



Nouvelles stratégies en cytométrie en flux pour le diagnostic et le suivi des lymphomes T cutanés :

Apport du groupe CytHem-Sezary

Pre Hélène Moins

Laboratoire d'Hématologie-Hôpital Saint-Louis-Paris



**Richard
VEYRAT-MASSON**

Organisateur
CytHem-SEZARY

Laboratoire d'Hématologie

CHU ESTAING

Clermont-Ferrand - France



**Jean-Philippe
VIAL**

Organisateur
CytHem-SEZARY

Laboratoire d'Hématologie

CHU de Bordeaux

Pessac - France



Liens d'intérêt

- **Fonds de recherche** : Almirall, Kyowa Kirin
- **Consultant** : Innate Pharma
- **Hospitalité, soutien congrès** : Kyowa Kirin, Recordati

1ère visite pour érythrodermie: importance d'un diagnostic précoce

- Toujours penser à un syndrome de Sézary

Clinique



1ère visite pour érythrodermie: importance d'un diagnostic précoce

- Toujours penser à un syndrome de Sézary
- Exclure les diagnostics différentiels

Clinique

Clinique
Anapath
CMF



1ère visite pour érythrodermie: importance d'un diagnostic précoce

- Toujours penser à un syndrome de Sézary
- Exclure les diagnostics différentiels

- Stade sanguin:
 - EMF
 - Pre-Sézary
 - Sézary

Clinique

Clinique
Anapath
CMF

CMF



1ère visite pour érythrodermie: importance d'un diagnostic précoce

- Toujours penser à un syndrome de Sézary
- Exclure les diagnostics différentiels

- Stade sanguin:
 - EMF
 - Pre-Sézary
 - Sézary

- Confirmer le diagnostic

Clinique



Clinique
Anapath
CMF



CMF

Clonalité

CMF

- **CD7- et CD26- CD4+Tcells**

- B0: tous les critères

- CD4+CD7- et CD4+CD26- < 250 / μ L

- B1: tous les critères

- CD4+CD7- ou CD4+CD26- \geq 250 / μ L
mais < 1000 / μ L

- B2: l'un des critères

- CD4+CD7-/Ly \geq 40 %
- CD4+CD7- \geq 1000 / μ L
- CD4+CD26-/Ly \geq 30 %
- CD4+CD26- \geq 1000 / μ L

EORTC cutaneous lymphoma task force.

Scarlsbrick JJ et al. European Journal of Cancer. 2018.

Vonderheid EC J. am. Acad. Dermatol. 2002, Olsen, E. et al Blood 2007, J. Clin. Oncol 2011

CMF: apport du marqueur KIR3DL2 au diagnostic

- **CD7- et CD26- CD4+Tcells**

- B0: tous les critères

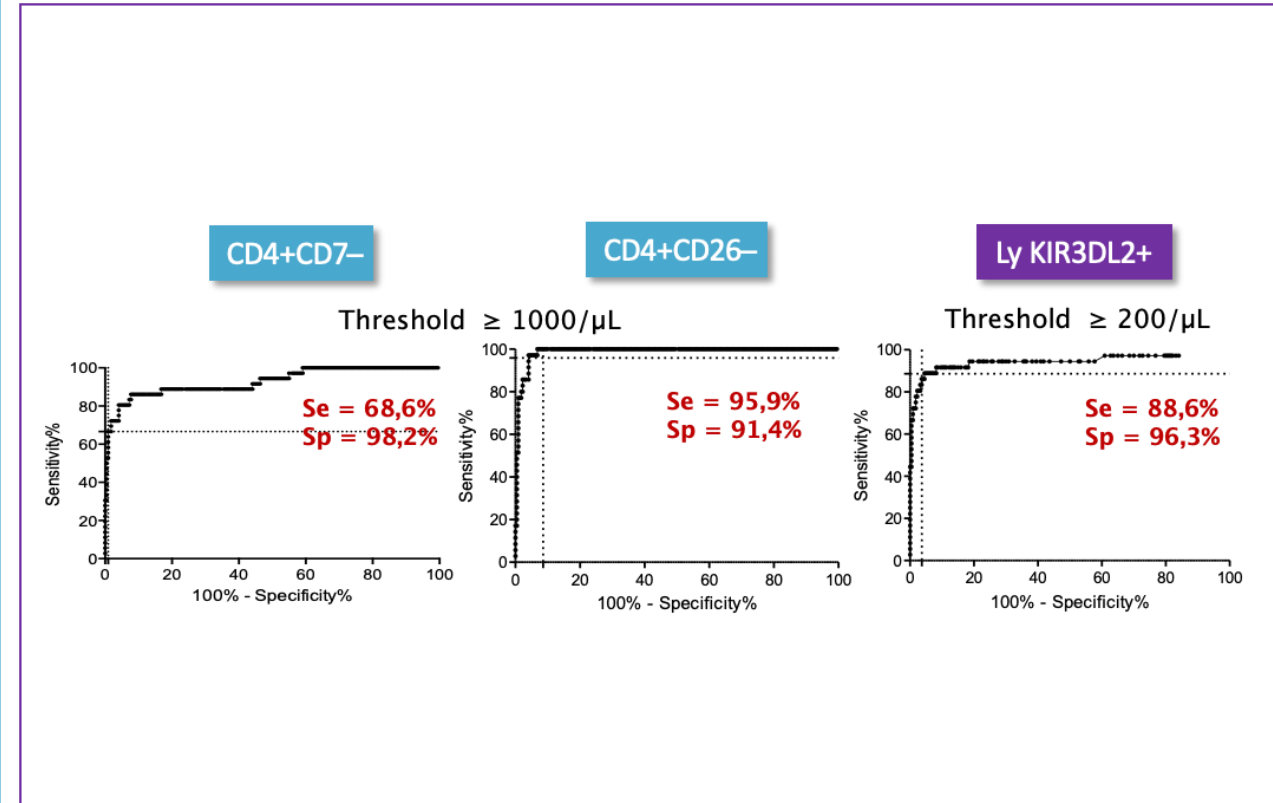
- CD4+CD7- et CD4+CD26- < 250 / μ L

- B1: tous les critères

- CD4+CD7- ou CD4+CD26- \geq 250 / μ L
mais < 1000 / μ L

- B2: l'un des critères

- CD4+CD7-/Ly \geq 40 %
- CD4+CD7- \geq 1000 / μ L
- CD4+CD26-/Ly \geq 30 %
- CD4+CD26- \geq 1000 / μ L



EORTC cutaneous lymphoma task force.

Scarlsbrick JJ et al. European Journal of Cancer. 2018.

Vonderheid EC J. am. Acad. Dermatol. 2002, Olsen, E. et al Blood 2007, J. Clin. Oncol 2011

Roelens et al, British Journal of Dermatology 2020

KIR3DL2: identifie les stades B2 non conventionnels

- **CD7- et CD26- CD4+Tcells**

- B0: tous les critères

- CD4+CD7- et CD4+CD26- < 250 / μ L

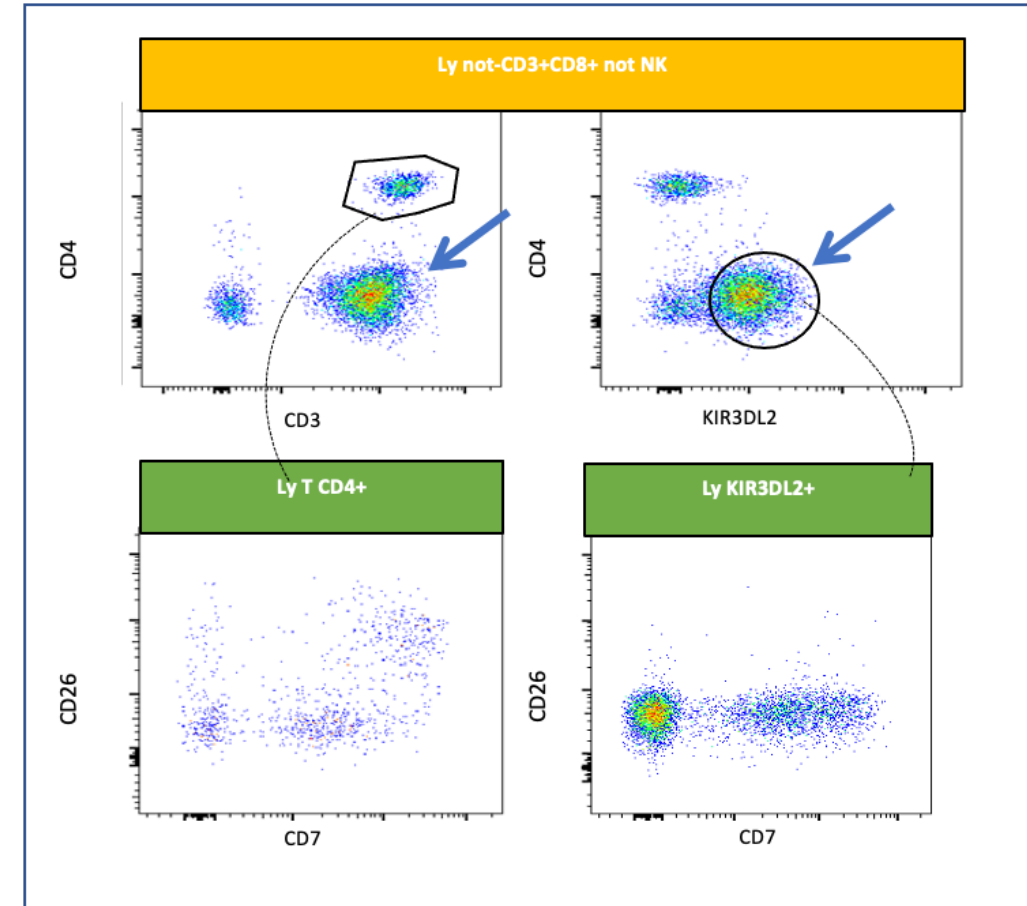
- B1: tous les critères

- CD4+CD7- ou CD4+CD26- \geq 250 / μ L
mais < 1000 / μ L

- B2: l'un des critères

- CD4+CD7-/Ly \geq 40 %
- CD4+CD7- \geq 1000 / μ L
- CD4+CD26-/Ly \geq 30 %
- CD4+CD26- \geq 1000 / μ L

Patient classé pré-SS T4B1 au diagnostic
Puis SS après 3 mois de suivi



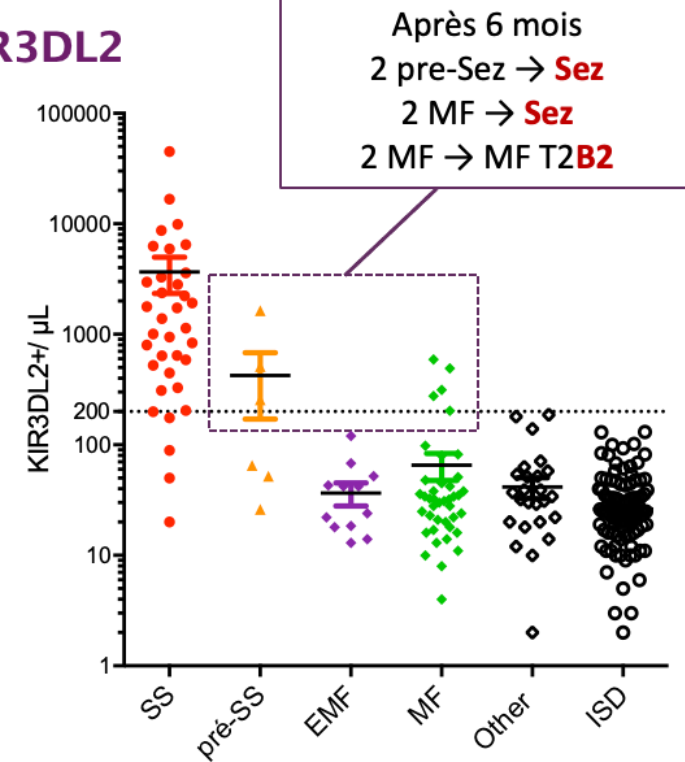
Roelens et al, British Journal of Dermatology 2020

KIR3DL2: anticipe l'évolution vers un stade B2

• CD7- et CD26- CD4+Tcells

- B0: tous les critères
 - CD4+CD7- et CD4+CD26- < 250 / μ L
- B1: tous les critères
 - CD4+CD7- ou CD4+CD26- \geq 250 / μ L mais < 1000 / μ L
- B2: l'un des critères
 - CD4+CD7-/Ly \geq 40 %
 - CD4+CD7- \geq 1000 / μ L
 - CD4+CD26-/Ly \geq 30 %
 - CD4+CD26- \geq 1000 / μ L

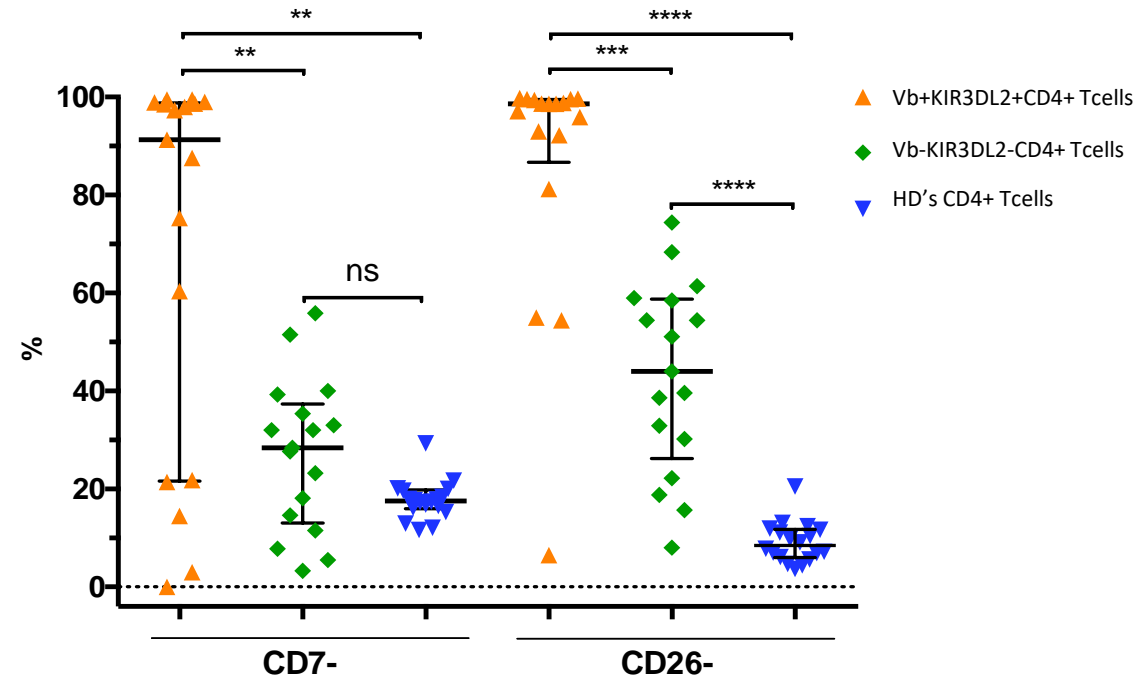
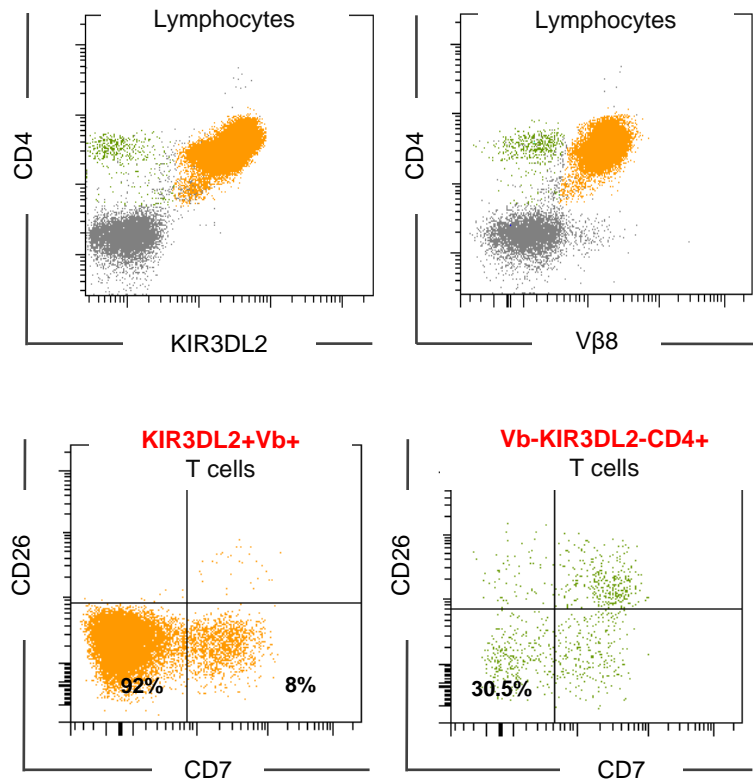
▪ KIR3DL2



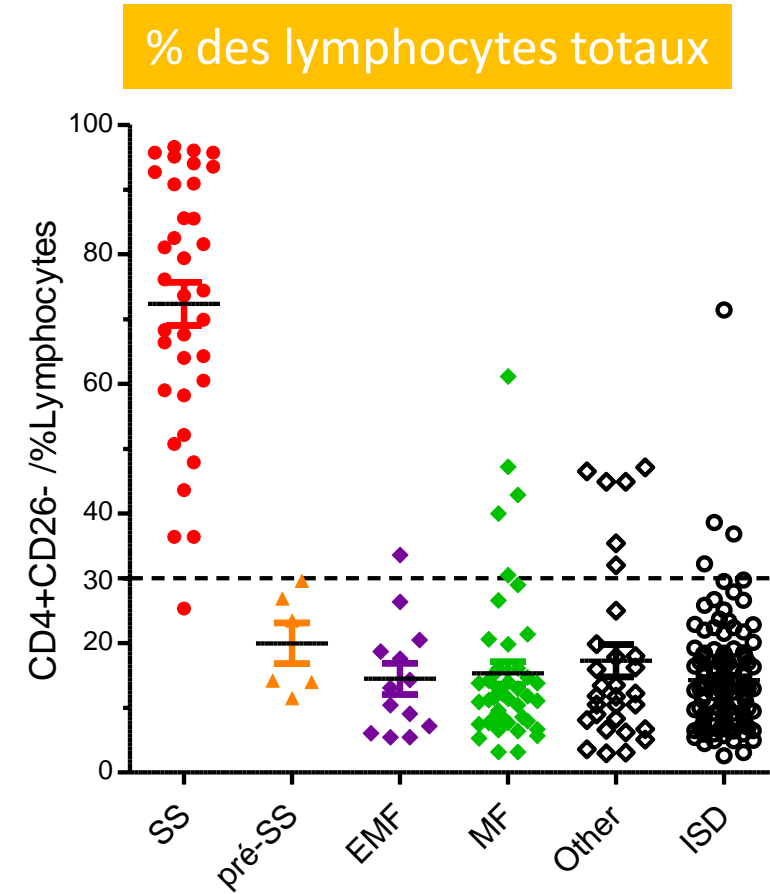
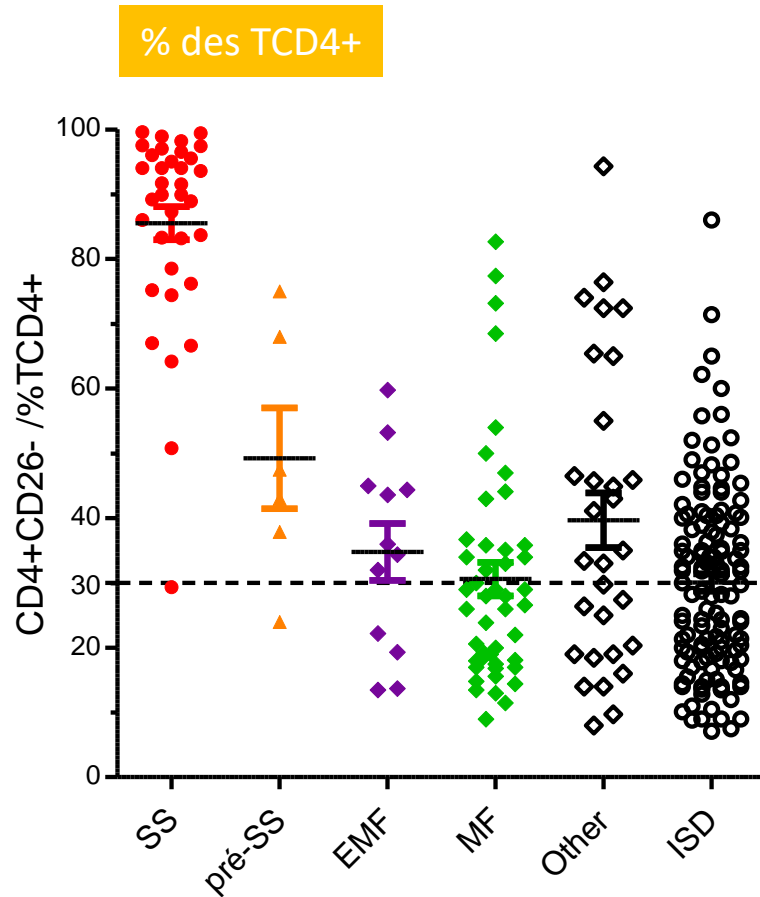
○ Anticipe le stade B2

KIR3DL2: affine la distinction entre cellules malignes et TCD4+ « réactionnelles »

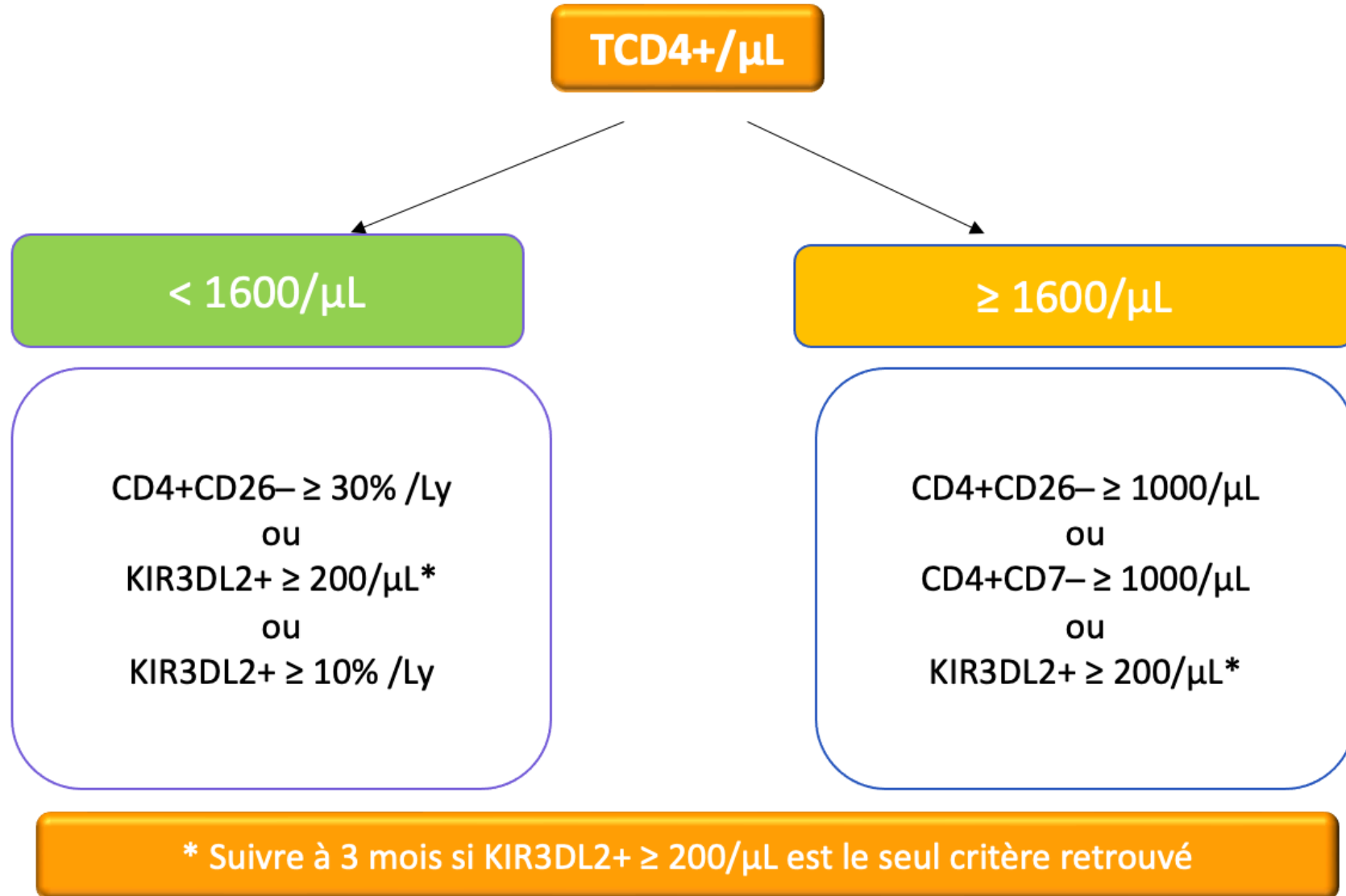
Anti-TCR Vb and KIR3DL2



Les données en %: de quoi parle t-on?



Proposition



Proposition



Le Compte-Rendu :

- Méthode de détermination des VA : double plateforme (automate) / Billes de comptage (Trucount®, IMcount®)
- Résultats : au minimum
 - GB (G/L) / Lymphocytes (% et G/L)
 - Lymphocytes CD4+ (G/L)
 - CD4/CD8 (ratio)
 - CD3+CD4+CD7- (% et G/L)
 - CD3+CD4+CD26- (% et G/L)
 - Cellules CD4+/-CD158k+ (% et G/L)
- Conclusion/Interprétation
 - Préciser s'il existe, au sein de la population lymphocytaire, une hétérogénéité (diminution ou perte) d'expression de CD3 ou/et CD4 ou/et CD45
 - Les cellules CD4+/-KIR3DL2+ représentent xx% des lymphocytes totaux (soit ...G/L)
- Commentaires
 - En présence de cellules CD4+/-KIR3DL2+ $\geq 10\%$ ou $\geq 0,2$ G/L un SS est suspecté (Roelens et al, British Journal of Dermatology 2019).
 - Si KIR3DL2+ est le seul marqueur (en l'absence d'au moins un autre critère EORTC CD7- ou CD26-), un suivi rapproché (3 mois) est recommandé.

Critères *	%/Ly	VA
CD4+CD26-	$\geq 30\%$	≥ 1 G/L
CD4+CD7-	$\geq 40\%$	≥ 1 G/L
CD4+/-KIR3DL2+	$\geq 10\%$	$\geq 0,2$ G/L

(*) Guidelines staging EORTC (2007/2021) / Roelens et al. (BJD. 2019)
% particulièrement adaptés en cas de lymphopénie CD4 (<1,6 G/L)

Proposition



2021: Trois plateformes avec un backbone



FacsCantoll	APCH7	PercP Cy5.5	PECy7	V450	V500	APC	FITC	PE
Anticorps	CD45	CD8	CD16 et CD56	CD3	CD4	CD7	CD26	CD158k
Clone	2D1	SK1	3G8+B159	UCH11	RPA-14	8H8.1	L272	MOG1-M-K32-13E4
Fournisseur	BD	BD	BD	BD	BD	Beckman	BD	Innate Pharma
Référence	641417	345774	557744+557747	560365	560768	A97050	340426	MTA



Navios	KO	APC-700	PC5.5	APC-750	APC	ECD	FITC	PE
Anticorps	CD45	CD8	CD56	CD3	CD4	CD7	CD26	CD158k
Clone	J33	B9.11	N901	UCH11V	13B8.2	Clone 8F8-1	L272	MOG1-M-K32-13E4
Fournisseur	Beckman	Beckman	Beckman	Beckman	Beckman	Beckman	BD	Innate Pharma
Référence	B36294	B49181	B49189	A94680	IM2468	A70202	340426	MTA

PC7	PB
CD33	CD16
D3HL60.251	3G8
Beckman	Beckman
B92408	B36292



FacsLyric	BV786	APCH7	PECy7	APC	V450	BV711	FITC	PE
Anticorps	CD45	CD8	CD56	CD3	CD4 + CD20	CD7	CD26	CD158k
Clone	HI30	SK1	NCAM16.2	SK7	RPA-14+L27	MI-701	L272	MOG1-M-K32-13E4
Fournisseur	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	Innate Pharma
Référence	563716	560179	557744	345767	560345 + 655872	564018	340426	MTA

PercP Cy5.5	APC-R700	BV510	BV605
CD33		TCRC b1	CD279 (PD-1)
P67.6		JOVI.1	EH12.1
BD		BD	BD
333146		747980	563245

Les points « sensibles »

KIR3DL2 FIABLE MAIS

- 15% des patients Sézary sont KIR3DL2-
- Les cellules KIR3DL2+ peuvent représenter qu'une partie de la population clonale

Les points « sensibles »

KIR3DL2 FIABLE MAIS

- 15% des patients Sézary sont KIR3DL2-
- Les cellules KIR3DL2+ peuvent représenter qu'une partie de la population clonale

SUIVI DES PATIENTS AVEC UN CTCL ERYTHRODERMIQUE

- Patients pré-Sézary
- Patients EMF ou MF patients avec une charge tumorale sanguine
- Au cours des différentes lignes de traitement
 - Rémission complète?
 - Ajuster/arrêter le traitement
 - Anticiper une rechute
 - Anticiper l'allo-HSCT

Les points « sensibles »

KIR3DL2 FIABLE MAIS

- 15% des patients Sézary sont KIR3DL2-
- Les cellules KIR3DL2+ peuvent représenter qu'une partie de la population clonale

SUIVI DES PATIENTS AVEC UN CTCL ERYTHRODERMIQUE

- Patients pré-Sézary
- Patients EMF ou MF patients avec une charge tumorale sanguine
- Au cours des différentes lignes de traitement
 - Rémission complète?
 - Ajuster/arrêter le traitement
 - Anticiper une rechute
 - Anticiper l'allo-HSCT

Comment gérer les petites populations?

Les points « sensibles »

KIR3DL2 FIABLE MAIS

- 15% des patients Sézary sont KIR3DL2-
- Les cellules KIR3DL2+ peuvent représenter qu'une partie de la population clonale

SUIVI DES PATIENTS AVEC UN CTCL ERYTHRODERMIQUE

- Patients pré-Sézary
- Patients EMF ou MF patients avec une charge tumorale sanguine
- Au cours des différentes lignes de traitement
 - Rémission complète?
 - Ajuster/arrêter le traitement
 - Anticiper une rechute
 - Anticiper l'allo-HSCT

Comment gérer les petites populations?

Comment le faire d'une manière la plus simple possible?

En restant le plus simple possible en routine hospitalière

MARQUEURS POSITIFS

KIR3DL2

TCRC β 1

MARQUEURS INTERNATIONAUX

CD7

CD26

BASE

CD45

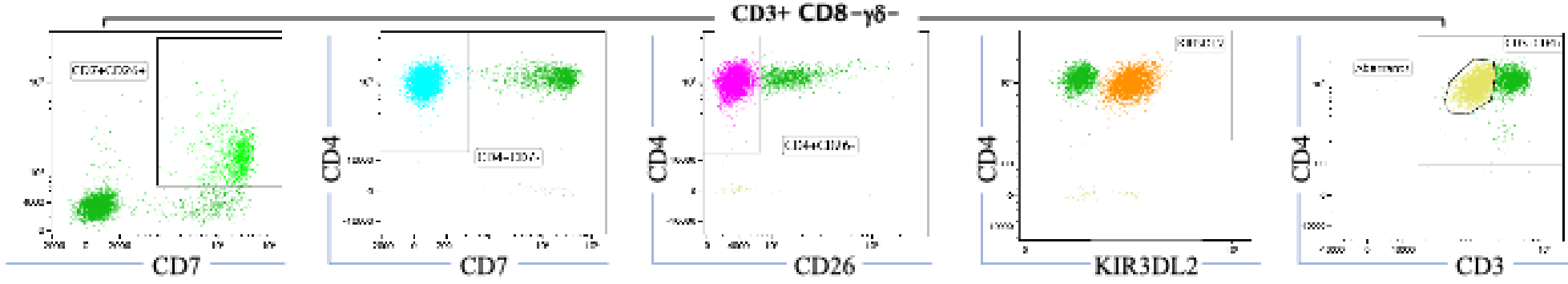
CD3

CD4

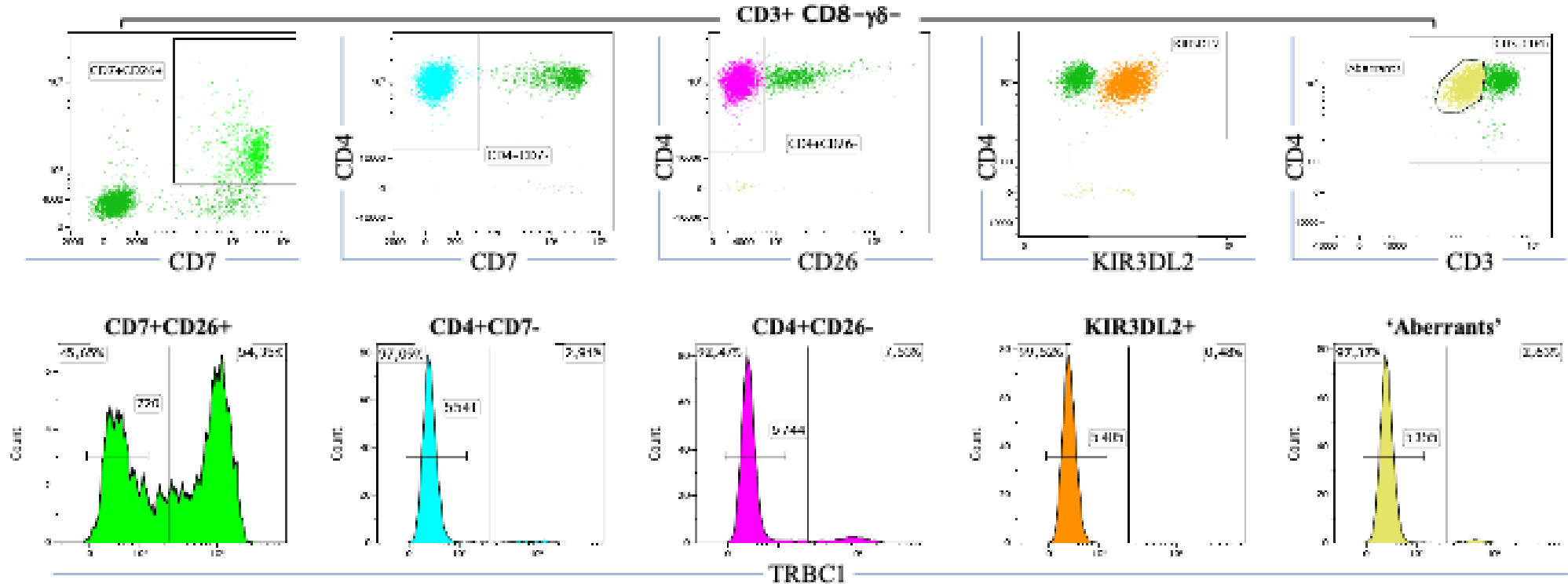
CD8

CD16/56

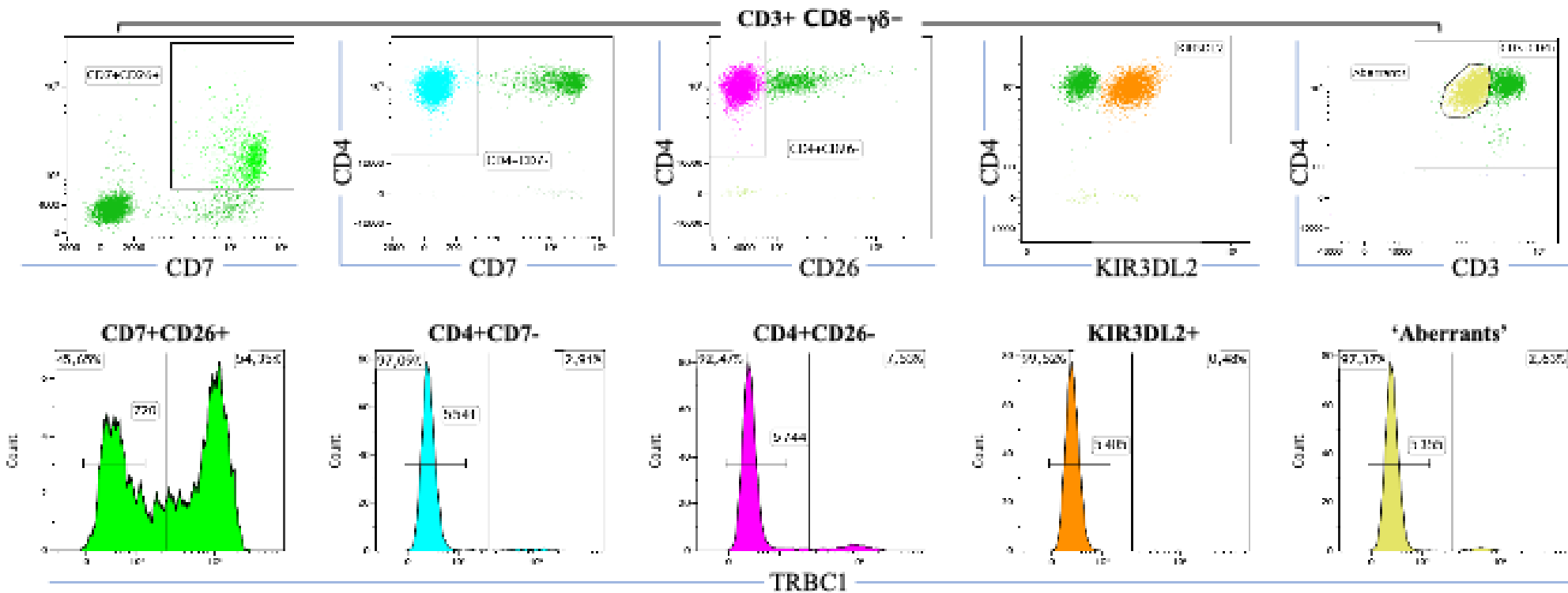
Stratégie de fenêtrage: distribution de TCR $\gamma\delta$ dans les lymphocytes **CD3+CD8- $\gamma\delta$ -**



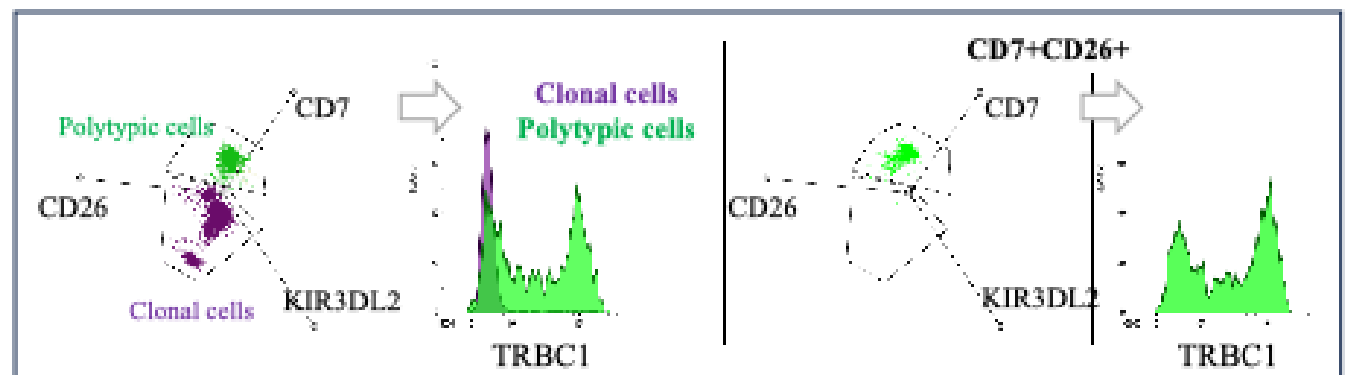
Stratégie de fenêtrage: distribution de TCR $\gamma\delta$ dans les lymphocytes CD3+CD8- $\gamma\delta$ -



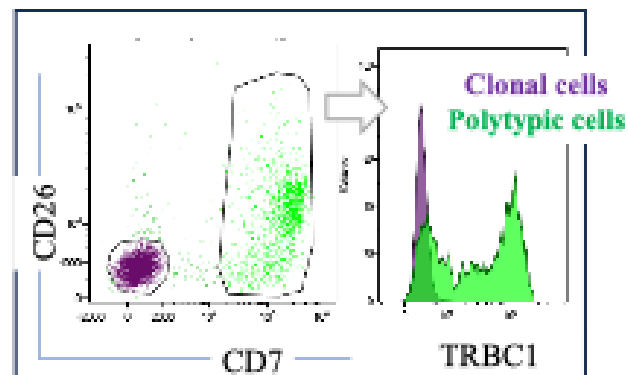
Stratégie de fenêtrage: distribution de TCR $\gamma\delta$ dans les lymphocytes CD3+CD8- $\gamma\delta$ -



(CD3+ CD8-gd-) without CD7+CD26+

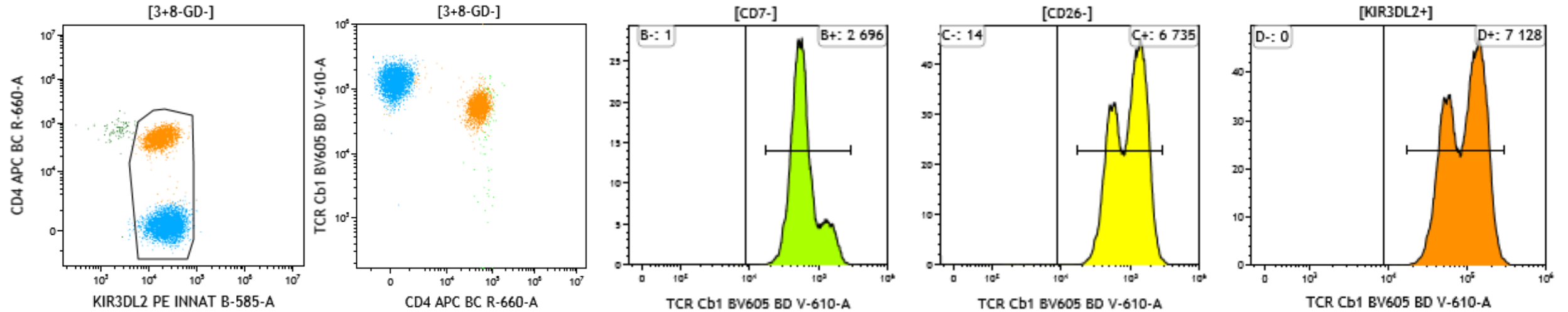


CD3+ CD8- $\gamma\delta$ -



Exemples au diagnostic initial

Patient avec un contingent CD4-

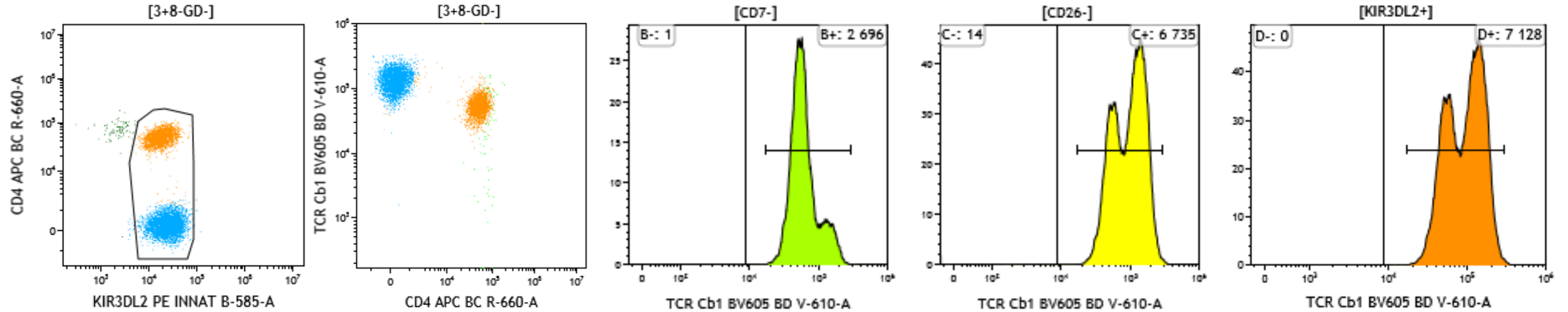


PHENOTYPE SEZARY

CD4+CD7-%Ly	29,67
CD4+CD26-%Ly	33,11
KIR3DL2+%Ly	95,29
CLONE	95,76

Exemples au diagnostic initial

Patient avec un contingent CD4-



PHENOTYPE
SEZARY

CD4+CD7-%Ly	29,67
CD4+CD26-%Ly	33,11
KIR3DL2+%Ly	95,29
CLONE	95,76

Patient RE: 2 sous populations anormales:

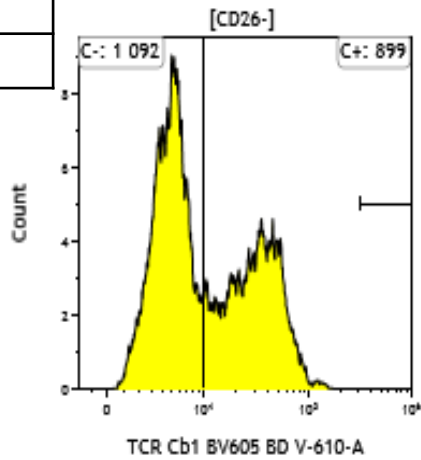
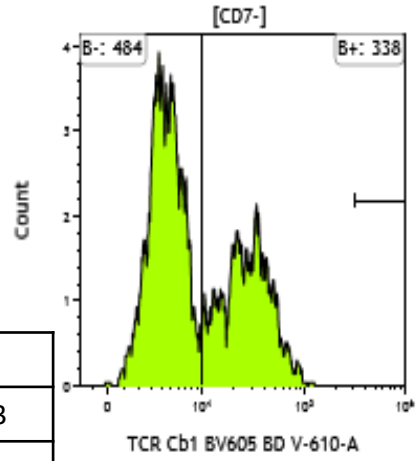
KIR3DL2: informatif
TCRCb1+/dim

Clonalité confirmée par HTS

Exemples au diagnostic initial

Patient avec un stade B2 selon les critères internationaux

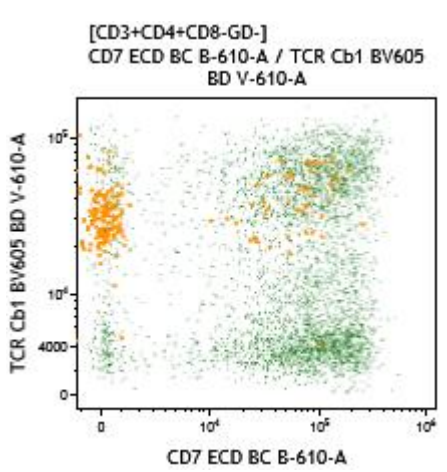
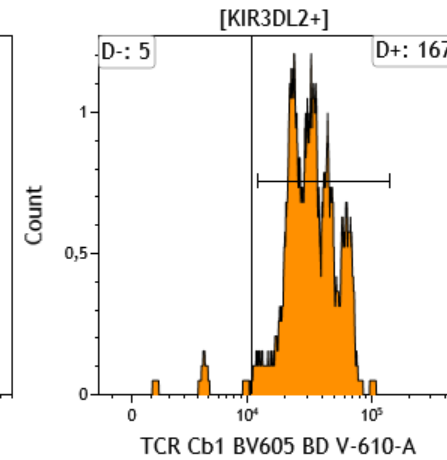
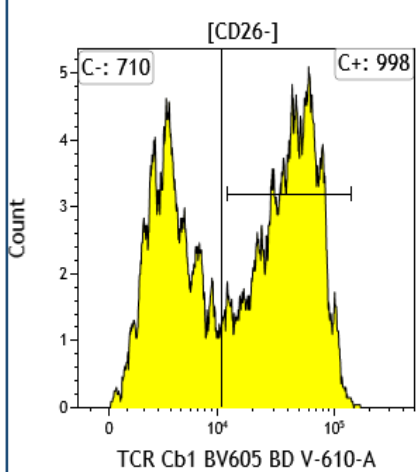
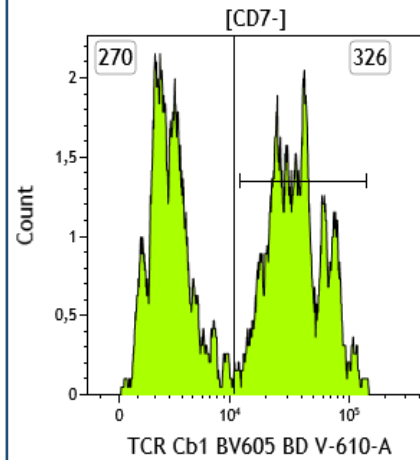
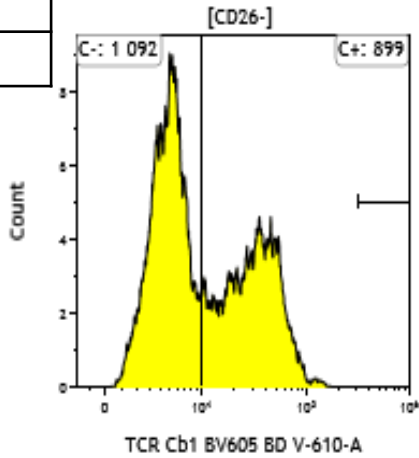
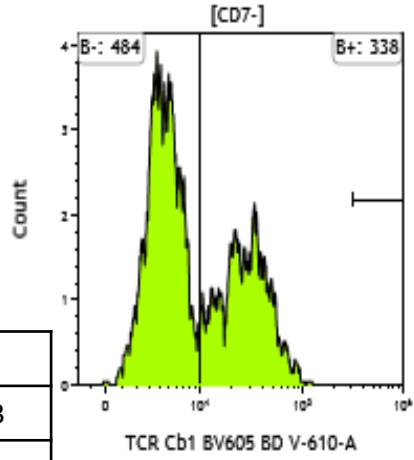
CD4+CD7- % Ly	8 %	236/mm3
CD4+CD26- % Ly	37%	1184/mm3
KIR3DL2+% Ly	0.0%	-
Clone % Ly	0%	-



Exemples au diagnostic initial

Patient avec un stade B2 selon les critères internationaux
 Patient avec MFE et un clone détectable

CD4+CD7- % Ly	8 %	236/mm3
CD4+CD26- % Ly	37%	1184/mm3
KIR3DL2+% Ly	0.0%	-
Clone % Ly	0%	-



CD4+CD7- % Ly	6%	72/mm3
CD4+CD26- % Ly	20%	240/mm3
KIR3DL2+% Ly	2.5%	30/mm3
Clone % Ly	14%	168

B0 → B1?

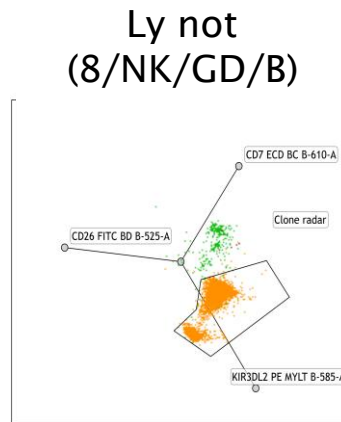
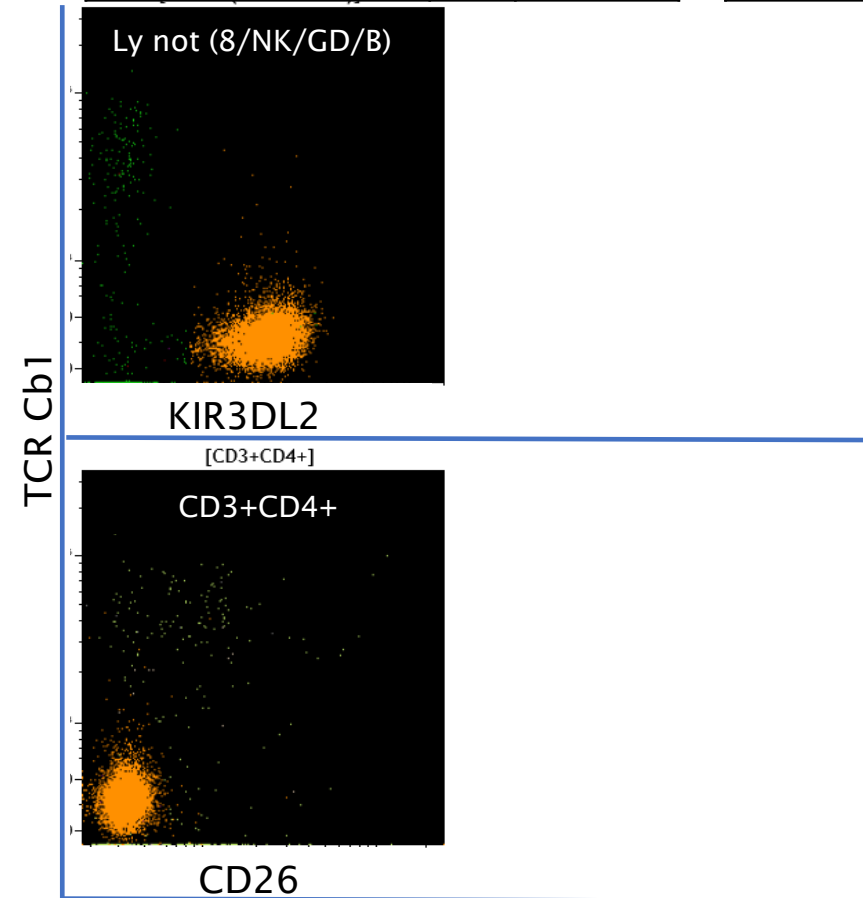
De l'avantage de disposer d'un panel « ouvert »

	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC-700	APC-750	PB	KO	BV605	BV650	BV786
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ac	CD26	CD158e/k	CD7	CD56	CD33	CD4	CD8	CD3		CD45	TCRCb1	TCRGD	
Réf.	BD 340426 Clone L272	Miltenyi 130-116- 178 KIR3 DL1/DL2	Beckm an A7020 2 Clone 8H8-1	Beckman B49189 Clone N901	Beckman B92408 Clone D3HL60.2 51	Beckman IM2468 Clone 13B8.2	Beckman B76279 Clone B9.11	Beckman A94680 Clone UCHT1V		Beckman B36294 Clone J33	BD 747979 JOVI.1	BD 745359 11F2	
Titre	Pur	Pur	Pur	Pur	Pur	Pur	1/10	1/10		Pur	Pur	Pur	
Volume	10µL	1µL	5µL	5µL	5µL	5µL	5µL	5µL		5µL	5µL	5µL	



De l'avantage de disposer d'un panel « ouvert »: suivi thérapeutique

23/11/2024 diagnostic	%	va/mm3
CD4+CD7-	90	22 457
CD4+CD26-	91	22 706
KIR3DL2+	89	22 207
Clone radar	89	22 207

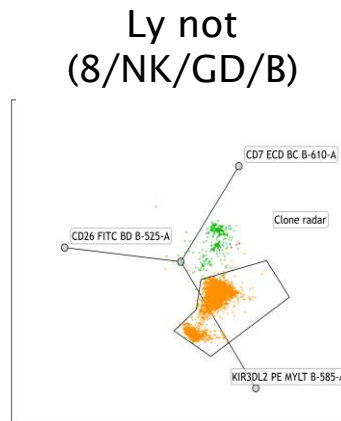
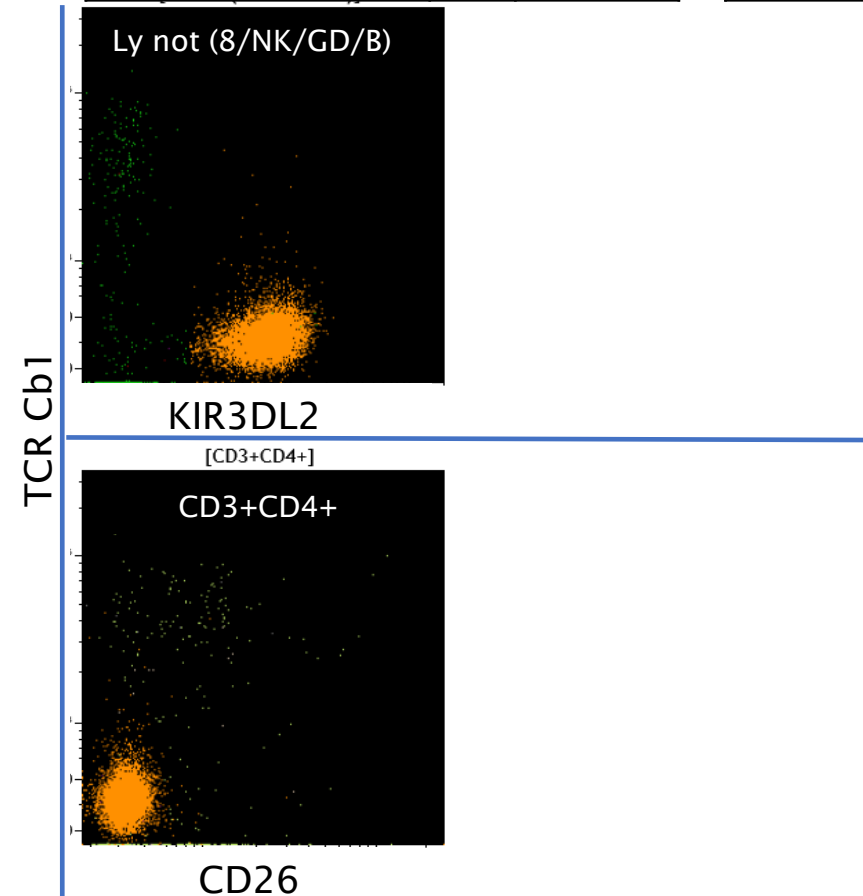


De l'avantage de disposer d'un panel « ouvert »:

23/11/2024 diagnostic	%	va/mm3
CD4+CD7-	90	22 457
CD4+CD26-	91	22 706
KIR3DL2+	89	22 207
Clone radar	89	22 207

Syndrome de Sézary T4N0M0B2.

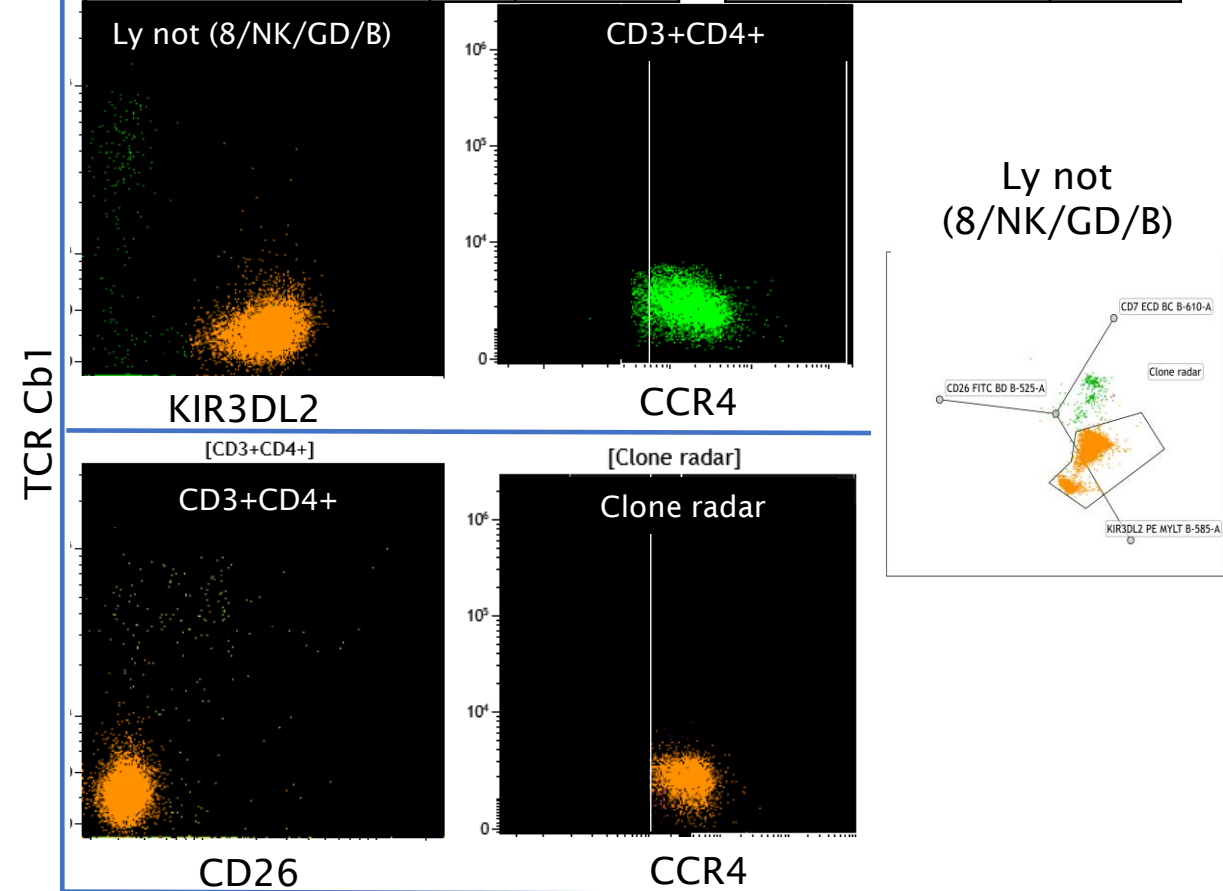
Traitement par Mogamulizumab en première ligne
compte-tenu du caractère hyperleucocytaire
C1J1 le 3 décembre 2024



Traitement par mogamulizumab: anti-CCR4 (CD194) dans le panel

23/11/2024 diagnostic	%	va/mm3		%
CD4+CD7-	90	22 457		
CD4+CD26-	91	22 706	CCR4+/TCD4+ totaux	100
KIR3DL2+	89	22 207	CCR4+/Clone radar	99
Clone radar	89	22 207		

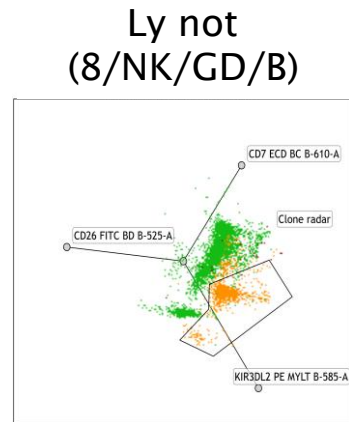
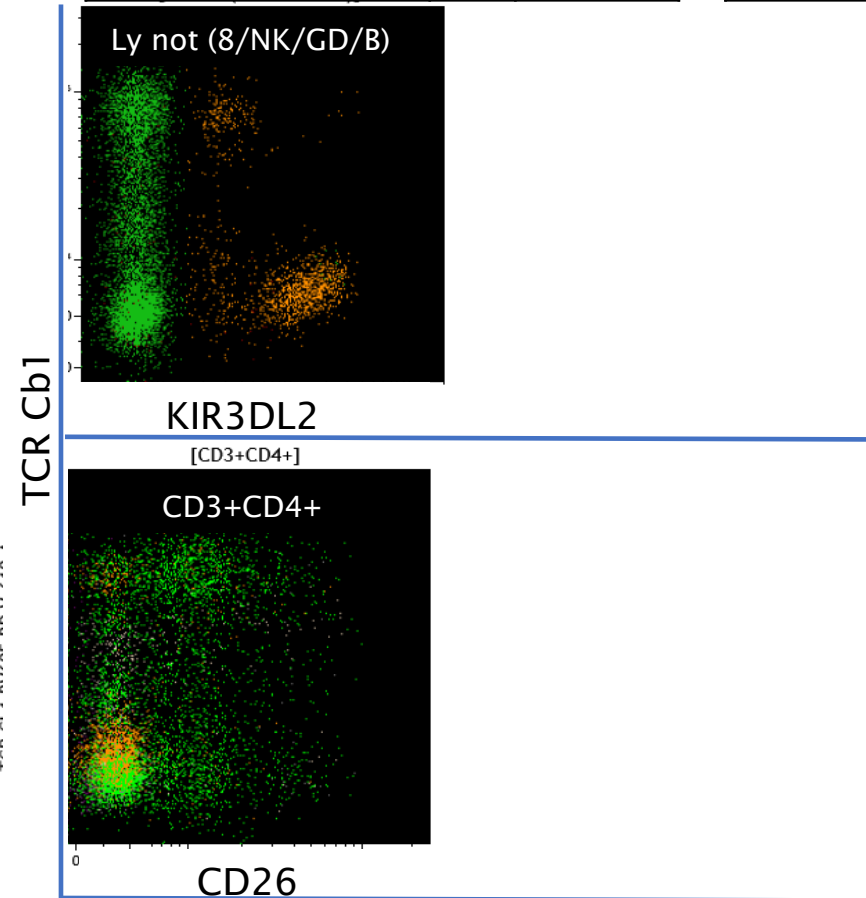
Syndrome de Sézary T4N0M0B2.
 Traitement par Mogamulizumab en première ligne
 compte-tenu du caractère hyperleucocytaire
 C1J1 le 3 décembre 2024



Rémission complète selon EORTC

25/03/2025: RC	%	va/mm3
CD4+CD7-	14	113
CD4+CD26-	29	235
KIR3DL2+	8	65
Clone radar	7	57

Syndrome de Sézary T4N0M0B2.
C4J1 le 25 mars 2024 → RC (passage de B2 à B0)

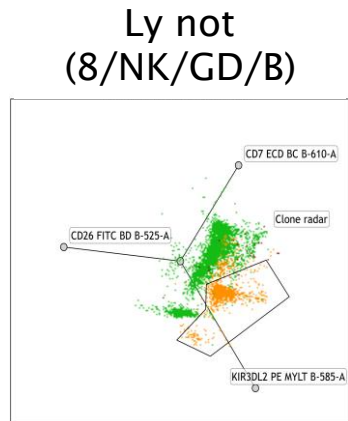
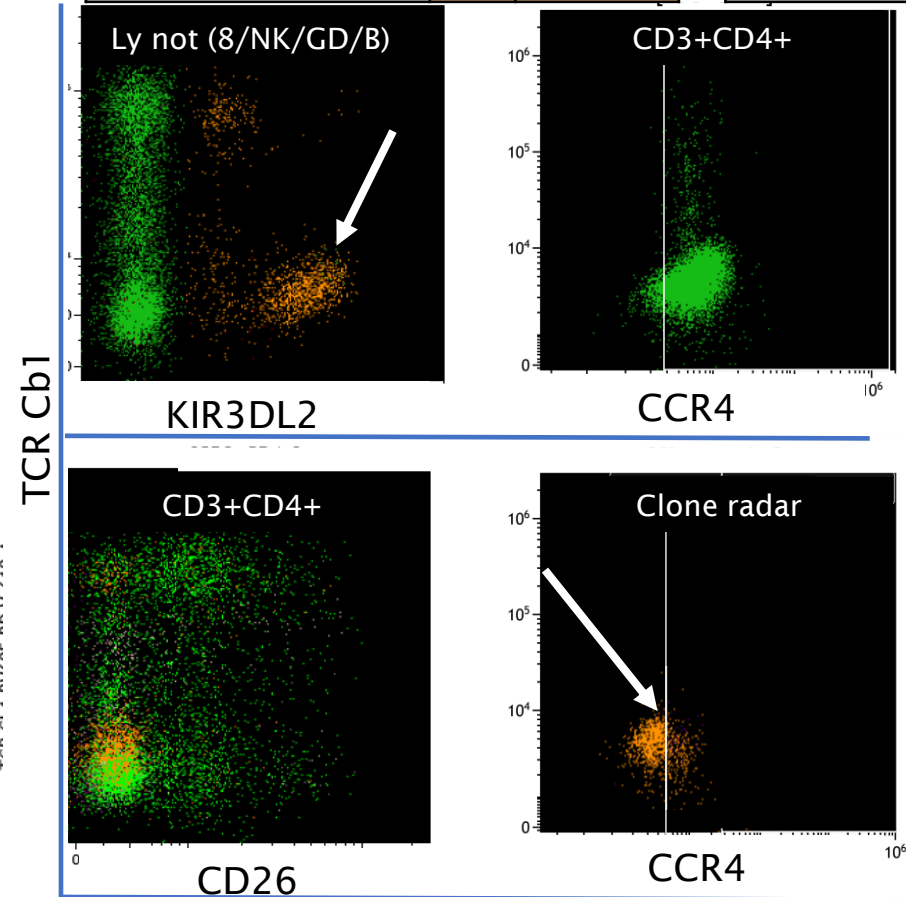


Rémission complète selon EORTC

25/03/2025: RC	%	va/mm3
CD4+CD7-	14	113
CD4+CD26-	29	235
KIR3DL2+	8	65
Clone radar	7	57

	%
CCR4+/TCD4+ totaux	94
CCR4+/Clone radar	12

Syndrome de Sézary T4N0M0B2.
C4J1 le 25 mars 2024 → RC (passage de B2 à B0)



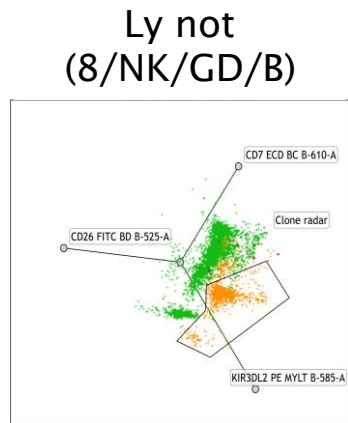
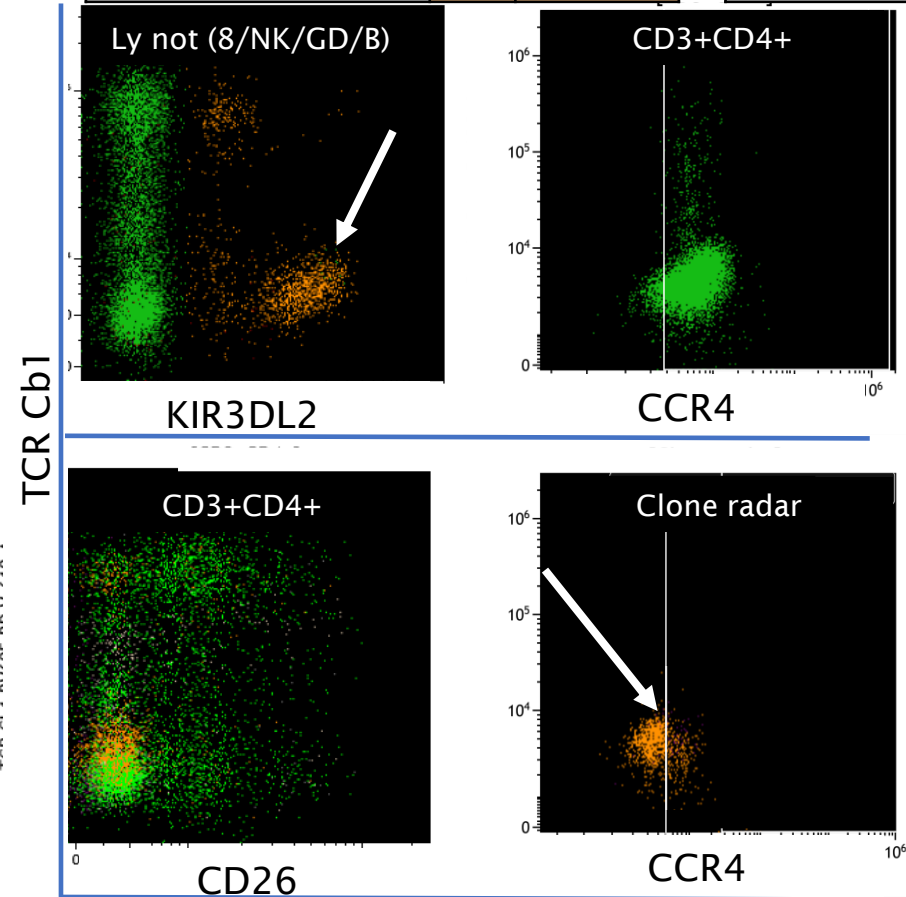
Rémission complète selon EORTC

25/03/2025: RC	%	va/mm3
CD4+CD7-	14	113
CD4+CD26-	29	235
KIR3DL2+	8	65
Clone radar	7	57

	%
CCR4+/TCD4+ totaux	94
CCR4+/Clone radar	12

Syndrome de Sézary T4N0M0B2.
C4J1 le 25 mars 2024 → RC (passage de B2 à B0)

Donneur HLA 10/10
Période de « wash out » du mogamulizumab

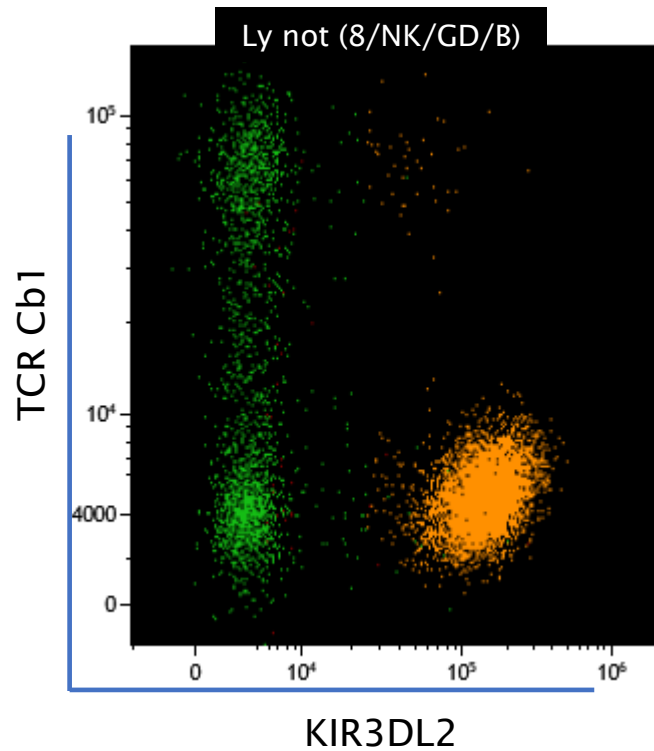


Au cours du wash out

07/07/2025	%	va/mm3
CD4+CD7-	53	742
CD4+CD26-	59	826
KIR3DL2+	50	700
Clone radar	49	686

Syndrome de Sézary T4N0M0B2.
En voie de rechute

Rechallenge mogamulizumab

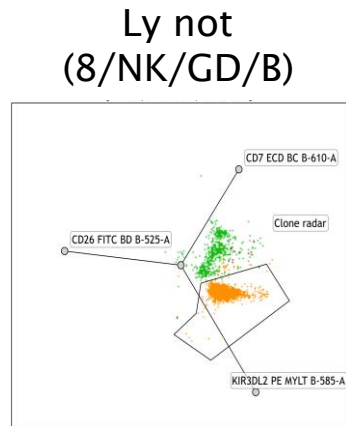
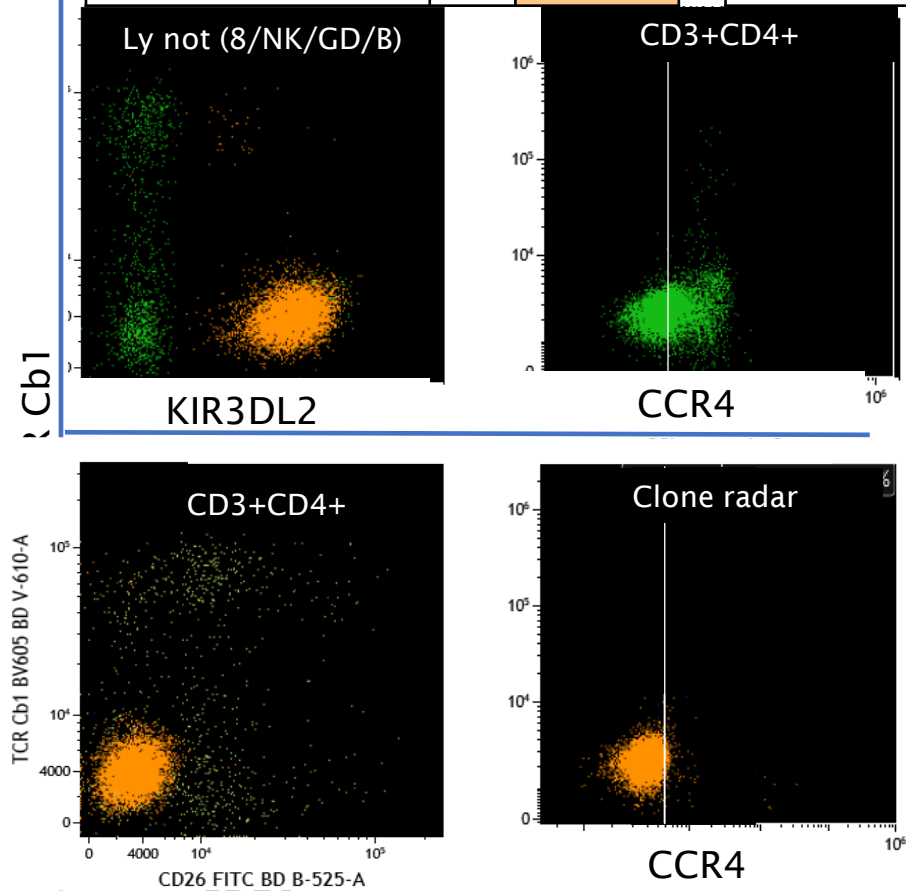


Rechute avec perte de cible

10/07/2025	%	va/mm3		%
CD4+CD7-	57	2 280		
CD4+CD26-	77	3 080	CCR4+/TCD4+ totaux	47
KIR3DL2+	71	2 840	CCR4+/Clone radar	1
Clone radar	71	2 840		

Syndrome de Sézary T4N0M0B2.
En voie de rechute

Arrêt mogamulizumab, perte totale de cible sur le clone



INSERM UMR1342, team
"Lymphoid niches,
Chemokines and immuno-
hematological syndromes"
Van Anh Ta
Marie Roelens



Laboratoire d'hématologie
Hôpital Saint-Louis
Jean Soulier

Caroline Bardon
Eugénie Godo
Cynthia Jean

Stéphanie Matthis
Pierre Lemaire
Clémentine Chauvel

Département de Dermatologie
Hôpital Saint-Louis
Martine Bagot
Adèle de Masson
Caroline Ram-Wolff

Département de Dermatologie
CHU Bordeaux
Marie Beylot Barry



Jean-Philippe Vial (Bordeaux)
Richard Veyrat-Masson (Clermont Ferrand)

KYOWA KIRIN

