

Immunophénotypage lymphocytaire

L'immunophénotypage des lymphocytes circulants utilisant la technique de cytométrie en flux est la méthode de choix pour la classification et le diagnostic différentiel des syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC).

Cette technique est passée dans le domaine de la routine hématologique grâce à la simplification et à l'amélioration des performances des cytomètres en flux associés à la disponibilité de nombreux anticorps couplés à différents fluorochromes permettant une analyse multiparamétrique. Les cellules à analyser sont faciles à recueillir à partir du sang ou de la moelle osseuse. L'utilisation systématique de l'anticorps CD45 a amélioré le repérage des différentes populations, permettant de distinguer les cellules lymphoïdes exprimant fortement le CD45 des cellules blastiques exprimant faiblement le CD45.

L'étude morphologique qui a longtemps occupé une place prépondérante reste le premier temps du diagnostic. Mais si certains SLPC ont une morphologie typique permettant de poser le diagnostic dès l'étude du frottis sanguin, d'autres peuvent poser des problèmes diagnostiques. La morphologie sera alors plus un outil d'orientation nécessitant l'apport de l'immunophénotypage, voire de la cytogénétique et/ou de la biologie moléculaire, pour confirmer un diagnostic.

Dans les pays occidentaux, 90 % des hémopathies lymphoïdes sont de nature lymphocytaire B ; les autres, beaucoup moins fréquentes, sont de nature T ou NK. Diverses classifications ont été proposées au cours des 30 dernières années, qui ont été progressivement remplacées par la classification REAL (Revised European American Lymphoma Classification), publiée en 1994, et plus récemment par la classification proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), qui regroupe l'ensemble des syndromes lymphoprolifératifs et définit pour chaque entité l'ensemble des principales caractéristiques cliniques, morphologiques, immunologiques, cytogénétiques et moléculaires.

Syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

— Morphologie

- La leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) : elle se caractérise par une population monomorphe, constituée de petits lymphocytes matures, au noyau au contour régulier, à la chromatine dense sans nucléole,

au cytoplasme peu étendu. On observe également des cellules abîmées et réduites à des noyaux nus (ombres de Gümprrecht).

- La leucémie prolymphocytaire B (LPL-B) : elle présente une population monomorphe constituée de prolymphocytes, cellules de taille supérieure à celle du lymphocyte normal, un noyau le plus souvent régulier, à la chromatine dense contenant un volumineux nucléole caractéristique de cette cellule, au cytoplasme modérément abondant, discrètement basophile sans grains.
- La leucémie à tricholeucocytes (HCL) : elle est constituée de cellules de taille moyenne à grande, au noyau ovale arrondi ou parfois réniforme, à la chromatine finement dispersée présentant un nucléole petit et peu visible, au cytoplasme abondant, faiblement et irrégulièrement basophile, avec présence de villosités sur tout le pourtour cellulaire. Dans sa forme variante (HCL-V), elle regroupe des caractères intermédiaires entre tricholeucocytes et prolymphocytes.
- Les lymphomes non hodgkiniens B (LNH-B) : le lymphome folliculaire (FL), dans sa forme circulante, est représenté quasi exclusivement par des cellules lymphoïdes de petite taille, au noyau incisé ou clivé, à la chromatine dense, sans nucléole, au cytoplasme très peu abondant, peu basophile :
 - le lymphome des cellules du manteau (MCL) peut revêtir plusieurs aspects : il peut s'agir dans la forme la plus typique de cellules de taille moyenne, au noyau plus ou moins irrégulier, à la chromatine dispersée, présentant un nucléole de petite taille, au cytoplasme faiblement basophile et peu étendu. Il existe un variant particulier appelé « blastique » dont la morphologie se rapproche de celle des lymphoblastes ;
 - le lymphome de la zone marginale (MZL) présente le plus souvent une cytologie hétérogène, associant des images de cellules au noyau arrondi et au cytoplasme abondant et clair, des formes lymphoplasmocytaires, voire plasmocytaires. On peut observer quelques lymphocytes villeux associés, mais leur nombre ne dépasse pas 10 % de la population lymphoïde ;
 - le lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL) se distingue du lymphome marginal classique par son homogénéité ; il se caractérise par la présence de cellules de taille moyenne, au noyau rond, à la chromatine dense, laissant parfois apparaître un petit nucléole, au cytoplasme assez basophile modérément abondant présentant des villosités franches réparties à un ou plusieurs pôles de la cellule.

Tableau 15. Score de Matutes

Marqueurs membranaires	Points	Points
	1	0
IgS (intensité)	Faible	Intermédiaire ou forte
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD79b (intensité)	Négatif ou faible	Fort

— Immunophénotypage

L’immunophénotypage des lymphocytes circulants par cytométrie de flux est indispensable pour faire le diagnostic d’une leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) et des différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. Il permet dans un premier temps de déterminer la nature B des cellules ainsi que leur caractère monotypique. Toutes les cellules B expriment le même isotype de chaîne légère d’immunoglobuline de membrane, alors qu’une population normale se répartit selon un ratio κ/λ de 60/40 %.

Le profil d’expression des marqueurs de membrane détectés par les anticorps monoclonaux détermine le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique B. Un système de score utilisant cinq antigènes, le score de Matutes, a été proposé comme aide au diagnostic de la LLC et permet de différencier les leucémies lymphoïdes chroniques des autres syndromes lymphoprolifératifs B. Le score de Matutes recherche la faible expression de l’immunoglobuline de surface κ ou λ , la présence d’un déterminant T, le CD5, de la molécule d’activation CD23, la faible expression ou l’absence du FMC7 et de la chaîne accessoire du récepteur pour l’antigène, le CD79b.

On attribue une valeur de 1 à chacun de ces paramètres (tableau 15), la LLC se définissant par un score de Matutes supérieur ou égal à 4. Un score égal à 3 correspond généralement à une « LLC atypique ». Un score inférieur à 3 permet d’éliminer une LLC et de caractériser les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.

D’autres marqueurs peuvent s’exprimer sur les cellules B de la LLC, en particulier le CD38, traduisant la part proliférative de la population circulante et lui attribuant une valeur pronostique péjorative.

Le diagnostic des autres syndromes lymphoprolifératifs B avec présence de cellules dans le sang circulant peut être orienté ou confirmé par une analyse comparative de l’expression des différents antigènes de surface

permettant de définir des profils phénotypiques spécifiques (tableau 16).

- Les cellules de la leucémie à prolymphocytes B (LPL-B) expriment les marqueurs pan-B ainsi qu’une immunoglobuline de surface de forte intensité. Le FMC7 est fortement exprimé, le CD23 est classiquement absent et le CD5 d’expression variable.
- La leucémie à tricholeucocytes (HCL) se caractérise par la présence du CD11c, du CD103 et du CD25.
- Le lymphome à lymphocytes villeux (SLVL) exprime le CD11c, mais pas le CD25.
- Les cellules du manteau (MCL) expriment les marqueurs pan-B de même que le CD5. L’absence d’expression du CD23 et la présence du CD79b permettent de les distinguer de la LLC.
- Le lymphome folliculaire (FL) sera évoqué devant une population B monotypique, CD5–, exprimant le CD10.
- Le lymphome de la zone marginale, en l’absence de marqueur spécifique actuellement disponible, se caractérise le plus souvent par un profil « négatif » ; néanmoins, le CD5 est positif avec une intensité variable dans 15 à 20 % de cas, et quelques cas expriment le CD23.

Syndromes lymphoprolifératifs chroniques T

— Morphologie

- La leucémie lymphoïde T à grands lymphocytes granuleux (LGL-T) : elle se caractérise par une population homogène de lymphocytes de grande taille, au noyau plus ou moins régulier parfois excentré, à la chromatine dense, au cytoplasme abondant renfermant d’assez nombreuses granulations azurophiles (5 à 25 par cellule). Cette hémopathie mature T est à distinguer de la leucémie à cellules NK dont la présentation cytologique est très proche.
- La leucémie prolymphocytaire T (LP-T) : elle n’est pas uniforme sur le plan cytologique. Plusieurs aspects morphologiques sont possibles : la forme typique à petites cellules irrégulières, la forme à cellules « en fleur », la forme à cellules sézariformes, et enfin la forme à petites cellules rondes, proche de la LLC classique.
- Le mycosis fongoïde (MF) et le syndrome de Sézary (SS) : ils correspondent à un LNH cutané, se présentant sous une forme localisée (MF) ou une forme plus généralisée (SS). On identifie deux types de cellules de Sézary selon leur taille, petite ou grande, mais leurs caractéristiques nucléaires sont les mêmes : elles ont un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, le noyau pré-

Tableau 16. Immunophénotypage des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

Marqueurs	LLC	LPL	HCL	HCL-V	SLVL	MCL	FL	MZL
Intensité des Ig de surface	Faible	Forte	Forte	Forte	Moyenne	Forte	Moyenne/forte	Moyenne/forte
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+
CD22	–	+	+	+	+	+	+	+
CD23	+	–	–	–	±	–	±	–
FMC7	–	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	±	–	–	±	+	–	–
CD10	–	±	–	–	–	–	±	–
CD25	±	–	+	–	–	–	±	±
CD11c	±	–	+	+	+	–	±	±
CD103	–	–	+	+	–	–	–	–
CD79b	–	+	+	+	+	+	+	+

+ = positif dans la majorité des cas ; ± = positif dans la minorité des cas ; – = négatif dans la majorité des cas.
FL : lymphome folliculaire ; HCL : leucémie à tricholeucocytes ; HCL-V : forme variante de HCL ; LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LPL : leucémie prolymphocytaire ; MCL : lymphome du manteau ; MZL : lymphome de la zone marginale ; SLVL : lymphome splénique à lymphocytes villex.

sente une encoche caractéristique classiquement dite « en coup d’ongle », la chromatine est dense, dépourvue de nucléole.

- La leucémie/lymphome T de l’adulte HTLV-1 (ATLL : *adult T-cell leukemia/lymphoma*) : la population lymphoïde est généralement polymorphe, composée de cellules caractéristiques de taille moyenne, au noyau irrégulier polylobé d’aspect folié (« en fleur » ou « en trèfle »), à la chromatine dense parfois nucléolée, au cytoplasme assez étendu basophile.

– Immunophénotypage

En présence d’une hyperlymphocytose T, CD4 et/ou CD8, il est d’usage de vérifier que l’hyperlymphocytose n’est pas secondaire à une hyperactivation lymphocytaire occasionnée par une infection virale ou un syndrome dysimmunitaire. En l’absence de cause décelable, et en fonction du contexte clinique, la recherche d’une lymphoprolifération T/NK sera alors envisagée. La comparaison du phénotype des cellules lymphoïdes anormales avec celui de lymphocytes normaux permet parfois de mettre en évidence la perte de marqueur ou « trou phénotypique » ou encore phénotype aberrant, très en faveur d’une prolifération anormale. L’établissement du diagnostic reste parfois difficile et peut nécessiter la recherche de clonalité T par des techniques de biologie moléculaire. L’analyse des réarrangements des gènes pour le TCR s’est développée et constitue un instrument diagnostique important. La présence ou l’absence de gènes du TCR réarrangés permet de distinguer les proliférations monoclonales, où les réarrangements sont identiques dans toute la population, et les

Tableau 17. Immunophénotypage des syndromes lymphoprolifératifs chroniques T

	LP-T	LGL-T	LGL-NK	ATLL	MF/SS
CD2	+	+	+	+	+
CD3	+	+	–	+	+
CD 5	+	–	–	+	+
CD7	+	–	–	–	–
CD4	+	–	–	+	+
CD8	–	+	±	–	–
CD57	–	±	±		
CD16	–	±	+		
CD56	–	–	+		
CD25	–	–		+	–
TCRα/β	+	+	–	+	
TCRγ/δ	–	–	–	–	

ATLL : leucémie/lymphome T de l’adulte HTLV-1 ; LGL-NK : leucémie à grands lymphocytes granuleux NK ; LGL-T : leucémie à grands lymphocytes granuleux T ; LP-T : leucémie prolymphocytaire T ; MF/SS : mycosis fungoïde/syndrome de Sézary.

populations polyclonales, où l’on trouve un ensemble de réarrangements différents (tableau 17).

- Le phénotype de la leucémie à prolymphocytes T (LP-T) est celui des lymphocytes T matures post-thymiques, CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, CD4+, et n’exprime pas le plus souvent le CD8 (quelques formes sont CD4+ CD8+ ou CD4–CD8–).
- Le phénotype des proliférations de lymphocytes à grains ou *large granular lymphocytes* permet de distinguer deux entités de pronostics très différents : les proliférations CD3+, CD2+, CD8+, CD4–, CD56–, CD57+ accompagnées d’une neutropénie et d’évolution chronique (LGL-T), et les proliférations CD3–,

CD2+, CD8±, CD56+, CD57-, généralement non accompagnées de neutropénie et d'évolution le plus souvent aiguë (LGL-NK). À noter l'existence de lymphocytoses NK indolentes CD57+.

- Les cellules de Sézary chez des patients ayant un mycosis fongoïde présentent un phénotype particulier CD2+, CD3+, CD5+, très souvent CD4+ et de façon caractéristique une absence d'expression de CD7.
- Le profil phénotypique habituel des ATLL est celui des cellules T matures activées CD2+, CD5+, CD3+, CD4+, CD7-, CD8-, CD25+.

Conclusion

L'analyse de la population lymphocytaire par cytométrie en flux est devenue un outil essentiel pour le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs. L'analyse est rapide et en général facile pour les lymphoproliférations B, avec la mise en évidence d'une restriction

dans l'expression de l'isotype des chaînes légères d'immunoglobulines de surface. Elle apparaît beaucoup plus complexe pour les lymphoproliférations T, car il n'existe aucun paramètre phénotypique déterminant.

La cytométrie en flux n'est pas une technique destinée à remplacer l'étude morphologique des cellules : ces deux approches sont complémentaires. De plus, dans un certain pourcentage de cas, l'approche diagnostique combinée doit être confirmée par une caractérisation cytogénétique et/ou moléculaire.



Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ml, et al.
A revised european-american classification of lymphoid neoplasms : a proposal from the International Lymphoma Study Group. S Blood 1994 ; 84/ 5 : 1361-1392.

Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, Morilla AM, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D.
Improvement of the chronic lymphocytic leukaemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b).
Am J Clin Pathol 1997 ; 108 : 378-382.

Ronot X, Grunwald D, Mayol JF, Boutonnat J.
La cytométrie en flux.
Paris : Éditions Tec & Doc, 2006 ; 457 p.