

Rôle du biologiste dans l'exploration des hyperlymphocytoses

I. GHARIANI,
N. BRAHAM JMILI

Résumé : Une hyperlymphocytose sanguine est définie par un taux de lymphocytes supérieur à 4000/mm³ chez l'adulte et 8000/mm³ chez l'enfant. Cette hyperlymphocytose peut être due à des étiologies diverses, en effet elle peut être soit réactionnelle (secondaire à une infection) soit maligne (révèle un syndrome lymphoprolifératif chronique). La découverte de cette hyperlymphocytose est possible à la suite de la réalisation d'un hémogramme prescrit devant l'existence de polyadénopathies ou de signes cliniques d'insuffisance médullaire voire en situation pré-opératoire ou à l'occasion d'un examen systématique. L'analyse morphologique lymphocytaire est fondamentale dans la démarche diagnostique des hyperlymphocytoses, elle permet d'orienter le diagnostic, indique les investigations complémentaires utiles et surtout, elle est nécessaire à l'interprétation de l'immunophénotypage et autres analyses. L'immonophénotypage par cytométrie en flux est un élément fondamental du diagnostic de l'hyperlymphocytose. Il permet de confirmer la présence d'un syndrome lymphoprolifératif chronique et de le classer avec précision.

Mots clés : hyperlymphocytose, réactionnelle, syndrome lymphoprolifératif chronique, hémogramme, immunophénotypage, cytométrie en flux.

Role of laboratory in exploring lymphocytosis

Blood lymphocytosis is defined by a rate greater than 4000 cells / mm³ in adults and 8,000 / mm³ in children. This lymphocytosis maybe due to diverse causes : reactive (secondary to infection) or malignant (chronic lymphoproliferative disorder). Lymphocytosis is revealed by blood analysis prescribed at the existence of adenopathies, clinical signs of bone marrow failure, in preoperatively situations or during a systematic review. Morphological analysis of lymphocytes is fundamental in the diagnosis of hyperlymphocytosis, it provides guidance on diagnosis, indicates the further useful investigations and above all, it is necessary for the interpretation of immunophenotyping and other tests. The immonophénotyping by flow cytometry is necessary to the diagnosis of lymphocytosis. It confirms the presence of a chronic lymphoproliferative disease and to classify it accurately.

Keywords : Reactive lymphocytosis, chronic lymphoproliferative disease, hemogram, immunophenotyping, flow cytometry.

Laboratoire d' Hématologie
CHU Farhat Hached - Sousse

Introduction

Le plus souvent de découverte fortuite, le diagnostic d'une hyperlymphocytose reste du domaine du laboratoire. Une hyperlymphocytose est définie par une anomalie quantitative de la lignée lymphocytaire (lymphocytes $> 4000/\text{mm}^3$ chez l'adulte, $> 8000/\text{mm}^3$ chez l'enfant). Ces hyperlymphocytoses peuvent être bénignes ou malignes. Qu'elles soient réactionnelles ou malignes, le biologiste intervient en premier lieu pour les qualifier et orienter le clinicien [1,2].

Les deux examens fondamentaux mis en œuvre sont l'hémogramme avec analyse du frottis de sang et l'immunophénotypage par cytométrie de flux (CMF).

Dans les cas difficiles, seront demandés un caryotype et/ou une analyse par hybridation in situ fluorescente (FISH) ; le myélogramme n'a sa place que dans quelques cas particuliers. Dans tous les cas, il faut se confronter à l'histologie (moelle osseuse, rate, ganglion) et s'informer du contexte clinique (état général, rate, ganglion), de l'ethnie du patient, de son statut virologique et des autres données biologiques (Figure 1) [3]. L'objectif de cette revue de la littérature est de définir la meilleure conduite à tenir devant une hyperlymphocytose sanguine.

Exploration des hyperlymphocytoses

En face d'une hyperlymphocytose, le plus important est d'exclure une monclonalité qui signe généralement un processus lymphoprolifératif tumoral, c'est-à-dire l'expansion d'une population de cellules identiques (clone) qui prolifèrent anormalement à partir d'une cellule originelle. Toute la stratégie diagnostique doit être orientée pour exclure cette possibilité. Les deux examens fondamentaux sont l'hémogramme avec analyse du frottis de sang et l'immunophénotypage lymphocytaire [1].

1- L'hémogramme

L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine, étudie les cellules du sang. L'hémogramme est presque toujours fait sur des échantillons de sang veineux, qui est prélevé directement dans des tubes spéciaux contenant un anticoagulant : L'éthylène-Diamine-Tétra-Acétique (EDTA). Cet examen comporte deux études [4] :

Etude quantitative : Elle repose sur le comptage des différents éléments figurés du sang. Le taux des lymphocytes varie selon l'âge (Tableau I).

La sensibilité des automates pour détecter des anomalies est assez bonne, mais ils peuvent être mis en défaut lorsque les cellules diffèrent peu des lymphocytes normaux ou quand les cellules atypiques sont peu nombreuses. En outre, ils manquent de spécificité. En cas d'alarme de l'automate, il convient d'étudier le frottis sanguin.

Etude qualitative : elle est au centre du diagnostic.

L'étalement du sang doit être réalisé à moins de 6 heures après le prélèvement, sur lames dégraissées, à bords rodés et coloré au May-Grünwald-Giemsa. Ceci permet d'orienter le diagnostic, d'indiquer les investigations complémentaires utiles et surtout de procurer un contexte morphologique nécessaire à l'interprétation de l'immunophénotypage et d'autres analyses. L'étude du frottis sanguin permet de renseigner sur la taille lymphocytaire, la coloration et la taille du cytoplasme lymphocytaire, l'existence de granulations cytoplasmiques, le rapport nucléo-cytoplasmique, la régularité de la membrane cytoplasmique, la structure de la chromatine et l'existence ou non de nucléoles.

Morphologie des lymphocytes sur frottis sanguin :

Les lymphocytes d'aspect normal sont de deux types [5] :

- Le petit lymphocyte (Figure 2)

La cellule mesure 6 à 9 μm de diamètre. Le noyau est arrondi ou légèrement ovalaire, parfois réniforme, très dense, violet foncé, composé de masse chromatinienne sombre. Le cytoplasme très réduit souvent peu visible parfois réduit à un mince filet bleu.

- Le grand lymphocyte (Figure 3)

C'est une cellule qui mesure 9 à 15 μm de diamètre. Le noyau est central ou légèrement excentré, les masses chromatiniennes sont disposées en blocs compacts de couleur violet foncé entrecoupés de zones claires. Le cytoplasme est plus étendu que celui des petits lymphocytes, il entoure complètement le noyau, il est clair ou légèrement basophile.

Au cours de l'examen du frottis sanguin, la population lymphocytaire peut présenter des anomalies. L'aspect polymorphe correspond le plus souvent au syndrome

Tableau I : Variation du taux des lymphocytes en fonction de l'âge [3].

	Nouveau-né (cordon)	1 AN	4 ANS	10 ANS	Adulte
Globules blancs (10⁹/L)	18 +/-8	10,5 +/-4,5	10 +/-5	9,0 +/-4,5	7,0 +/-3,0
Valeurs Absolues (10⁹/L)	2 à 11	4 à 10.5	2 à 8	1.5 à 6.5	1 à 4

mononucléosique ; et on parle de lymphocytes atypiques, alors que l'aspect monomorphe traduit un syndrome lymphoprolifératif [3].

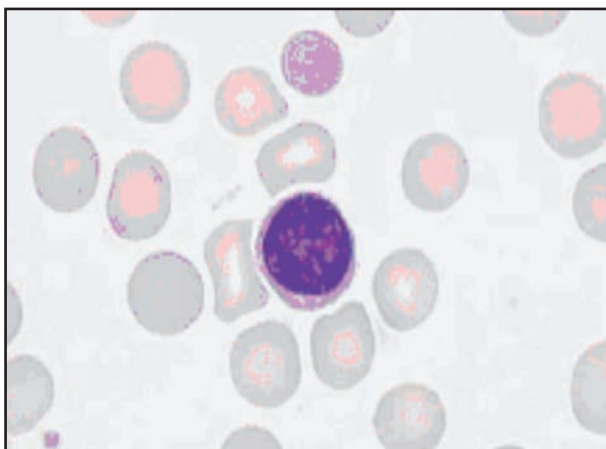


Figure 2 : Aspect du petit lymphocyte sur frottis de sang.

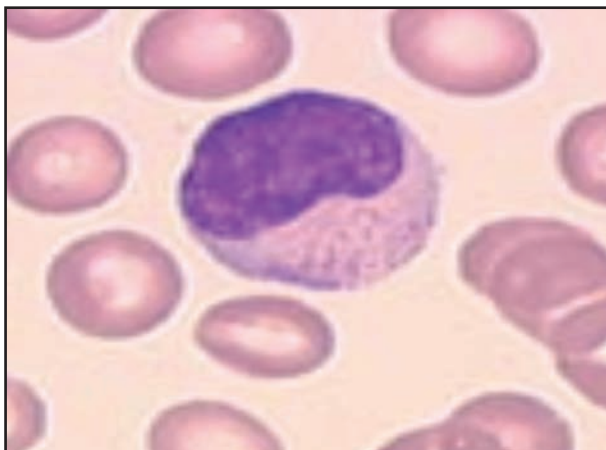


Figure 3 : Aspect du grand lymphocyte sur frottis de sang.

2- L'Immunophénotypage lymphocytaire

La morphologie sur frottis sanguin ne permet pas de distinguer les différentes sous-populations lymphocytaires : Le lymphocyte B et T (support de l'immunité humorale et cellulaire respectivement) et le lymphocyte NK (Natural Killer). En plus, le frottis ne permet pas en partie de préciser exactement la nature de la prolifération au cours des syndromes lymphoprolifératifs, d'où le recours à l'immunophénotypage [3].

Le principe de l'immunophénotypage est basé sur une réaction Antigène-Anticorps. En effet, le but est d'utiliser un Anticorps (Ac) marqué pour rechercher un constituant antigénique (Ag) déterminé dans une préparation. La lecture est effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux. Pour la cytométrie en flux (CMF), les cellules doivent impérativement être en suspension monocellulaire [6,7].

A l'état normal la lignée lymphocytaire de type T est majoritaire (75%) [8].

- Les marqueurs présents sur tous les lymphocytes T sont [9] : Le récepteur T pour l'Ag (TCR) qui est associé au complexe moléculaire CD3 sur la membrane du lymphocyte T, Le CD2, le CD5 et le CD7. Les marqueurs des sous-populations sont :
 - Le CD4 : marqueur des lymphocytes T auxiliaires.
 - Le CD8 : marqueur des lymphocytes T cytotoxiques.
- Les marqueurs d'activation des lymphocytes sont : le CD25, le CD69, le ligand du CD40 et les molécules du CMH-II.
- Les marqueurs présents sur tous les lymphocytes B sont [9] : Le CD79 (CD79a, CD79b), les CD19, CD20, CD21, CD22, CD40, CD32, le récepteur pour l'Ag (BCR) et les molécules CMH-II. Une sous-population

minoritaire de lymphocytes B exprime la molécule CD5, présent sur tous les Lymphocytes T. Ces cellules B CD5 + produisent des auto-anticorps naturels. Les lymphocytes B activés expriment les molécules CD25, CD38 et le CD23.

- Les lymphocytes NK sont CD3-, CD16+, CD56 + qui n'expriment pas de récepteurs spécifiques de l'Antigène [9].

Les Hyperlymphocytoses

1- Définition

Une hyperlymphocytose sanguine est définie par un taux de lymphocytes supérieur à 4000/mm³ chez l'adulte et 8000/mm³ chez l'enfant.

On distingue deux types d'hyperlymphocytose :

- Les *hyperlymphocytoses bénignes* : Le syndrome mononucléosique.
- Les *hyperlymphocytoses malignes* : Les syndromes Lymphoprolifératifs chroniques

2- Etiologies

2-1- Le Syndrome mononucléosique (SMN)

De nombreuses étiologies sont retrouvées, les plus fréquentes sont infectieuses, en particulier la mononucléose infectieuse (MNI). C'est une maladie virale, de transmission essentiellement orale, exceptionnellement sanguine, représente 85% du SMN et qui est très fréquente chez l'enfant. Ce syndrome correspond à la primo-infection par le virus Epstein-Barr virus [10].

La clinique comporte [10] :

- Une phase d'incubation : asymptomatique généralement longue de l'ordre de quatre à six semaines.
- Une phase d'invasion : correspond au début à un syndrome pseudogrippal (une fièvre constante, asthénie, myalgie, courbatures).

Les signes de découverte sont :

- Une angine le plus souvent érythémateuse.
- Des polyadénopathies à prédominance cervicale, bilatérale.
- Une splénomégalie modérée est retrouvée dans les deux tiers des cas.

Sur le plan biologique l'hémogramme montre :

- Une hyperleucocytose modérée (10 à 20.10⁹/L).
- Une hyperlymphocytose : 30 à 90% des globules blancs.
- Le taux d'hémoglobine est le plus souvent normal, parfois on note une anémie hémolytique à auto-anticorps.
- Le taux des plaquettes est normal ou modérément diminué (100.10⁹/L) dans la moitié des cas.

L'examen du frottis sanguin montre le polymorphisme des lymphocytes qui est le signe du SMN : les cellules mononuclées sont de taille inégale, à noyau jeune mais rarement nucléolé et surtout à cytoplasme abondant et bleu. L'hyperbasophilie est prédominante à la périphérie

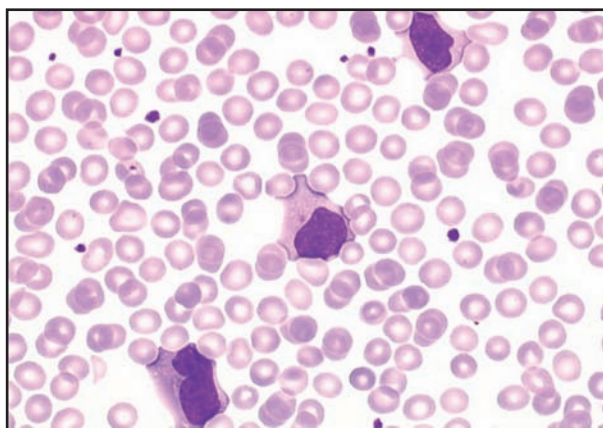


Figure 4 : Cellules mononuclées sur un frottis sanguin au cours d'un syndrome mononucléosique (11).

au contact des globules rouges (Figure 4) [8].

Les examens sérologiques permettent de confirmer l'infection par le virus d'EBV. Différents tests peuvent être utilisés [10] :

- MNI-test : Réaction d'agglutination utilisant des anticorps anti-hématies de cheval sensibilisées par des anticorps polyclonaux anti EBV.
- Réaction de Paul-Bunnell-Davidson : RPBBD.
- Mise en évidence des anticorps anti-EBV : Par méthode immunoenzymatique.

La MNI est une maladie bénigne, la guérison est spontanée avec une immunité excellente, l'asthénie est souvent prolongée mais des complications de type surinfection peuvent se voir.

Le traitement n'est pas spécifique, mais plutôt symptomatique, il est réduit au repos pendant la période fébrile.

D'autres étiologies peuvent être responsable du SMN (la toxoplasmose, l'infection à cytomégalovirus, la primo infection par le VIH, la rubéole, la rougeole, l'oreillon, l'hépatite A et B, la brucellose, la rickettsiose, la syphilis, le paludisme...) [9,10].

2-2- La coqueluche : C'est une maladie infectieuse due à un bacille : *Bordetella pertussis*. Elle est devenue très rare dans les pays où la vaccination est courante. La maladie demeure plus fréquente dans les pays en développement, où elle est encore parfois mortelle. La coqueluche se transmet d'un individu à l'autre (toux, éternuements), souvent par petites épidémies [3].

La clinique comporte :

- *Une phase d'incubation* : silencieuse et elle dure environ une semaine
- *Une phase d'état* : caractérisée par l'apparition d'un écoulement nasale, une fièvre et une toux. Quelques jours plus tard, la toux peut prendre un aspect caractéristique, couramment appelé «chant de coq», souvent suivie d'une pause respiratoire avec cyanose et d'une reprise inspiratoire bruyante.

Sur le plan biologique l'hémogramme montre :

- Une hyperleucocytose
 - Une hyperlymphocytose pouvant atteindre $50000/\text{mm}^3$
- L'examen du frottis sanguin montre la présence de lymphocytes ayant un aspect mature normal avec parfois la présence de cellules à noyau encoché [3].

Le traitement repose sur la prise d'antibiotique, et de calmants de la toux. L'hospitalisation doit être systématique chez les nourrissons de moins de 6 mois et les enfants chez qui on a observé une cyanose [3].

2-3- Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC) : Ils sont classés selon la lignée lymphoïde en SLPC de type T et SLPC de type B. Les SLPC de type T représentent 5% et sont de diagnostic difficile. La démarche diagnostique des SLPC associe l'examen cytomorphologique et immunophénotypique des lymphocytes par CMF. Dans une première étape, il est important de distinguer entre la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et les autres SLPC [12] :

- **La leucémie lymphoïde chronique (LLC) :**

La LLC est une maladie clonale lymphoproliférative au

cours de laquelle les lymphocytes matures s'accumulent dans le sang, la moelle osseuse et souvent dans les nœuds lymphatiques et la rate. Cette maladie touche les patients âgés, elle constitue la leucémie la plus courante dans les pays occidentaux [13].

On distingue deux formes [8,13] :

- *Forme asymptomatique* : L'état général est souvent conservé.
- *Forme symptomatique* : L'examen clinique décèle le plus souvent des adénopathies superficielles cervicales, fermes et indolores, non compressives avec une splénomégalie, une altération de l'état générale avec asthénie, amaigrissement et des sueurs nocturnes.

Le diagnostic biologique repose sur [14-16] :

- **L'hémogramme** : Montre généralement une hyperleucocytose (20 à $50.10^9/\text{L}$) due à une hyperlymphocytose $> 5000/\text{mm}^3$. Cette hyperlymphocytose est monomorphe.
- **L'examen du frottis sanguin** : Les cellules ont l'aspect de lymphocytes matures normaux, mais sont souvent légèrement plus grandes et peuvent avoir tendance à éclater au cours de la réalisation des frottis sanguins conduisant à la formation des ombres de Gümprrecht (Figure 5).

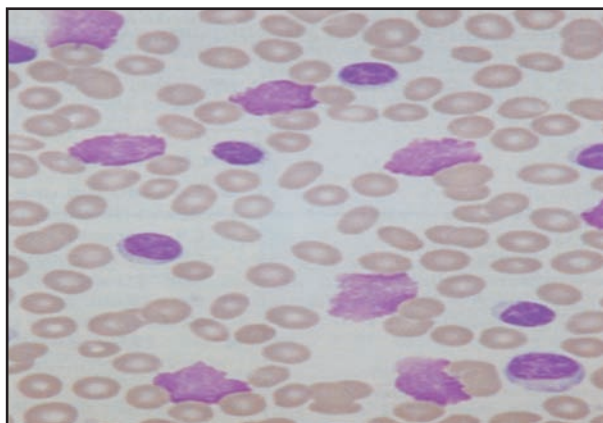


Figure 5 : Cellules de la Leucémie Lymphoïde Chronique sur frottis sanguin (16).

- **L'immunophénotypage** : Les cellules leucémiques portent les marqueurs caractéristiques de la lignée B en particulier le CD 19 et le CD20, ce dernier est faiblement exprimé par rapport aux cellules B normales. Le caractère monotypique de la prolifération est révélé par

l'expression d'une seule chaîne d'immunoglobuline Kappa ou Lambda. Une autre caractéristique est la présence d'un déterminant T : le CD5. Les cellules lymphoïdes expriment aussi le marqueur d'activation ; le CD23. En revanche, le FMC7 et le CD79b sont peu ou pas exprimés. Une fois la monotypie (ou monoclonalité) est définie, on s'intéresse au profil immunologique de cette population monotypique en établissant le score de Matutes qui correspond à un profil immunologique de marqueurs permettant d'affirmer ou d'exclure une LLC quand on a une monotypie B [14]. Les patients peuvent se présenter à un stade précoce et rester par conséquent dans un état stationnaire puis

progresser ou se présenter avec une maladie au stade ultime. Selon les résultats de l'hémogramme et les signes cliniques, la LLC est classée en stades. Ces stades informent sur le traitement à choisir et le pronostic de la maladie [14].

- Les autres SLPC de type B :

Ils sont nombreux, mais les plus fréquents sont : la leucémie prolymphocytaire B (LPL), la leucémie à tricholeucocytes (HCL), le lymphome splénique à lymphocytes Villeux (SLVL), le lymphome des cellules du manteau (LCM) (Figure 6). Ces SLPC sont classés selon leurs caractéristiques cytologiques et phénotypiques (Tableau II, et III) [15,16].

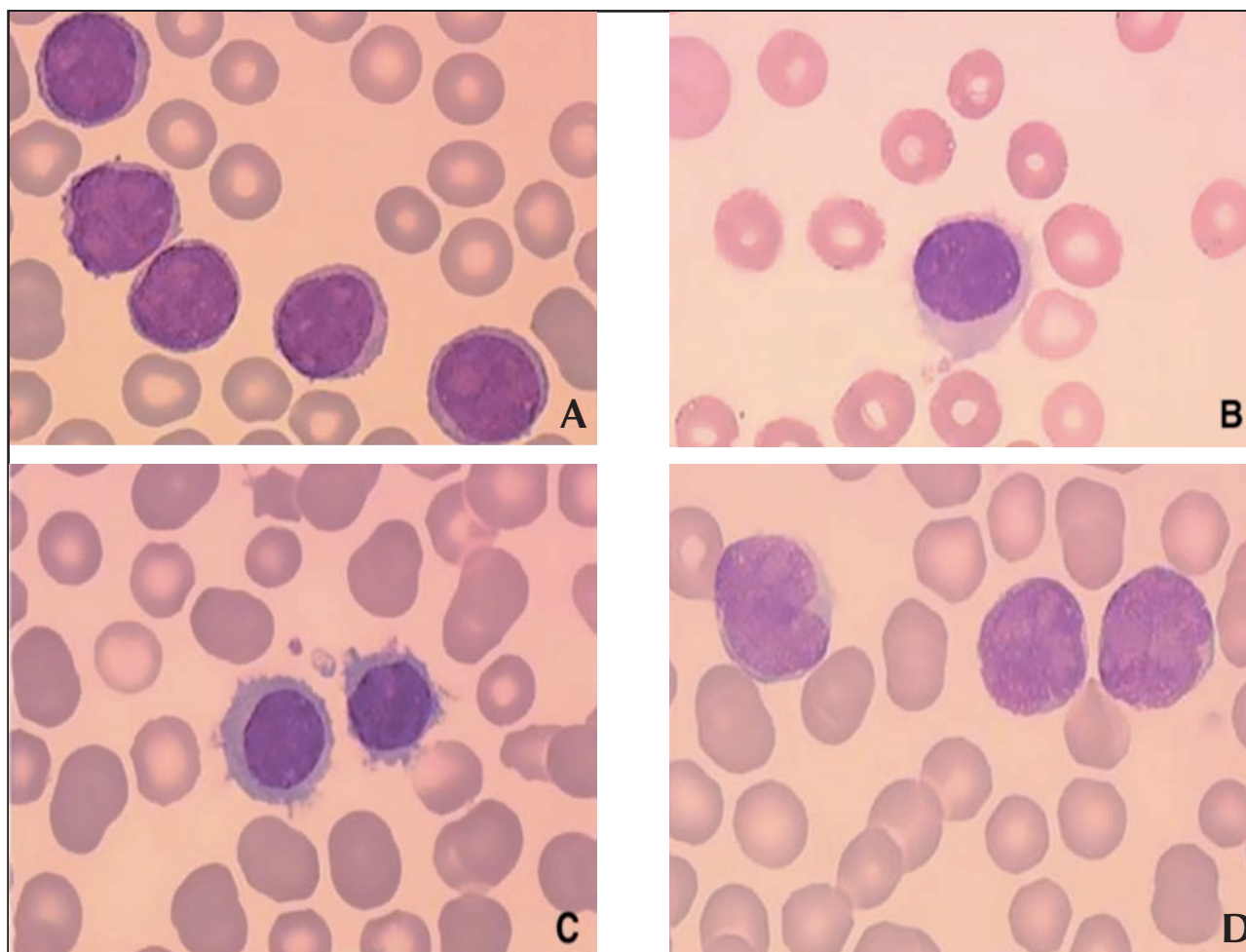


Figure 6 : (A) Leucémie prolymphocytaire, (B) Leucémie à tricholeucocytes, (C) Lymphome splénique à lymphocytes villeux, (D) Lymphome du manteau (16).

Tableau II : Les caractéristiques cytologiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques de type B autres que la leucémie lymphoïde chronique [16].

	Taille de la cellule	Noyau	Cytoplasme
LPL	Grande taille	Noyau à chromatine condensée contenant un nucléole volumineux et unique.	Cytoplasme abondant.
HCL	Grande taille	Noyau souvent excentré, ovale ou arrondi, parfois réniforme, la chromatine nucléaire a un aspect finement dispersé, le nucléole peu ou pas visible de petite taille.	Cytoplasme chevelu étendu, faiblement et irrégulièrement basophile.
SLVL	Petite taille ou moyenne	Noyau arrondi avec chromatine dense.	Le cytoplasme est de basophilie modéré avec présence de villosités polaires caractéristiques.
LCM	Petite taille ou moyenne	Noyau clivé plus ou moins irrégulier avec chromatine dispersé et un nucléole de petite taille bien visible.	Cytoplasme faiblement basophile et peu étendu.

(**LPL**) : Leucémie polymphocytaire, (**HCL**) : Leucémie à tricholeucocytes (**SLVL**) : Lymphome splénique à lymphocytes villeux, (**LCM**) : Lymphome du manteau.

Tableau III : Les caractéristiques phénotypiques des principaux syndromes lymphoprolifératifs chroniques de type B autres que la leucémie lymphoïde chronique [16].

AC \ SLP	Intensité des IgG de surface	CD19	CD22	CD23	FMC7	CD5	CD10	CD25	CD11c	CD103	CD79b
LPL	forte	+	+	-	+	+/-	+/-	-	-	-	+
HCL	forte	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
SLVL	moyenne	+	+	+/-	+	+/-	-	-	+	-	+
LCM	forte	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+

+ : positive dans la majorité des cas.

+ / - : positive dans la minorité des cas.

- : négative dans la majorité des cas.

(**LPL**) : Leucémie polymphocytaire, (**HCL**) : Leucémie à tricholeucocytes (**SLVL**) : Lymphome splénique à lymphocytes villeux, (**LCM**) : Lymphome du manteau

Conclusion

Les hyperlymphocytoses constituent une entité très hétérogène. Elles peuvent être soit bénignes traduisant dans ce cas une simple manifestation réactionnelle, soit maligne traduisant le développement d'un syndrome lymphoprolifératif. La distinction entre ces formes nécessite la mise en œuvre d'une démarche diagnostique bien stratifiée afin de permettre une meilleure prise en charge des patients.

Bibliographie

- 1- Van Den Neste E, Scheiff JM, Michaux L. Approche diagnostique des hyperlymphocytoses. *Louvain Med* 2002 ; 121 : 66-72.
- 2- Lainey E, Boirie M, Fenneteau O. Hémogramme en pédiatrie : variations physiologiques. *Hématologie* 2009 ; 416 : 49-59.
- 3- Carole E. Rôle du biologiste devant une hyperlymphocytose. *Hématologie* 2009 ; 412 : 14-15.
- 4- Imbert M, Jouault H. Les difficultés de validation d'un hémogramme sur automate : indication du recours à des techniques manuelles. *Rev Fran Lab* 2005 ; 371 : 25-32.
- 5- Imbert M. Difficultés de détection et d'interprétation de cellules anormales circulantes. *Rev Fran Lab* 2008 ; 406 : 73-78.
- 6- Dréou B, Fardel O, Fauchet R. La cytométrie en flux : Intérêt dans le diagnostic phénotypique et le suivi des hémopathies malignes. *Ann biol clin* 2002 ; 60 : 663-672.
- 7- Philippe M, Philippe V. Cytométrie et oncologie : approche technique, intérêt, limites et perspectives. *Bull cancer* 2001 ; 8 : 15-22.
- 8- Badoual C, Vingert B, Agueznay N, Adotevi O, Haicheur N, Molina T, Bruneval P, Fridman W, Tartour E. Phénotypes et fonctions des lymphocytes T. *Ann Pathol* 2005 ; 25 : 211-219.
- 9- Horschowski N. Organes lymphoïdes. In Sébahoun G. *Hématologie clinique et biologique*. Paris, Arnette, 2000 : 249-263.
- 10- Choquet S. *Hématologie*. Paris : Ellipses, 2002 : 327.
- 11- [http:// www. Leucémie-espoire.org/Syndrome mononucléosique](http://www.Leucémie-espoire.org/Syndrome_mononucléosique).
- 12- Salaum V, Troussard X. La cytométrie en flux (CMF) dans les syndromes lymphoprolifératifs Chroniques de l'adulte. *Ann Biol Clin* 2001 ; 20 : 30-39.
- 13- Hoffbrand V, Mehta B. *Hématologie*. Paris : Boeck, 2003 : 208.
- 14- Merle-Béral H. Leucémie Lymphoïde Chronique : Biologie et Pronostic. *Rev Franc Lab* 2006 ; 379 : 37-43.
- 15- Troussard X, Cornet E. Leucémie à tricholeucocytes. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2009 ; 24 : 254-260.
- 16- Troussard X. Hémopathies Lymphoïdes d'origine B. *Rev Franc Lab* 2006 ; 379 : 14-22.