

Diagnostic des leucémies

V. Louvet

Réunion IMTh, 21 mars 2005

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?
Fonctionnement d'un cytomètre en flux
Données issues du cytomètre
Expertise du médecin
Problématique
Première idée et inconvénients
Méthodologie proposée

Sommaire

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?

Hématopoïèse et leucémies

Diagnostic de leucémies

Classification des leucémies aiguës

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Données issues du cytomètre

Expertise du médecin

Problématique

Première idée et inconvénients

Méthodologie proposée

Hématopoïèse et leucémies

- ▶ ensemble des processus par lesquels les **cellules souches de la moëlle osseuse** se multiplient, se différencient et aboutissent à des **cellules sanguines matures**.

Hématopoïèse et leucémies

- ▶ ensemble des processus par lesquels les **cellules souches de la moëlle osseuse** se multiplient, se différencient et aboutissent à des **cellules sanguines matures**.
- ▶ **Leucémies** : prolifération maligne de cellules d'origine hématopoïétique immatures (appelées **blastes**) et rapidement diffusantes.

Les types de leucémies aiguës

- ▶ Deux grands types de leucémies aiguës en fonction de l'origine du précurseur hématopoiétique atteint :

Les types de leucémies aiguës

- ▶ Deux grands types de leucémies aiguës en fonction de l'origine du précurseur hématopoïétique atteint :
 - ▶ **leucémies aiguës lymphoblastiques LAL** : correspondantes à des précurseurs lymphoïdes B ou T.

Les types de leucémies aiguës

- ▶ Deux grands types de leucémies aiguës en fonction de l'origine du précurseur hématopoïétique atteint :
 - ▶ **leucémies aiguës lymphoblastiques LAL** : correspondantes à des précurseurs lymphoïdes B ou T.
 - ▶ **leucémies aiguës myéloblastiques LAM** : correspondantes à une population myéloïde immature.

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Données issues du cytomètre

Expertise du médecin

Problématique

Première idée et inconvénients

Méthodologie proposée

Hématopoïèse et leucémies

Diagnostic de leucémies

Classification des leucémies aiguës

Diagnostic de leucémies

- ▶ Diagnostic initial sur signes cliniques

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Données issues du cytomètre

Expertise du médecin

Problématique

Première idée et inconvénients

Méthodologie proposée

Hématopoïèse et leucémies

Diagnostic de leucémies

Classification des leucémies aiguës

Diagnostic de leucémies

- ▶ Diagnostic initial sur signes cliniques
- ▶ **Etude morphologique (cytologique)** des blastes pour évaluer le groupe de leucémies.

Diagnostic de leucémies

- ▶ Diagnostic initial sur signes cliniques
- ▶ **Etude morphologique (cytologique)** des blastes pour évaluer le groupe de leucémies.
- ▶ **Etude cytochimique** complétant l'étude cytologique.

Diagnostic de leucémies

- ▶ Diagnostic initial sur signes cliniques
- ▶ **Etude morphologique (cytologique)** des blastes pour évaluer le groupe de leucémies.
- ▶ **Etude cytochimique** complétant l'étude cytologique.
- ▶ **Etude immunophénotypique** pour détecter l'expression d'antigènes ou clusters de différenciation (CD) sur les blastes et rattacher la prolifération blastique à une lignée ou à une autre.

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Données issues du cytomètre

Expertise du médecin

Problématique

Première idée et inconvénients

Méthodologie proposée

Hématopoïèse et leucémies

Diagnostic de leucémies

Classification des leucémies aiguës

Classification des leucémies aiguës

- ▶ Plusieurs classifications existantes :

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Données issues du cytomètre

Expertise du médecin

Problématique

Première idée et inconvénients

Méthodologie proposée

Hématopoïèse et leucémies

Diagnostic de leucémies

Classification des leucémies aiguës

Classification des leucémies aiguës

- ▶ Plusieurs classifications existantes :
 - ▶ **LAM** :

Classification des leucémies aiguës

- ▶ Plusieurs classifications existantes :
 - ▶ **LAM** :
 - ▶ Classification **FAB** (Franco-Américano-Britannique), la plus courante mais qui tend à être remplacée par une classification plus complète. Définit 7 types selon les myéloblastes en cause et une forme indifférenciée.

Classification des leucémies aiguës

- ▶ Plusieurs classifications existantes :
 - ▶ **LAM** :
 - ▶ Classification **FAB** (Franco-Américano-Britannique), la plus courante mais qui tend à être remplacée par une classification plus complète. Définit 7 types selon les myéloblastes en cause et une forme indifférenciée.
 - ▶ Classification de **l'OMS (WHO)**, définissant 5 classes de leucémies prenant en compte différents facteurs influençant le pronostic de la maladie (anomalie génétique, post-chimiothérapie) ..

Classification des leucémies aiguës

- ▶ Plusieurs classifications existantes :
 - ▶ **LAM** :
 - ▶ Classification **FAB** (Franco-Américano-Britannique), la plus courante mais qui tend à être remplacée par une classification plus complète. Définit 7 types selon les myéloblastes en cause et une forme indifférenciée.
 - ▶ Classification de **l'OMS (WHO)**, définissant 5 classes de leucémies prenant en compte différents facteurs influençant le pronostic de la maladie (anomalie génétique, post-chimiothérapie) ..
 - ▶ **LAL** : classification **EGIL** (European Group for the Immunological characterization of Leukemias), définie en fonction des stades de maturation des cellules lymphoïdes et de la lignée en cause.

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

- ▶ Etude précise des **cellules** d'un échantillon biologique entraînées dans un flux liquide et qui défilent à grande vitesse devant **une source lumineuse**.

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

- ▶ Etude précise des **cellules** d'un échantillon biologique entraînées dans un flux liquide et qui défilent à grande vitesse devant **une source lumineuse**.
 - ▶ **Diffusion dans l'axe** : corrélée à la taille

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

- ▶ Etude précise des **cellules** d'un échantillon biologique entraînées dans un flux liquide et qui défilent à grande vitesse devant **une source lumineuse**.
 - ▶ **Diffusion dans l'axe** : corrélée à la taille
 - ▶ **Diffusion à 90°** : corrélée à la granularité

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

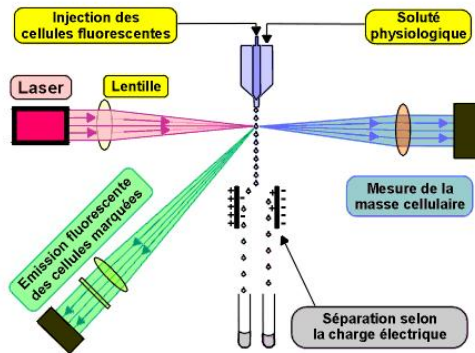
- ▶ Etude précise des **cellules** d'un échantillon biologique entraînées dans un flux liquide et qui défilent à grande vitesse devant **une source lumineuse**.
 - ▶ **Diffusion dans l'axe** : corrélée à la taille
 - ▶ **Diffusion à 90°** : corrélée à la granularité
- ▶ **Utilisation de fluorochromes** : marquage des cellules avec des anticorps monoclonaux spécifiques regroupés par CD (Clusters of Differentiation).

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

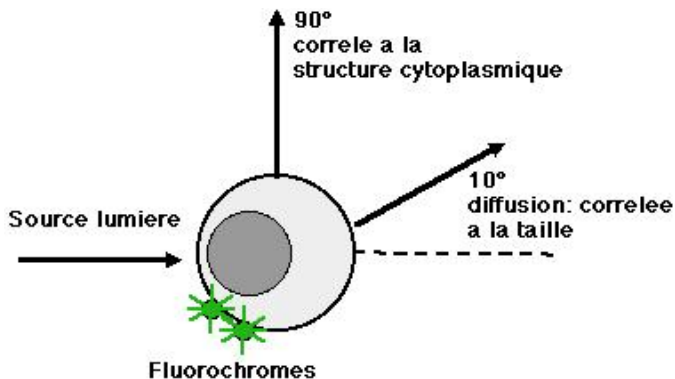
- ▶ Etude précise des **cellules** d'un échantillon biologique entraînées dans un flux liquide et qui défilent à grande vitesse devant **une source lumineuse**.
 - ▶ **Diffusion dans l'axe** : corrélée à la taille
 - ▶ **Diffusion à 90°** : corrélée à la granularité
- ▶ **Utilisation de fluorochromes** : marquage des cellules avec des anticorps monoclonaux spécifiques regroupés par CD (Clusters of Differentiation).
 - ▶ **Mesure des signaux de diffusion et de fluorescence** liés à ces fluorochromes.

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?
Fonctionnement d'un cytomètre en flux
Données issues du cytomètre
Expertise du médecin
Problématique
Première idée et inconvénients
Méthodologie proposée

Schéma d'un cytomètre en flux



Mesure de la diffraction lumineuse



Données issues du cytomètre

- ▶ **Format FCS** (Flow Cytometry Standart) : format normalisé (norme définie par l'International Society for Analytical Cytology, ISAC).

Données issues du cytomètre

- ▶ **Format FCS** (Flow Cytometry Standart) : format normalisé (norme définie par l'International Society for Analytical Cytology, ISAC).
- ▶ Conversion au **format ASCII**

Données issues du cytomètre

- ▶ **Format FCS** (Flow Cytometry Standart) : format normalisé (norme définie par l'International Society for Analytical Cytology, ISAC).
- ▶ Conversion au **format ASCII**
- ▶ **Contenu des fichiers** : **8 données par cellule** => tableau de 8 colonnes et plusieurs milliers de lignes

Signification des données

- ▶ Pour chaque cellule :
 1. **FSC-H** : taille de la cellule

Signification des données

- ▶ Pour chaque cellule :
 1. **FSC-H** : taille de la cellule
 2. **SSC-H** : granulosité (structure) de la cellule

Signification des données

- ▶ Pour chaque cellule :
 1. **FSC-H** : taille de la cellule
 2. **SSC-H** : granulosité (structure) de la cellule
 3. **FL1-H** : fluorescence du premier marqueur

Signification des données

► Pour chaque cellule :

1. **FSC-H** : taille de la cellule
2. **SSC-H** : granulosité (structure) de la cellule
3. **FL1-H** : fluorescence du premier marqueur
4. **FL2-H** : fluorescence du deuxième marqueur

Signification des données

► Pour chaque cellule :

1. **FSC-H** : taille de la cellule
2. **SSC-H** : granulosité (structure) de la cellule
3. **FL1-H** : fluorescence du premier marqueur
4. **FL2-H** : fluorescence du deuxième marqueur
5. **FL3-H** : fluorescence du troisième marqueur

Signification des données

► Pour chaque cellule :

1. **FSC-H** : taille de la cellule
2. **SSC-H** : granulosité (structure) de la cellule
3. **FL1-H** : fluorescence du premier marqueur
4. **FL2-H** : fluorescence du deuxième marqueur
5. **FL3-H** : fluorescence du troisième marqueur
6. **FL2-A** : donnée correspondante à la quantité d'ADN dans la cellule

Signification des données

► Pour chaque cellule :

1. **FSC-H** : taille de la cellule
2. **SSC-H** : granulosité (structure) de la cellule
3. **FL1-H** : fluorescence du premier marqueur
4. **FL2-H** : fluorescence du deuxième marqueur
5. **FL3-H** : fluorescence du troisième marqueur
6. **FL2-A** : donnée correspondante à la quantité d'ADN dans la cellule
7. **FL4-H** : fluorescence du quatrième marqueur

Dépendance et échelle des données

- ▶ La mesure **objective** de la fluorescence est problématique
=> très dépendante de **facteurs externes** : configuration de l'instrument, choix des filtres ...

Dépendance et échelle des données

- ▶ La mesure **objective** de la fluorescence est problématique
=> très dépendante de **facteurs externes** : configuration de l'instrument, choix des filtres ...
- ▶ Caractère **logarithmique** de l'échelle de fluorescence :

Dépendance et échelle des données

- ▶ La mesure **objective** de la fluorescence est problématique
=> très dépendante de **facteurs externes** : configuration de l'instrument, choix des filtres ...
- ▶ Caractère **logarithmique** de l'échelle de fluorescence :
 - ▶ l'intensité de fluorescence de chaque particule est distribuée sur une **échelle de 256 ou 1024 canaux** (selon le cytomètre)

Dépendance et échelle des données

- ▶ La mesure **objective** de la fluorescence est problématique
=> très dépendante de **facteurs externes** : configuration de l'instrument, choix des filtres ...
- ▶ Caractère **logarithmique** de l'échelle de fluorescence :
 - ▶ l'intensité de fluorescence de chaque particule est distribuée sur une **échelle de 256 ou 1024 canaux** (selon le cytomètre)
 - ▶ le signal est amplifié de façon logarithmique selon un **nombre de décades** propre à l'instrument (3 ou 4 pour la plupart).

Dépendance et échelle des données

- ▶ La mesure **objective** de la fluorescence est problématique
=> très dépendante de **facteurs externes** : configuration de l'instrument, choix des filtres ...
- ▶ Caractère **logarithmique** de l'échelle de fluorescence :
 - ▶ l'intensité de fluorescence de chaque particule est distribuée sur une **échelle de 256 ou 1024 canaux** (selon le cytomètre)
 - ▶ le signal est amplifié de façon logarithmique selon un **nombre de décades** propre à l'instrument (3 ou 4 pour la plupart).
- ▶ Conversion des données pour passer de ces estimations à des valeurs linéaires équivalentes qui relatent correctement la distribution logarithmique

Expertise du médecin

- ▶ Pour chaque patient, **analyse de plusieurs dizaines de représentations bi-dimensionnelles des nuages de points** des cellules pour l'ensemble des marqueurs.

Expertise du médecin

- ▶ Pour chaque patient, **analyse de plusieurs dizaines de représentations bi-dimensionnelles des nuages de points** des cellules pour l'ensemble des marqueurs.
- ▶ **Identification des différents types de cellules** : blastes, lymphocytes ...

Expertise du médecin

- ▶ Pour chaque patient, **analyse de plusieurs dizaines de représentations bi-dimensionnelles des nuages de points** des cellules pour l'ensemble des marqueurs.
- ▶ **Identification des différents types de cellules** : blastes, lymphocytes ...
- ▶ **Détermination des seuils d'autofluorescence** des cellules.

Expertise du médecin

- ▶ Pour chaque patient, **analyse de plusieurs dizaines de représentations bi-dimensionnelles des nuages de points** des cellules pour l'ensemble des marqueurs.
- ▶ **Identification des différents types de cellules** : blastes, lymphocytes ...
- ▶ **Détermination des seuils d'autofluorescence** des cellules.
- ▶ **Approche qualitative** des données à partir de ces seuils de positivité. Détermination du pourcentage des cellules exprimant les différents marqueurs.

Problématique

- ▶ Comprendre de façon **statistique** les corrélations entre les données, et entre les données et les diagnostics.

Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?

Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Données issues du cytomètre

Expertise du médecin

Problématique

Première idée et inconvénients

Méthodologie proposée

Problématique

- ▶ Comprendre de façon **statistique** les corrélations entre les données, et entre les données et les diagnostics.
- ▶ Avoir une approche **quantitative** des données.

Problématique

- ▶ Comprendre de façon **statistique** les corrélations entre les données, et entre les données et les diagnostics.
- ▶ Avoir une approche **quantitative** des données.
- ▶ **Proposer des méthodes de traitements** des données cliniques.

Problématique

- ▶ Comprendre de façon **statistique** les corrélations entre les données, et entre les données et les diagnostics.
- ▶ Avoir une approche **quantitative** des données.
- ▶ **Proposer des méthodes de traitements** des données cliniques.
- ▶ S'appuyer sur **une base de données** créée avec un grand nombre de patients pour déterminer les caractéristiques quantitatives de chaque type de leucémie.

Problématique

- ▶ Comprendre de façon **statistique** les corrélations entre les données, et entre les données et les diagnostics.
- ▶ Avoir une approche **quantitative** des données.
- ▶ **Proposer des méthodes de traitements** des données cliniques.
- ▶ S'appuyer sur **une base de données** créée avec un grand nombre de patients pour déterminer les caractéristiques quantitatives de chaque type de leucémie.
- ▶ Pouvoir comparer **chaque nouveau patient** avec cette base de données.

Problématique

- ▶ Comprendre de façon **statistique** les corrélations entre les données, et entre les données et les diagnostics.
- ▶ Avoir une approche **quantitative** des données.
- ▶ **Proposer des méthodes de traitements** des données cliniques.
- ▶ S'appuyer sur **une base de données** créée avec un grand nombre de patients pour déterminer les caractéristiques quantitatives de chaque type de leucémie.
- ▶ Pouvoir comparer **chaque nouveau patient** avec cette base de données.
- ▶ Analyser ces résultats par rapport aux **classifications existantes**.

Première idée et inconvénients

- ▶ Utilisation directe des données pour effectuer une recherche de **groupes de cellules similaires** en appliquant des techniques de classification non supervisée sur l'espace à 6 dimensions (taille, structure et les 4 marqueurs).

Première idée et inconvénients

- ▶ Utilisation directe des données pour effectuer une recherche de **groupes de cellules similaires** en appliquant des techniques de classification non supervisée sur l'espace à 6 dimensions (taille, structure et les 4 marqueurs).
- ▶ les **inconvénients** de cette approche :

Première idée et inconvénients

- ▶ Utilisation directe des données pour effectuer une recherche de **groupes de cellules similaires** en appliquant des techniques de classification non supervisée sur l'espace à 6 dimensions (taille, structure et les 4 marqueurs).
- ▶ les **inconvénients** de cette approche :
 - ▶ on ne considère pas le patient **dans sa globalité**, mais fichier par fichier.

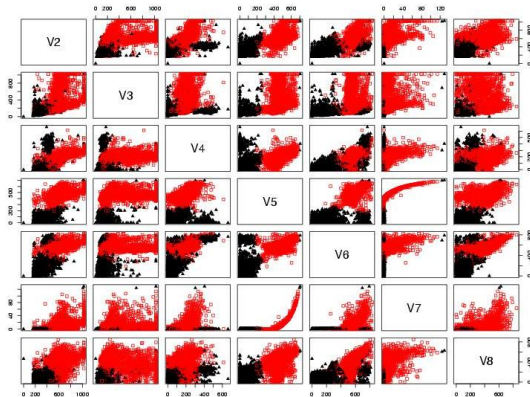
Première idée et inconvénients

- ▶ Utilisation directe des données pour effectuer une recherche de **groupes de cellules similaires** en appliquant des techniques de classification non supervisée sur l'espace à 6 dimensions (taille, structure et les 4 marqueurs).
- ▶ les **inconvénients** de cette approche :
 - ▶ on ne considère pas le patient **dans sa globalité**, mais fichier par fichier.
 - ▶ on ne prend pas en compte **les spécificités de chaque type de cellule (blastes, lymphocytes)** qui ne réagissent pas de la même façon aux marqueurs.

Première idée et inconvénients

- ▶ Utilisation directe des données pour effectuer une recherche de **groupes de cellules similaires** en appliquant des techniques de classification non supervisée sur l'espace à 6 dimensions (taille, structure et les 4 marqueurs).
- ▶ les **inconvénients** de cette approche :
 - ▶ on ne considère pas le patient **dans sa globalité**, mais fichier par fichier.
 - ▶ on ne prend pas en compte **les spécificités de chaque type de cellule (blastes, lymphocytes)** qui ne réagissent pas de la même façon aux marqueurs.
 - ▶ on ne prend pas en compte **l'autofluorescence des cellules**.

Première idée : exemple



Approche néophyte : qu'est-ce qu'une leucémie ?
Fonctionnement d'un cytomètre en flux
Données issues du cytomètre
Expertise du médecin
Problématique
Première idée et inconvénients
Méthodologie proposée

Méthodologie proposée

- ▶ **Pré-traitement des données :**

Méthodologie proposée

- ▶ **Pré-traitement des données** :
 - ▶ **identification des cellules** à analyser (blastes, lymphocytes)

Méthodologie proposée

- ▶ **Pré-traitement des données** :
 - ▶ **identification des cellules** à analyser (blastes, lymphocytes)
 - ▶ **Détermination des seuils d'autofluorescence** des cellules

Méthodologie proposée

- ▶ **Pré-traitement des données** :
 - ▶ **identification des cellules** à analyser (blastés, lymphocytes)
 - ▶ **Détermination des seuils d'autofluorescence** des cellules
- ▶ **Après pré-traitement** : **données représentatives et valides** pour une analyse statistique systématique.

Analyse descriptive des données qualitatives

- ▶ **Analyse factorielle** : **projection**, à partir des valeurs qualitatives (positif/négatif ou pourcentage d'expression des marqueurs) sur un espace de dimension 2 qui représente le mieux l'espace multidimensionnel de l'ensemble des données.

Analyse descriptive des données qualitatives

- ▶ **Analyse factorielle** : **projection**, à partir des valeurs qualitatives (positif/négatif ou pourcentage d'expression des marqueurs) sur un espace de dimension 2 qui représente le mieux l'espace multidimensionnel de l'ensemble des données.
 - ▶ On peut associer à chaque patient le **diagnostic** réalisé par le médecin : permet de vérifier l'existence de groupes cohérents de patients par type de maladie.

Analyse descriptive des données qualitatives, suite

- ▶ **Coefficients de corrélation** : pour comprendre l'interaction des différents marqueurs entre eux en fonction du type de leucémie.

Analyse descriptive des données qualitatives, suite

- ▶ **Coefficients de corrélation** : pour comprendre l'interaction des différents marqueurs entre eux en fonction du type de leucémie.
- ▶ **Classification Ascendante Hiérarchique** : Définir des groupes de données cohérents en prenant en compte une distance entre les individus.

Prise en compte de l'aspect quantitatif

- ▶ **Analyse qualitative** : permet d' **ajuster et de vérifier** les données par rapport à l'analyse du médecin

Prise en compte de l'aspect quantitatif

- ▶ **Analyse qualitative** : permet d' **ajuster et de vérifier** les données par rapport à l'analyse du médecin
- ▶ **Prise en compte de l'aspect quantitatif** : il faut avant tout définir une technique de **quantification des données** :

Prise en compte de l'aspect quantitatif

- ▶ **Analyse qualitative** : permet d' **ajuster et de vérifier** les données par rapport à l'analyse du médecin
- ▶ **Prise en compte de l'aspect quantitatif** : il faut avant tout définir une technique de **quantification des données** :
 - ▶ **Evaluation de la forme des nuages de points** : dispersion du nuage, rapprochement par rapport à une forme existante ...

Prise en compte de l'aspect quantitatif

- ▶ **Analyse qualitative** : permet d' **ajuster et de vérifier** les données par rapport à l'analyse du médecin
- ▶ **Prise en compte de l'aspect quantitatif** : il faut avant tout définir une technique de **quantification des données** :
 - ▶ **Evaluation de la forme des nuages de points** : dispersion du nuage, rapprochement par rapport à une forme existante ...
 - ▶ Dans ce cas, à chaque marqueur va être associé un certain nombre de données correspondantes aux **caractéristiques de la forme ou aux valeurs liées à la dispersion**

Validation des résultats, outils proposés

- ▶ **Validation des résultats** : étude portant sur la moitié de l'échantillon disponible et validation sur l'autre moitié (pour l'instant, environ 80 cas)

Validation des résultats, outils proposés

- ▶ **Validation des résultats** : étude portant sur la moitié de l'échantillon disponible et validation sur l'autre moitié (pour l'instant, environ 80 cas)
- ▶ **Outil logiciel** : mise en oeuvre de méthodes statistiques classiques, utilisation du logiciel open-source **R**

Divers

- ▶ Prise en compte de la nature des échantillons biologiques :
sang, moëlle, rate

Divers

- ▶ Prise en compte de la nature des échantillons biologiques : sang, moëlle, rate
- ▶ Corrélation avec d'autres types de facteurs : étude chromosomique, réaction aux traitements, évolution de la maladie ...