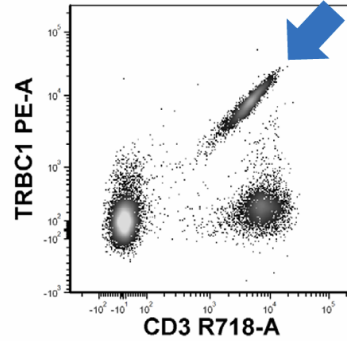
PE	PerCP	PE-Cy7	R718	BV421
-	-	-	CD3	-



PE	PerCP	PE-Cy7	R718	BV421
TRBC1	-	-	-	-

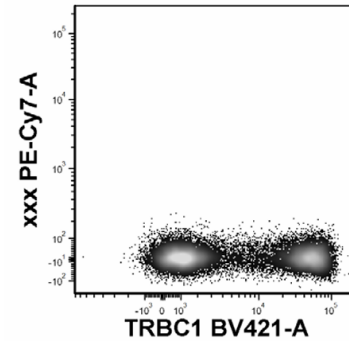
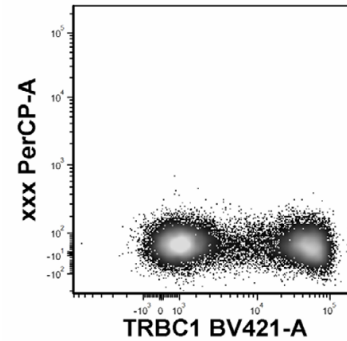
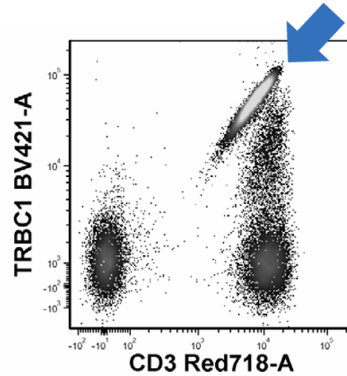
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX

PE	PerCP	PE-Cy7	R718	BV421
TRBC1	-	-	CD3	-

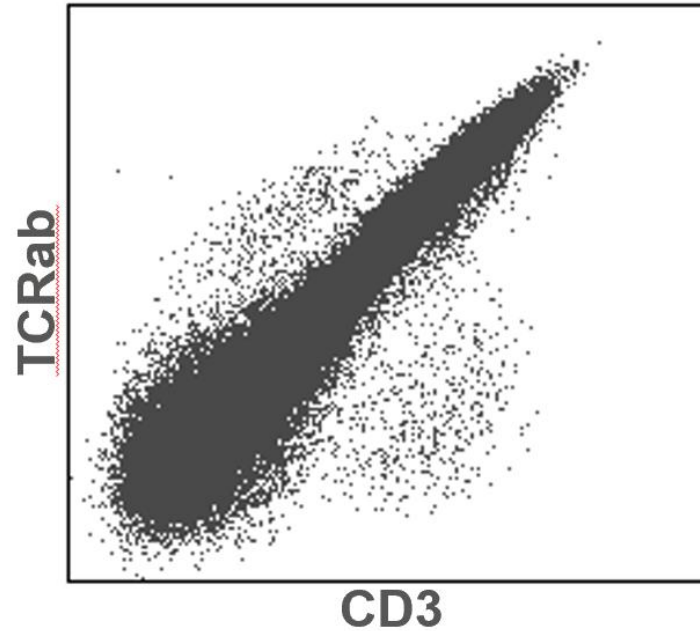


(b)

PE	PerCP	PE-Cy7	R718	BV421
-	-	-	CD3	TRBC1

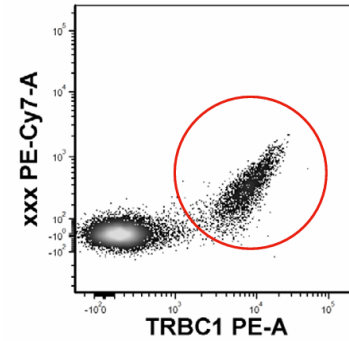
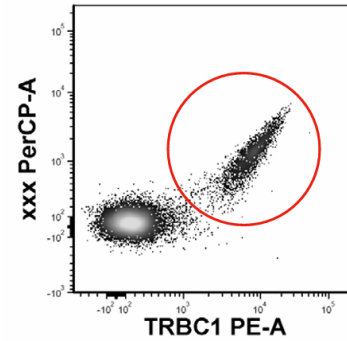
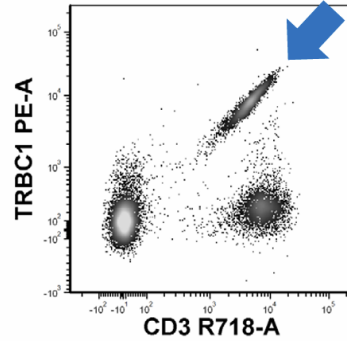


# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



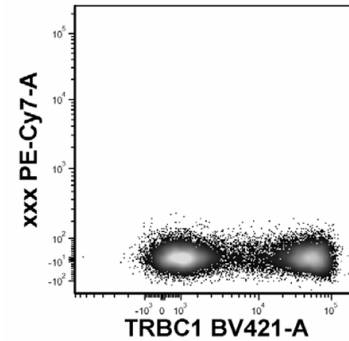
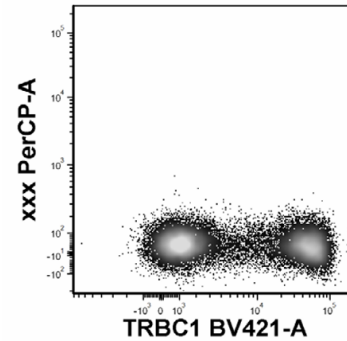
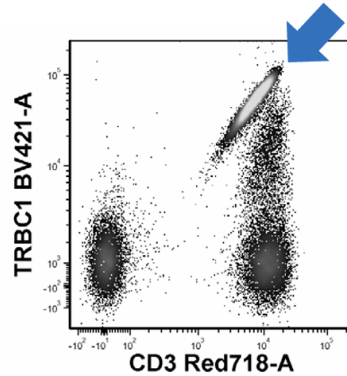
# TRBC1/TRBC2 : RET-EX

PE	PerCP	PE-Cy7	R718	BV421
TRBC1	-	-	CD3	-

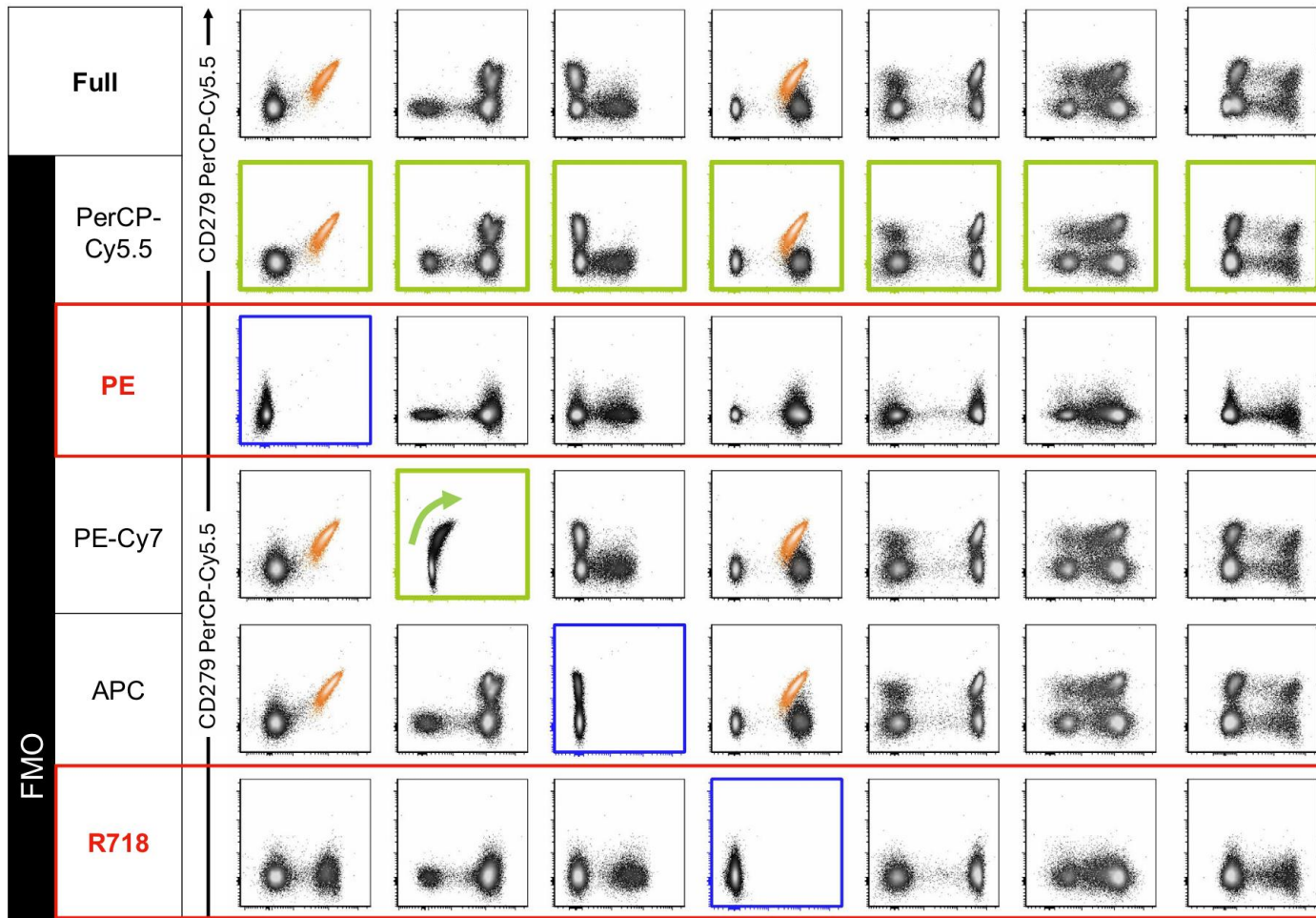


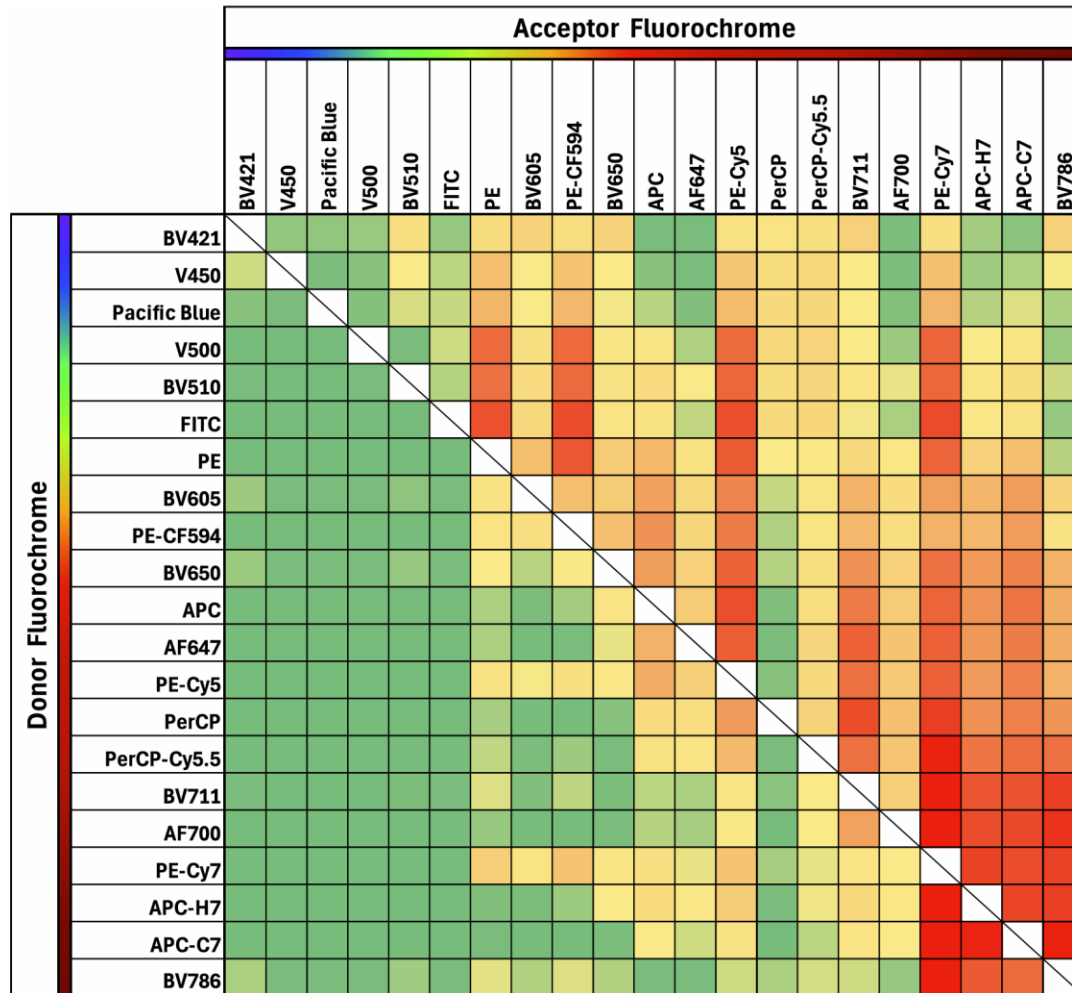
(b)

PE	PerCP	PE-Cy7	R718	BV421
-	-	-	CD3	TRBC1



PerCP-Cy5.5	PE	PE-Cy7	APC	R718	BV421	BV510	BV605
PD-1 CD279	TRBC1	CD2	TRBC2	CD3	CD4	CD7	CD8





Wang HW et al, Cytometry B  
Clin Cytom 2026

≤1<sup>st</sup> %ile  ≥99<sup>th</sup> %ile

# TRBC1/TRBC2 : RET-EX



## Intérêt de la combinaison TRBC1/C2 ? Intérêt subsetting ?

*TRBC1 développé avant TRBC2*



## Optimisation des marquages

*Obtenir des marquages résolutifs robustes  
Marquage séquentiels  
Gamme d'anticorps disponibles*



## Artefacts techniques

*FRET involontaire avec le CD3*



## Interprétation

*Définition des seuils  
Lymphoproliférations T réactionnelles*

# TRBC1/TRBC2 : un game-changer ?

**TRBC2 > TRBC1**

*TRBC2/TRBC1 >1*

**TRBC1/CD3+ > 85%**

**TRBC1 / CD3+ <15%**

*Arguments forts de restriction clonale*

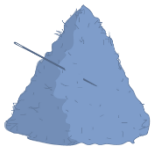
# CytHem NKT – Project Plan



## TRBC1/TRBC2

Contact Rémi qui a fait ce travail mise en commun

Groupe de travail a 4



## Rédaction d'une fiche CytHem NKT

Proposition pratiques qui fonctionnent

Proposition optimisation technique

Rapport artefacts



## Hyperéosinophilies

Webinaire avec Guillaume Lefevre



## Rédaction d'une fiche CytHem NKT

Rendre applicable le PNDS

Combinaison de marqueurs

Règles pratiques d'interprétation

Panels

# Hyperéosinophilies Lymphoïdes

**Question hématologique fréquente**

**Réponse immunologique complexe**

# Hyperéosinophilies Lymphoïdes

**Comprendre les règles d'interprétation (guidelines PNDS)**

**Guidelines pour les combinaisons d'anticorps**

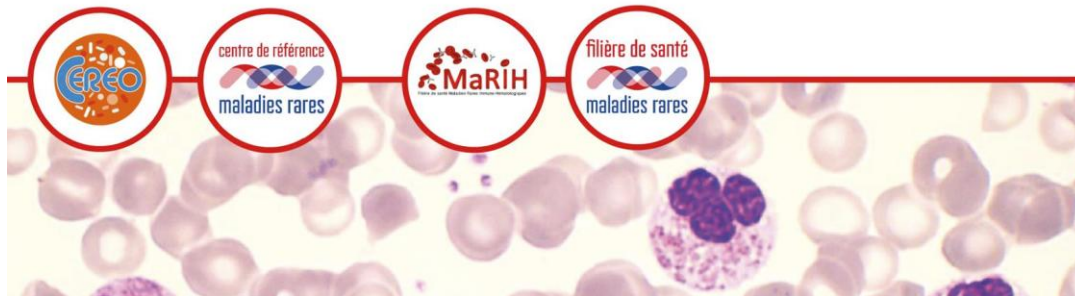
**Recommandations pratiques des PNDS**

# Les PNDS

## HYPERÉOSINOPHILIES ET SYNDROMES HYPERÉOSINOPHILIQUES

### PROTOCOLE NATIONAL DE DIAGNOSTIC ET DE SOINS

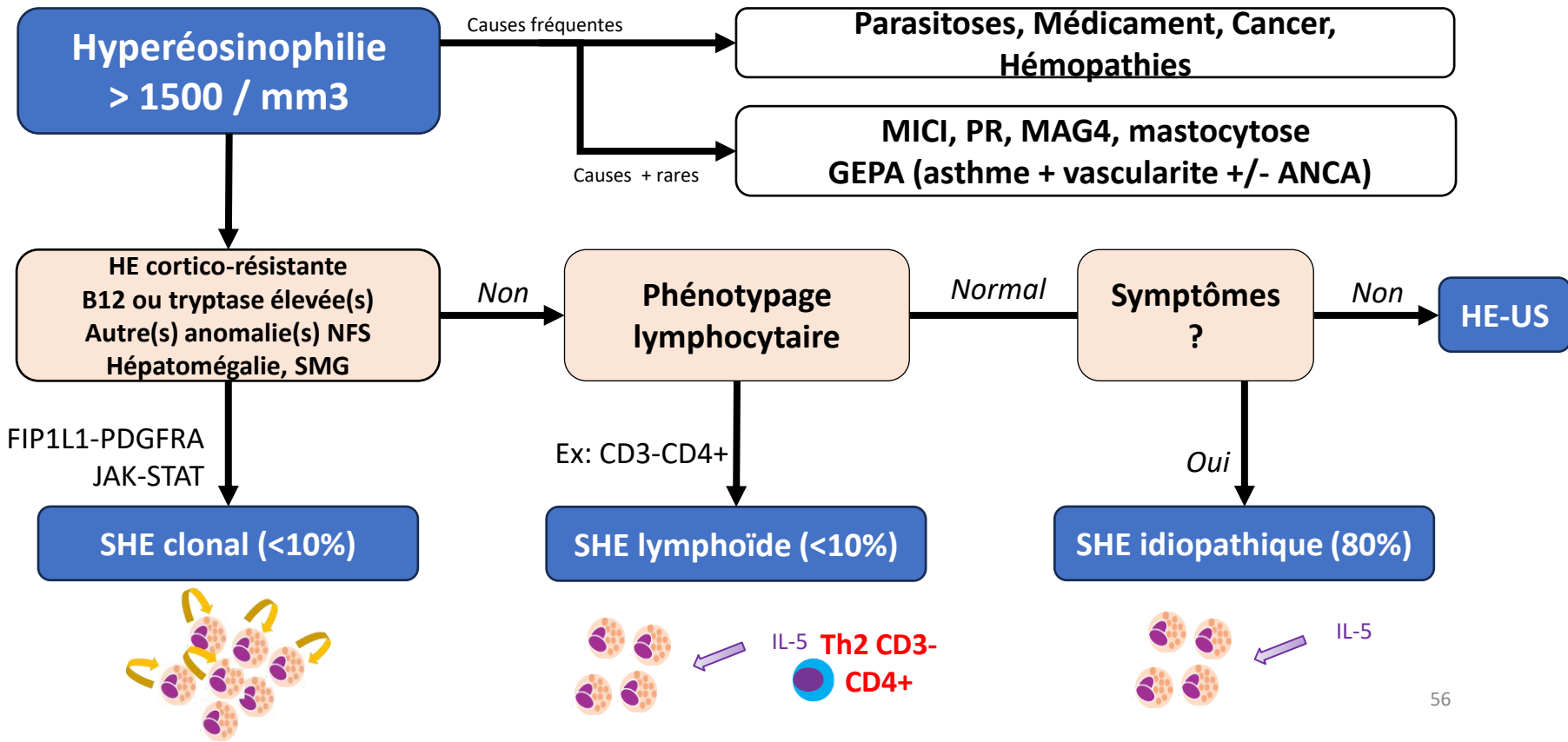
Ce protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) a été coordonné par le Dr Matthieu GROH, le Dr Guillaume LEFEVRE et le Pr Jean-Emmanuel KAHN, sous l'égide du Centre de Référence des Syndromes Hyperéosinophiliques (CEREO) et de la Filière de santé Maladies Rares Immuno-Hématologiques (MaRIH).



# Syndrome hyperéosinophilique

Entité	Définition
<b>Éosinophilie sanguine</b>	PNE entre 500 et 1500/mm <sup>3</sup>
<b>Hyperéosinophilie (HE)</b>	PNE > 1500/mm <sup>3</sup> à deux reprises à un mois d'intervalle et/ou éosinophilie tissulaire (telle que définie dans 2.1.3)
<b>Syndrome hyperéosinophilique (SHE)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- HE sanguine, <b>ET</b></li><li>- Atteinte ou dysfonction d'organe attribuable aux éosinophiles tissulaires (telle que définie dans 2.1.3), <b>ET</b></li><li>- Exclusion des autres causes pouvant mener à l'atteinte d'organe.</li></ul>
<b>SHE / maladie à éosinophiles spécifique d'organe</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- HE sanguine <b>et/ou</b> tissulaire <b>ET</b></li><li>- Atteinte d'un seul organe</li></ul>

# Syndrome hyperéosinophilique

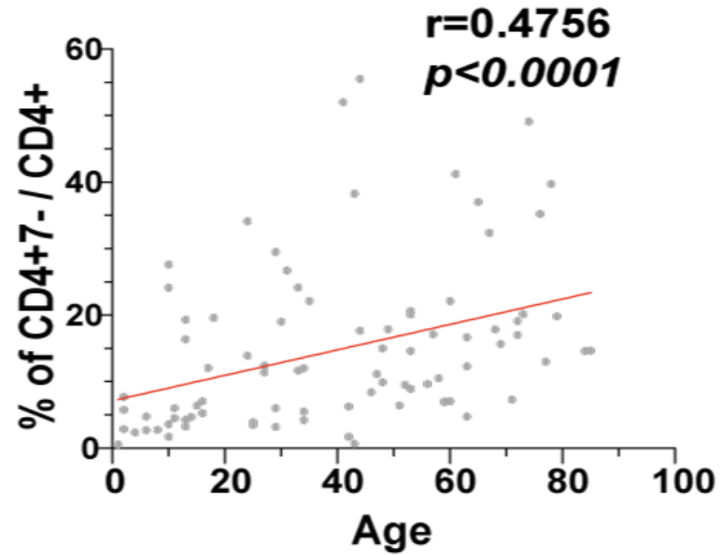
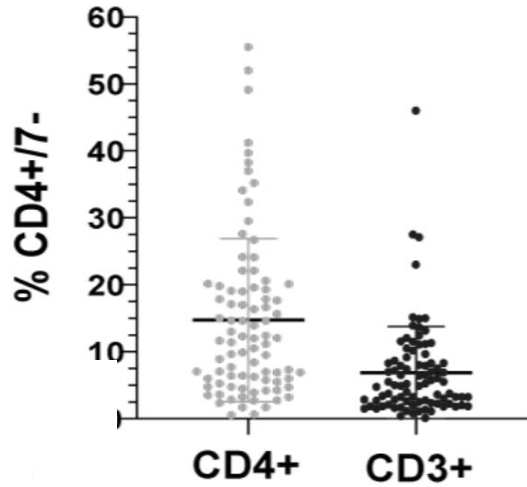


# Diagnostic phénotypique des SHE

- Les lymphocytes CD3-CD4+ : > 0.5% des lymphocytes totaux.
- Les lymphocytes CD3+CD4+CD7- : > 6-8% des lymphocytes totaux avant 60 ans, et >10% après 60 ans.
- Les lymphocytes CD3+CD4-CD8-TCR $\alpha\beta$ + (T double-négatifs): > 1.5% des lymphocytes totaux.

A noter que ***la corticothérapie n'empêche pas l'interprétation du phénotypage lymphocytaire***, notamment s'agissant des HE/SHE lymphoïde CD3-CD4+.

# L'enfer des 4+7-



# Tips & Tricks

*Guillaume Lefevre speaking...*

- **Le « vrai » SHE lymphoïde et le seul dont on devrait parler est probablement le 3-4+**
  - Le 3-4+: Un peu de + de 100 cas connus en France donc exceptionnel (plus rare que les FIP+ qui représentent 10 cas par an en France environ)
  - Les DN TCRab : 2 cas convaincants dans mon expérience
  - Les 4+7- : à ne plus considérer comme population relevante (manuscrit en préparation, conviction partagée avec l'équipe belge)
- Pas de facteur prédictif connu en CMF évocateur de transformation sauf CD10+ (lymphome)
- Le lymphome T dans le l'histoire naturelle du SHE lymphoïde (en tant que sd lymphoprolifératif T indolent) = « Richter-like » (100% de décès en < 3 mois)

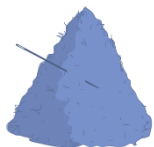
# CytHem NKT – Project Plan



## TRBC1/TRBC2

Contact Rémi qui a fait ce travail mise en commun

Groupe de travail a 4



## Rédaction d'une fiche CytHem NKT

Proposition pratiques qui fonctionnent

Proposition optimisation technique

Rapport artefacts



## Hyperéosinophilies

Webinaire avec Guillaume Lefevre



## Rédaction d'une fiche CytHem NKT

Rendre applicable le PNDS

Combinaison de marqueurs

Règles pratiques d'interprétation

Panels