



UNIVERSITY SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BOIOLOGIE

Projet de Fin D'études

Licence Sciences & Techniques

**Sciences Biologiques Appliquées et santés
(LST-SBAS)**

SYNDROME DE SEZARY

Présenté par : El arabi Chaimae

Encadré par : Pr Ouhmidou Bouchra (FST Fès)

Pr Tlamçani Imane (Laboratoire Hématologie)

Soutenu le : 08/07/2021

Devant le jury composé de :

- **Pr Ouhmido Bouchra**
- **Pr Elabida kaouakib**
- **Pr Tlamçani Imane**

Stage effectué à: Centre Hospitalier Universitaire Hassan 2

Année universitaire 2020-2021

DEDICACE :

Je tiens à dédier ce travail

✓ *A ma petite famille :*

Aucune dédicace ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous.

Vos sacrifices, vos prières, votre soutien aussi bien moral que matériel, vos encouragements et votre aide précieuse ne cessent de m'impressionner. Que Dieu tout puissant vous protège et vous procure santé et longue vie.

✓ *A mes enseignants:*

Je serais vaniteuse si je devais énumérer en quelques lignes vos remarquables qualités humaines et professionnelles. Trouvez dans ce travail ma gratitude pour tout votre savoir-faire qui m'a guidée dans mon travail, votre soutien et vos encouragements.

✓ *A mes amis:*

Pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble. Avec mes souhaits d'un avenir plein de joie et de succès pour tous

.

A tous ceux qui m'ont aidée de près ou de loin.

REMERCIEMENT :

J'ai tenu à exprimer mes remerciements et mes profonds sentiments de gratitude à :

MON DIEU qui m'a donné la force pour supporter les difficultés que j'ai affrontées pour arriver à ce projet.

MR. SAÏD HALOTI coordinateur de la filière Sciences Biologiques Appliquées et Santé, qui était très disponible tout au long de la formation.

DR. IMANE TLAMÇANI Professeur en Hématologie « CHU Fès » qui m'a donné l'opportunité de développer mes connaissances Techniques et pratiques.

PR. OUHMIDOU BOUCHRA pour son aide précieuse dans le but d'accomplir ce travail dans les meilleures conditions et pour la richesse et la grande valeur de ses propositions et ces directives et qui n'a jamais hésité à enrichir mes connaissances.

PR. EL ABIDA KAOUAKIB d'avoir accepté de consacrer une partie de son précieux temps à examiner ce modeste travail. Mes remerciements s'adressent aussi à toute l'équipe administrative et pédagogique de la F.S.T de FES où j'ai acquis, développé et perfectionné mes compétences.

Table des matières :

Liste des abréviations

Liste des tableaux et figures

Présentation de la structure d'accueil

Partie 1 : Etude bibliographiques :

INTRODUCTION.....1

I.	Généralité sur lymphome cutané primitif à cellule T.....	2
II.	Syndrome de sézary	2
	1. Historique.....	3
	2. Physiopathologie.....	4
	3. Epidémiologie.....	6
	4. Cytologie.....	7
III.	Diagnostic	8
	1. Les critères de diagnostic	8
	2. Clinique.....	9
	3. Biologique.....	10
	♦ NFS.....	10
	♦ Frottis sanguin.....	11
	♦ Immunophénotypage par cytométrie en flux	12
IV.	Rôle du KIR3DL2 /CD158.....	13
V.	Traitement.....	15

Partie 2 : Matériel et Méthodes

1.	Cytologie.....	17
2.	Cytométrie en flux.....	19
3.	Autres analyses	20

CONCLUSON

23

BIBIOLGRAPHIE.....

24

Liste des Figures :

Figure 1 : structure de laboratoire d'analyse médicale.

Figure 2 : Cellule de Sézary en Microscope Optique.

Figure 3 : Cellule de Sézary en Microscope électronique.

Figure 4: les cytokines sécrétées par CS et leurs effets.

Figure 5 : Rôle du microenvironnement cutané dans la progression de MF/SS.

Figure 6 : les cellules de sézary (Frottis sanguin coloré au MGG, fort grossissement)

Figure 7 : Les caractéristiques cliniques de SS.

Figure 8 : « Faciès léonin » chez des patients atteints de SS.

Figure 9 : Autre signes clinique de SS.

Figure 10 : Cellules de Sézary de petite et grande taille. Coloré au MGG.

Figure 11 : Structure de KIR3DL2.

Figure 12 : Automate system XT 5000.

Figure 13 : les étapes de réalisation d'un frottis sanguin.

Figure 14 : Un cytomètre Cytomics FC500.

Figure 15 : pipette graduée et tube de la vitesse de sédimentation

Figure16 : photo decassette du groupage ; la plaque du groupage.

Figure 17: l'appareil Sysmex CS-5100.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification des CTCL d'après « Classification OMS 2008 Des Lymphomes T cutanés primitifs ».

Tableau 2: Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisent.

Liste des abréviations :

Abréviation	Signification
CTCL	Cutaneous T-cell lymphoma.
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer.
ISCL	International Society of Cutaneous Lymphomas.
MF	Mycosis fongoïde.
SS	Syndrome de sézary.
BOM	biopsie ostéo-médullaire.
MGG	May Grunwald and giemsa.
NCI	National Cancer Institut.
MFCG	Mycosis fungoïde cooperative.
TNM	Tumor Nodes Metastasis.
CS	Cellule de sézary .
IL	Interleukine.
EDTA	L'acide éthylène-dianine tétraacétique.
VS	Vitesse de sédimentation.
TCA	Taux céphaline active.

Présentation de la structure d'accueil :

Les travaux de construction du CHU Hassan II de Fès ont démarré fin Novembre 2001 et c'est en janvier 2009 que le nouveau complexe hospitalier a été inauguré par SM le Roi Mohamed VI .

Cet édifice sanitaire, prévu pour répondre aux besoins de plus de quatre millions D'habitants ((Régions Fès Boulemane, Meknès-Tafilalet et Taza-Al Hoceima-Taounate)), a Pour objectif d'améliorer le taux de couverture médicale de cette population et de décongestionner les structures sanitaires déjà existantes dans ces régions.

Le matériel médical haut de gamme dont est doté le CHU Hassan II (pharmacie avec Gestion informatisée et automatisée des médicaments, blocs opératoires multimédias avec télé-médecine appareils de radiologie sophistiqués...) permet d'offrir aux patients les meilleurs soins et de garantir aux étudiants et aux stagiaires un cadre d'apprentissage adéquat.

Ce complexe comprend :

Un hôpital de spécialités

Un hôpital mère enfant

Un bloc opératoire

Une salle de diagnostic

Un pavillon de consultation externe

Le laboratoire centrale d'analyse est situé au bâtiment J et comporte plusieurs

Spécialités d'analyses médicales :

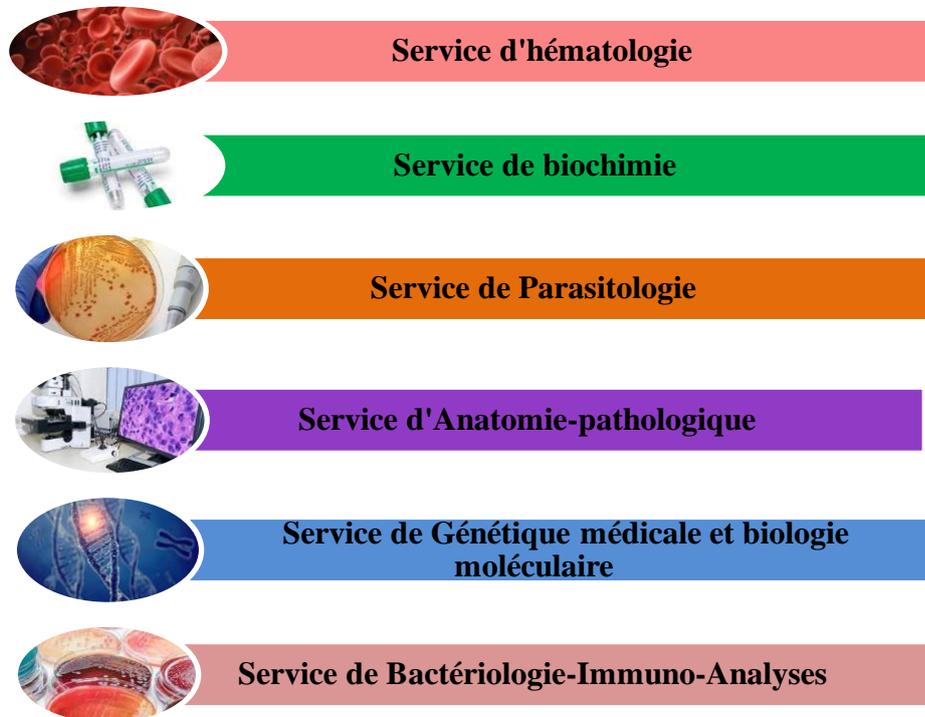


Figure 1 : structure de laboratoire d'analyse médicale

Notre stage s'est déroulé au sein du service d'Hématologie dont le rôle est de faire des analyses de toutes sortes concernant LE SANG.

Le service se divise en 4 Unités :

Unité d'immunoHématologie : Spécifique pour (VS, Combs Rai, ABO groupage).

Unité d'Hémostase : Spécifique pour (TCA, TP, recherche des facteurs de coagulation)

Unité Hémogramme : Spécifique pour (NFS, Frottis sanguin)

Unité cytométrie en flux



INTRODUCTION

Le syndrome de Sézary (SS), est un lymphome cutané à cellule T Primitif. Il Constitue avec le Mycosis fongoïde, la papulose lymphomatoïde, le lymphome cutané primitif anaplasique à grandes cellules. Ils constituent un groupe hétérogène appelé lymphome cutané à cellule T(CTCL).

C'est un type leucémique très rare des CTCL, caractérisé par une érythrodermie très prurigineuse et d'adénopathies disséminées, avec la présence dans le sang périphérique de cellules mononuclées "monstrueuses" appelées « cellule de sézary».Cela constitue l'un des éléments du diagnostic de SS. Il est le seul CTCL qui affecte systématiquement à la fois la peau et le sang.

C'est une pathologie qui touche l'adulte préférentiellement âgé de plus de 60 ans, avec une prédominance masculine. Il s'agit d'un lymphome très agressif, avec un pronostic sombre et une survie médiane d'environ 36% à 5ans (1). Actuellement, son diagnostic est bien codifié avec le système ISCL/EORTC et nécessite une corrélation clinicopathologique et moléculaire précise (2).

La cause exacte de cette maladie, qui demeure jusqu'à présent une maladie incurable et mortelle, reste largement inconnue.

Son pronostic sombre est majoré par l'absence de ressources thérapeutiques efficaces.

Dans ce cadre, nous avons mené un stage au sein du laboratoire d'analyse médical CHU Hassan II Fès durant une période d'un mois et demi, dans le but de déterminer les différentes technique pour diagnostiqué le syndrome de sézary.

I. Généralité sur lymphome cutané primitif à cellule T:

C'est un groupe hétérogène de tumeurs à cellules T impliquant la peau, dont la majorité peut être classée comme (le mycosis fongoïde, le SS). Ce groupe constitue 75 à 80% de tous les lymphomes cutanés primitifs. Parfois appelé cancer de la peau (1).

Les CTCL sont des maladies rares plus fréquentes chez les hommes que chez les femmes. Ils apparaissent plus souvent chez les patients âgés de plus de 50 ans. Il est important de savoir également que le syndrome CTCL n'est pas contagieux (1).

Certains lymphomes cutanés primitifs, tels que mycosis fongoïde et SS peuvent s'étendre au sang.

Les travaux de recherches les plus récents indiquent que les patients diagnostiqués à des stades précoces du CTCL le plus fréquent à savoir le MF (qui constitue environ 70 % du CTCL) ont une espérance de vie normale. Les avancées de la recherche permettent aujourd'hui aux médecins de proposer toute une gamme d'options thérapeutiques souvent efficaces. (1)

II. Syndrome de Sézary :

1. Historique :

Le syndrome de Sézary appartient à la famille des lymphomes cutanés primitifs (LCP) d'origine lymphoïde T (2), La première description fut faite par **Albert Sézary** En 1938. . il a décrit un syndrome particulier chez une femme âgée de 58 ans associant une érythrodermie généralisée très prurigineuse et œdémateuse, à des adénopathies superficielles, avec la présence dans le sang périphérique de cellules mononuclées «Monstrueuses» portant son nom "cellules de Sézary" (Figure 2). (3)

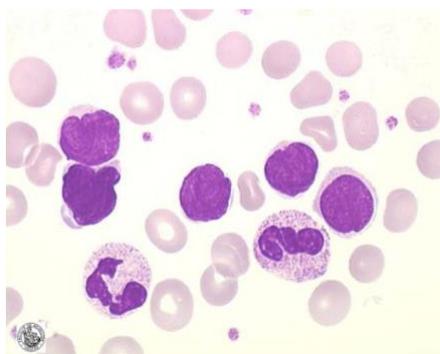


Figure 2 : Cellule de Sézary en Microscope Optique

En 1961 une description plus précise de ces cellules fut réalisée par **Taswell et Winkelmann** (4). Ils décrivent l'aspect cérébriforme et convoluté très caractéristique du noyau de la cellule de Sézary qui sera confirmé En 1968 par **Lutzner** grâce à la microscopie électronique (3).(Figure 3)

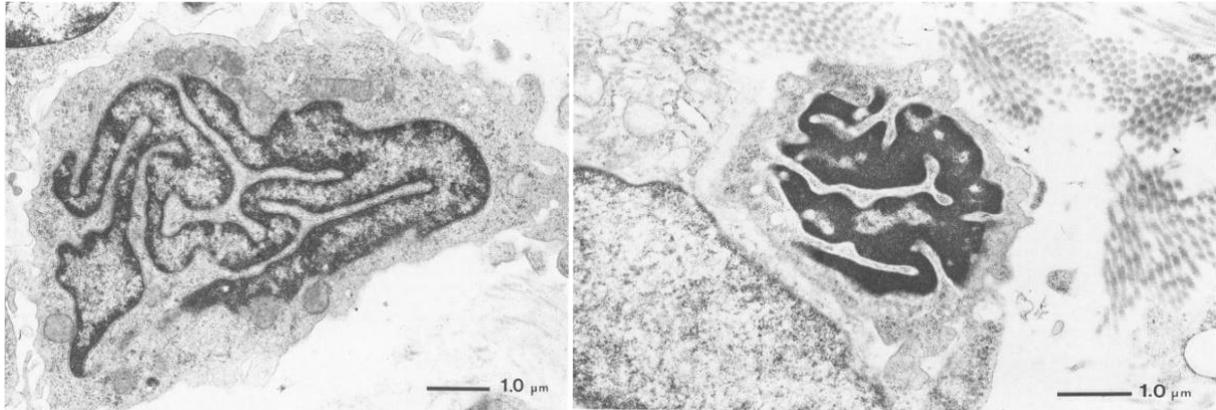


Figure 3 : Cellule de Sézary en Microscope Optique

Cet aspect particulier est dû d'après **Main et Goodl**, à la division nucléaire d'un grand Lymphocyte n'ayant pas subi de division cytoplasmique (5).

En 1973, **Lutzner** décrit d'autre part, l'existence d'une variante de taille plus petite (10 à 12 μ de diamètre) semblables à des lymphocytes normaux à l'opposé des « cellules monstrueuses » décrites par **Sézary**, faisant plutôt 12 à 20 μ . Et c'est En 1973 que **Brouet** montra que les cellules de Sézary sont en fait des lymphocytes T (3).

Avec le développement des techniques pouvant affirmer la nature T des lymphocytes, le terme de CTCL (*Cutaneous T-Cell Lymphomas*) fut proposé en 1975 afin de regrouper mycosis fongoïde, syndrome de Sézary et autres lymphomes T primitifs ayant une origine cutanée et dont les caractéristiques se chevauchaient d'ailleurs fréquemment (5).

Trois ans plus tard, ce terme fut officiellement approuvé par le NCI (*National Cancer Institut*) et le MFCG (*Mycosis Fungoides Cooperative Group*) qui ont développé

la première classification basée sur le schéma TNM (*Tumor Nodes Metastasis*) pour les lymphomes T cutanés (3).

2. Physiopathologie

La physiopathologie des lymphomes cutanés dont fait partie le syndrome de sézary est encore mal connue. Ces lymphomes sont constitués de lymphocytes matures T mémoires à tropisme cutané, qui est conféré par l'expression à leur surface de marqueurs spécifiques tels que le CLA (cutaneous lymphocyte antigen) qui interagit avec le récepteur E-Selectin présent dans les veinules post-capillaires du derme. Ces lymphomes T sont habituellement recrutés dans la peau, lors d'infections cutanées, afin de préparer une éventuelle réponse immunitaire spécifique. (6)

Il apparaîtrait que l'oncogénicité des lymphomes cutanés serait due à des dysrégulations immunitaires, notamment à un déséquilibre de la balance des cytokines. : Un excès de production des cytokines correspondant au profil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), inhiberait l'action des cellules NK, des cellules dendritiques, et des lymphocytes T CD8, et conduirait à une forte diminution de l'apoptose et à l'accumulation dans la peau de ces lymphocytes T mémoires qui se multiplient de manière clonale. (6)

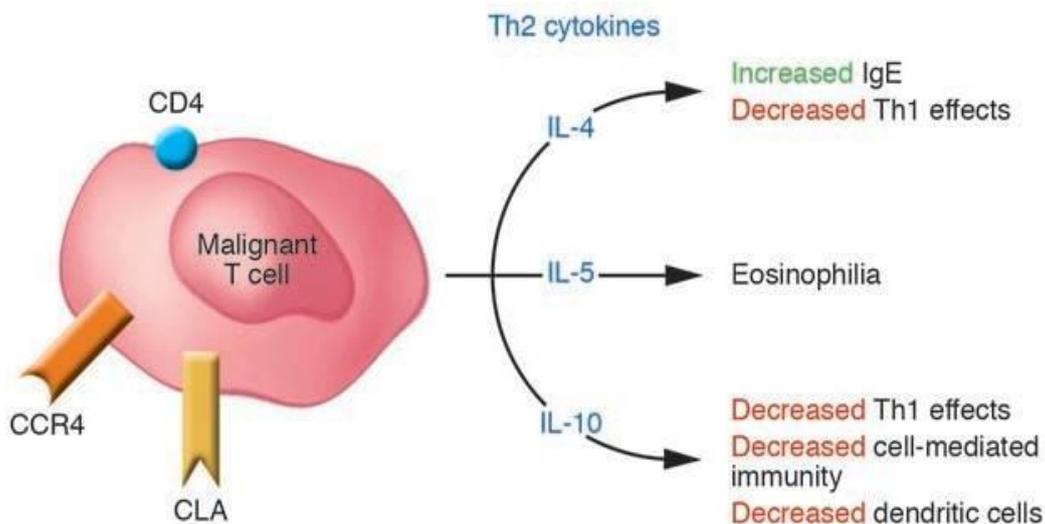


Figure 4 : les cytokines sécrétées par CS et leurs effets

Conséquences de la production de cytokines des lymphocytes T malins. Dans le SS, le lymphocyte T malin (CD4⁺/CLA⁺/CCR4⁺) produit les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 qui entraînent une prédominance Th2 et de multiples anomalies subséquentes de L'immunité Cellulaire. (7)

Ces dysrégulations immunitaires, pourraient expliquer le développement d'infections opportunistes chez les patients atteints de lymphomes cutanés, ces infections représentant d'ailleurs la première cause de décès dans cette pathologie.

Ces données physiopathologique, ont permis d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de SS : des traitements immunorégulateurs visant à rétablir un équilibre dans la balance des cytokines (Th1 /Th2). (6)

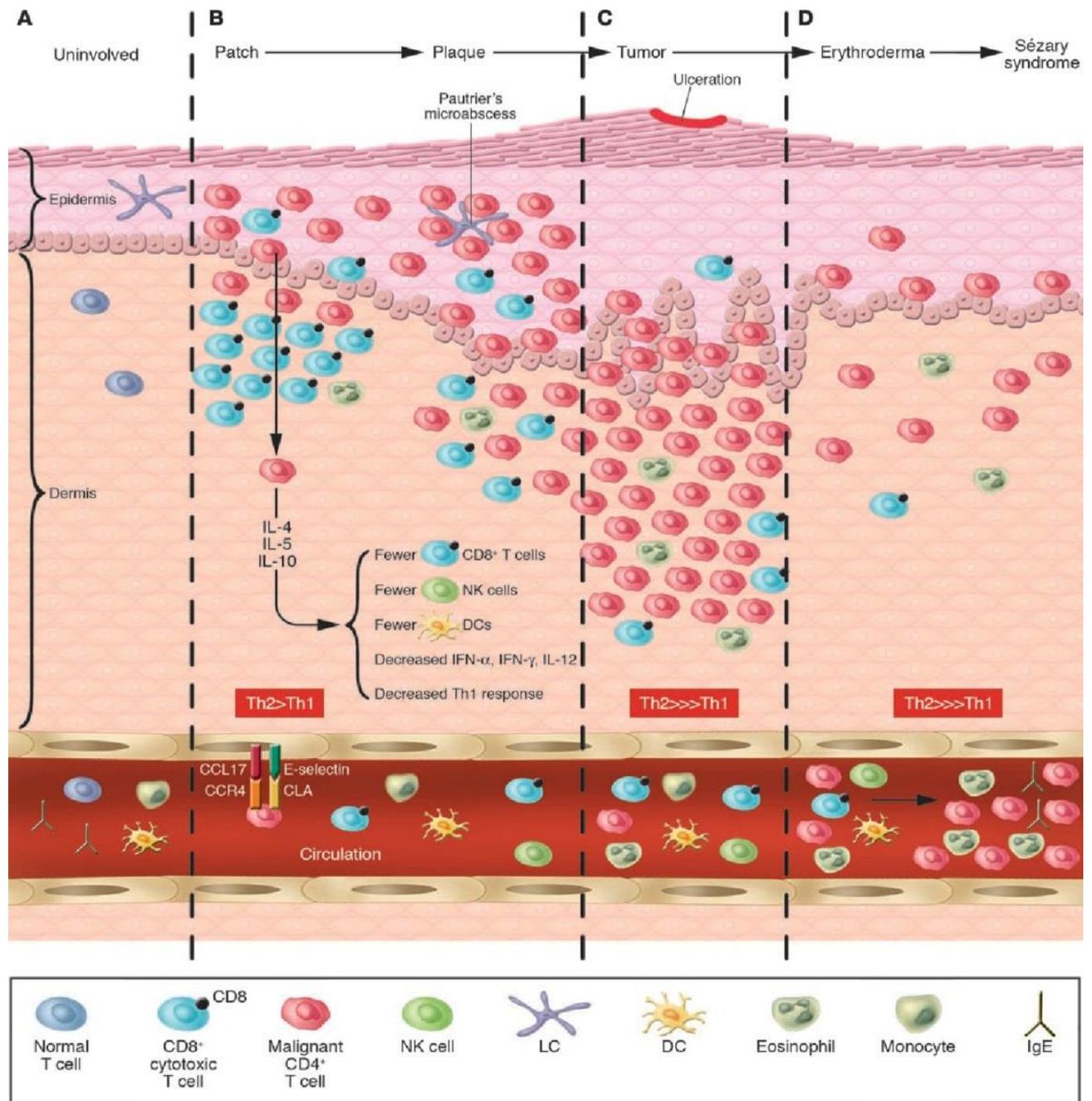


Figure 5 : Rôle du microenvironnement cutané dans la progression de MF/SS.

(A) Peau normale présentant des cellules de Langerhans résidentes dans l'épiderme et des cellules T de la peau dans le derme et la circulation.

(B) Patch et plaque MF dans lesquels les cellules T malignes CD4⁺ se logent dans l'épiderme et se rassemblent autour des cellules de Langerhans. Il est à noter qu'à ces stades, l'infiltrat épidermique et dermique contient fréquemment des cellules CD8⁺ T abondantes dans le cadre de la réponse immunitaire de l'hôte.

(C) Tumeur MF dans laquelle la tumeur occupe le derme et le tissu sous-cutané et se compose principalement de cellules T malignes et de quelques cellules T CD8⁺.

(D) MF et SS érythrodermiques avec des cellules T malignes circulantes détectables qui élaborent des cytokines Th2 qui affectent le nombre et la fonction des cellules CD8⁺ T, des cellules NK et des DC, et par conséquent, la réponse immunitaire de l'hôte.

3. Epidémiologie :

Le syndrome de Sézary est un lymphome T cutané très rare, il représente 2 à 3% de L'ensemble des (CTCL) regroupés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**). (3)

<i>classification</i>
Mycosis fongoïde MF MF, variants et sous types MF folliculotrope Lymphome pagétoïde (Woringer-Kolopp) Lymphome chalazodermique (GSS) Syndrome de Sézary Leucémie / lymphome T de l'adulte Lymphoproliférations CD30+ Lymphome cutané à grandes cellules anaplasiques Papulose lymphomatoïde Lymphome sous cutané à type de panniculite Lymphome T cutané à cellules NK de type nasal Lymphome T cutané périphérique SAI

Tableau 1 : Classification des CTCL d'après « Classification OMS 2008 des Lymphomes T cutanés primitifs ». (5)

Des études épidémiologiques réalisés sur la base des données incluses dans les registres néerlandais et autrichiens des lymphomes cutanés entre 2002 et 2017, révèlent une grande diversité dans la prévalence et la survie à 5 ans des différents types et sous-types

des lymphomes cutanés. (3)

4. Cytologie :

On trouve dans le sang de ces patients des cellules lymphoïdes atypiques appelées cellules de sézary. Ces cellules peuvent être de petite (8 à 10µm) ou de grande taille (15 à 20 µm), mais ont toutefois des caractéristiques communes. Le noyau de la cellule de sézary est irrégulier, avec des sillons étroits et profonds, qui donne son aspect cérébriforme. La chromatine du noyau est assez dense, et l'on ne retrouve pas de nucléole.

Le cytoplasme est peu abondant, ce qui donne un rapport nucléocytoplasmique élevé.

Les cellules de sézary ne sont que rarement détectées par les automates de cytologie, ce qui rend indispensable l'examen microscopique du frottis sanguin, pour un patient présentant des signes cliniques évocateurs d'un syndrome de Sézary. (6)

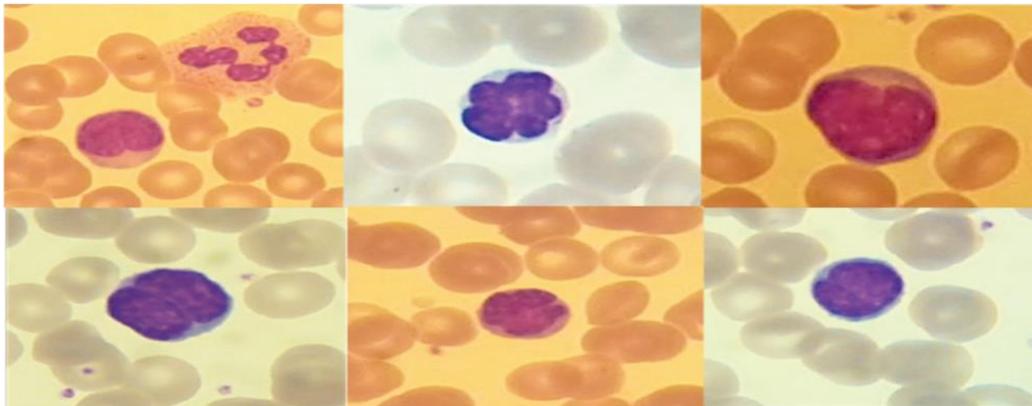


Figure 6 : les cellules de sézary (Frottis sanguin coloré au MGG, fort grossissement)

Malgré cette description l'apport de la cytologie dans le diagnostic du syndrome de sézary pose quelques problèmes, et cela pour plusieurs raisons :

Premièrement, à côté des cellules de sézary typiques se trouvent des cellules qui sont beaucoup moins et que l'on ne compte pas comme telles, ce qui conduit systématiquement à une sous-estimation du nombre de cellules de sézary circulants, voire à un diagnostic faussement négatif.

Deuxièmement, la description que l'on a faite des CS nécessite une technique optimale de frottis et de coloration. (6)

III. Diagnostic :

Le diagnostic du SS est souvent difficile et retardé, car les caractéristiques clinicopathologiques de SS peuvent imiter des dermatoses inflammatoires bénignes, expliquant son pronostic sombre majoré par l'absence de ressources thérapeutiques efficaces. La survie globale des malades à 5 ans varie entre 24% à 43%, avec un taux allant de 55,8 %, lorsque le nombre de cellules de Sézary circulantes est inférieur à 2600 /mm³, à 11,6 % quand le nombre de cellules de Sézary est supérieur à 2600 par Millimètre cube. (3)

1. Les critères de diagnostic :

L'ISCL et l'EORTC définissent le syndrome de Sézary, par la présence d'érythrodermie comme critère obligatoire et au moins deux des critères biologiques suivants (3) :

- Une numération absolue des cellules de Sézary circulantes d'au moins 1000 cellules/mm³ sur le frottis sanguin.
- La démonstration d'une anomalie immunophénotypique, soit un rapport lymphocytaire CD4/CD8 supérieur à 10 (dû à une expansion de la population CD4+ concomitamment à la diminution de la masse des lymphocytes T CD8+) et/ou une perte ou une expression aberrante des marqueurs pan cellulaires T en cytométrie de flux (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 ou CD26).
- La mise en évidence d'un clone cellulaire T sanguin détecté par Southern blot ou PCR.
- La mise en évidence d'anomalies chromosomiques du clone T tumoral.

Ces critères biologiques diagnostiques recommandés et admis par l'ISCL, ont permis une investigation diagnostique suffisamment rigoureuse, pour éviter les erreurs de diagnostic lorsque les études anatomopathologiques ne parviennent pas à établir le diagnostic de SS avec certitude. Et ce qui a permis de mieux définir le SS et de le séparer des autres variantes érythrodermiques des CTCL, comme le mycosis fongoïde (MF), en particulier le MF érythrodermique. (3).

2. Clinique :

Le SS est caractérisé Cliniquement par l'apparition rapide d'une érythrodermie, érythème par tout le corps avec parfois quelques espaces réservés bien limités de peau saine (**Figure 7/ A**), très prurigineuse, s'associe à des adénopathies diffuses (8).

Les symptômes apparaissent généralement de novo dans un intervalle de temps restreint, mais peuvent être précédés de prurit isolé ou d'une dermatite non spécifique (**Figure 7/B**).

Dans des rares cas, les caractéristiques cliniques et pathologiques de SS peuvent être précédées de mycosis fongoïde (**Figure 7/C**), et la Société internationale des lymphomes cutanés (ISCL) recommande que ces cas soient désignés comme "SS précédés de MF" pour les distinguer de la présentation typique de SS (3).



Figure 7 / A : Érythrodermie ; 7 / B : forme de dermatite atypique du SS précoce



7/C : Mycosis fungoïde-like pour le syndrome de Sezary précoce

L'infiltration cutanée peut être très importante, avec un œdème et un épaississement marqué de la peau du visage, ce qui peut produire ce qu'on appelle « le faciès léonin » (Figure 8), qui est communément observé dans le SS.



Figure 8 : « Faciès léonin » chez des patients atteints de syndrome de Sézary

L'atteinte ganglionnaire est fréquemment retrouvée dans le SS ; mais seules les adénopathies de taille > 1.5 cm ou cliniquement palpables sont prises en compte.

Une dissémination métastatique avec infiltration de divers organes (foie, rein, poumon, système nerveux) est assez fréquente, la splénomégalie est considérée comme envahissement viscéral sans besoin de confirmation histologique. La moelle osseuse peut être envahie mais l'infiltration est souvent modérée, diffuse et interstitielle (3).

D'autres signes cliniques y sont fréquemment associés, surtout dans les stades évolués de la maladie (caractéristiques cliniques secondaires à l'érythrodermie chronique) :

une kératodermie palmoplantaire (figure 9 /A), un ectropion (figure 9 /B)

.En outre, les patients peuvent signaler des tremblements et des troubles de la thermorégulation, sous forme d'une sensation de brûlure ou de frissons sur la peau. (3)



Figure 9 /A : kératodermie douloureuse ; 9/B : perte de cheveux et ectropion

3. Biologique :

- NFS :

La numération formule sanguine est un examen biologique de base à effectuer en cas de suspicion de SS, elle doit être complétée obligatoirement par un frottis sanguin.

C'est un test non spécifique, ayant surtout des implications pronostiques. Un nombre élevé de globules blancs, une hyperlymphocytose et une hyperéosinophilie ont été associés à une progression accrue de la maladie et un mauvais pronostique.

Elle est souvent normale au moment du diagnostic de SS et la formule leucocytaire ne montre pas constamment une hyperlymphocytose, même quand le nombre de cellules de Sézary dépasse 1000 /mm³. De ce fait même une lymphocytose très modeste devrait inciter à envisager le diagnostic de SS chez des patients présentant des signes cliniques évocateurs. Cependant, parfois on peut retrouver une anémie normochrome normocytaire, ou rarement une hyperéosinophilie sanguine, ainsi des cytopénies sévères peuvent également être

Constatés. C'est un signe d'atteinte de la moelle osseuse, et une indication pour un myélogramme et une BOM (biopsie ostéo-médullaire) (3).

- **Frottis sanguin :**

Le diagnostic biologique de SS repose sur la mise en évidence de cellules de Sézary sur le frottis sanguin coloré au MGG. Il permet d'identifier deux types de cellules de Sézary selon leur taille: les cellules de Sézary de petite taille ($< 12 \mu\text{m}$) (figure 10 /A) et les cellules de Sézary de grande taille ($> 12 \mu\text{m}$) (figure 10 /B), mais qui présentent les mêmes caractéristiques nucléaires, principalement l'aspect caractéristique du noyau avec un rapport nucléo cytoplasmique élevé : chromatine mature assez dense, plus claire que celle d'un lymphocyte, dépourvue de nucléole, présentant un ou deux sillons profonds dits « en coup d'angle » et conférant au noyau un aspect cérébriforme (3) (8).

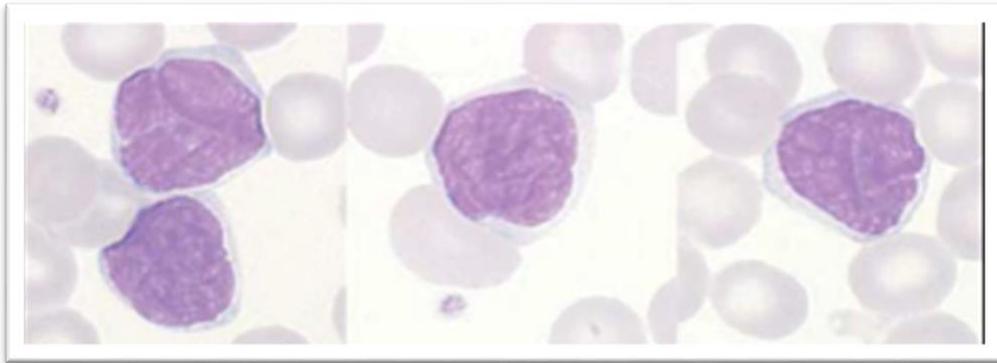


Figure 10 /A : Cellules de Sézary de petite taille. Coloration au MGG.

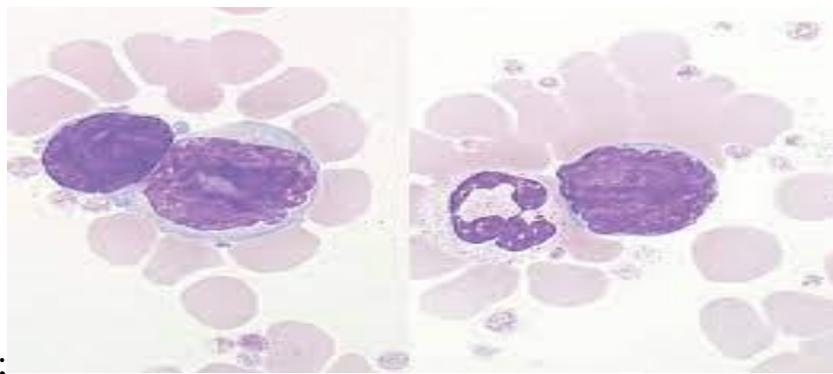


Figure 10/B : Cellules de sézary de grand taille .coloration au MGG.

Il est important de noter que la détection morphologique des cellules de Sézary dans le sang périphérique à elle seule n'est pas un élément de diagnostic spécifique au SS, et il n'existe pas de consensus international sur le pourcentage minimum des cellules de Sézary circulantes permettant de porter le diagnostic de syndrome de Sézary. Seule la Société internationale des lymphomes cutanés (ISCL) recommande de ne retenir pour ce diagnostic que des valeurs de cellules de Sézary circulantes supérieures à 1000/mm³ en nombre absolu, puisque la présence d'un pourcentage peu important de cellules de Sézary dans le sang n'a pas une grande spécificité, cependant de véritables SS avec des cellules de Sézary circulantes < 1000/mm³ ont été décrits par Olsen et Vonderheid. (8)

Finalement, l'identification et la quantification des cellules de Sézary sur frottis sanguin restent dépendantes de la qualité de l'observateur et de sa capacité à les différencier de divers aspects morphologiques proches, surtout quand leur nombre est faible. Donc pour un patient présentant des signes cliniques évocateurs d'un syndrome de Sézary, un examen microscopique attentif du frottis sanguin est indispensable, et il faut alors interpréter le résultat avec prudence et associer à l'étude cytologique d'autres critères, sauf s'il s'agit de cellules de Sézary absolument caractéristiques et que les contextes cliniques et histologiques sont évocateurs. (3)

- **Immunophénotypage par cytométrie en flux :**

La cytométrie en flux est un outil d'analyse qui permet de mesurer des caractéristiques optiques qui rendent avec une grande précision des paramètres morphologiques, phénotypiques et/ou fonctionnelles de cellules en suspension (6).

Au cours du syndrome de Sézary, plusieurs anomalies peuvent être retrouvées, lors de l'immunophénotypage par cytométrie en flux d'enchancements de sang périphérique, et font partie des critères diagnostiques définis par la Société Internationale des Lymphomes Cutanés (ISCL). Il existe une hyperlymphocytose T (>1750 lymphocytes CD3+/μL+) constituée en majorité de cellules présentant le phénotype suivant : CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, CD8-, CD45RO+, CD45RA- : Il s'agit donc de lymphocytes T CD4 mémoires ; avec augmentation du rapport CD4/CD8 (jusqu'à 10 fois) qui est retrouvé chez 48 à 88 % des patients atteints de SS (6) (3).

Cependant, cette hyperlymphocytose n'est pas spécifique du syndrome de Sézary. C'est la raison pour laquelle plusieurs équipes tentent de mettre en évidence un marqueur qui soit spécifique de la cellule de Sézary. En 1996, une étude portant sur 76 patients, comprenant des

syndromes de Sézary, d'autres lymphomes cutanés, des dermatoses inflammatoires, et des patients sains, a montré que les patients ayant un syndrome de Sézary présentent en circulation un nombre significativement augmenté de lymphocytes T CD4+ n'exprimant plus l'antigène pan-T CD7 (CD4+/CD7-). Tandis que le CD7 est normalement exprimée sur environ 90 % des cellules CD4+. Le seuil à partir duquel cette perte d'antigène est significative a été fixé à 40% de l'ensemble des lymphocytes CD4+, par la société internationale des lymphomes cutanés, et il a été retenu comme un critère diagnostique par l'ISCL, mais reste toujours non spécifique du SS, et de plus la population CD4+CD7- ne correspond pas toujours au clone tumoral. Ce seuil n'est jamais atteint dans le groupe des dermatoses inflammatoires, mais ne se retrouve que dans 60 à 70 % des syndromes de Sézary. Bien que les cellules de Sézary soient le plus souvent CD4+CD7-, il a également été prouvé que les cellules tumorales appartiennent aussi bien au groupe CD4+CD7-, qu'au groupe CD4+/CD7+ (6).

En 2001, une étude portant sur plus de 200 patients, montre que ceux atteints de SS, présentent une population lymphocytaire T circulante CD4+/CD26- qui représente plus de 30% de l'ensemble des lymphocytes CD4+.

Finalement, la perte de CD7 et de CD26 est la caractéristique phénotypique la plus fréquente et relativement la plus spécifique pour le diagnostic de SS. Une étude récente multicentrique a montré que la perte de CD26 dans $\geq 80\%$ de cellules T CD4+ et/ou la perte de CD7 dans $\geq 40\%$ de cellules T CD4+ pouvaient distinguer la plupart des patients atteints de SS (>80%) des patients atteints de dermatoses inflammatoires érythrodermiques avec une spécificité de 100%. Et selon Bonk et ses collègues, le CD26 associé au CD7 permet de diagnostiquer près de 90 % des cas de SS. (3)

IV. Rôle du KIR3DL2/CD158K :

Les cellules de Sézary sont caractérisées par des molécules de surface cellulaire spécifiques, qui sont typiques de ces cellules T malignes. Le marqueur le plus important est le **CD158k**, également connu sous le nom de **KIR3DL2**. Il a été identifié pour la première fois en 1996. Il fait partie de la famille des KIRs (*Killer Immunoglobulin-like Receptor*) des cellules tueuses naturelles NK, et a été reconnu comme marqueur spécifique des cellules de Sézary. Habituellement, Chez les individus sains, le CD158k n'est détecté que sur un petit sous-ensemble de cellules NK et sur de rares cellules T cytotoxiques CD8+ (3).

Le KIR3DL2 est le seul KIR à s'exprimer sous forme de dimère et possède les caractéristiques structurales d'un récepteur inhibiteur. Il possède trois domaines :

- Une partie extracellulaire composée de 3 domaines immunoglobuliniques ;
- Une partie transmembranaire ;
- Une partie intracellulaire qui contient des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-base Inhibition motifs) qui a un rôle inhibiteur. (4) (Figure 11).

KIR3DL2/CD158k est un homodimère de p70. Chaque monomère est constitué d'une partie extracellulaire faite de trois domaines immunoglobuliniques, d'une partie Transmembranaire et d'une partie longue intra cytoplasmique. Concernant les lymphocytes NK, la transduction du signal implique une cascade d'événements qui ont été bien décrits. Après engagement avec son ligand physiologique (les molécules du CMH I), les résidus tyrosine portés par les motifs ITIM de la portion intracellulaire du récepteur sont phosphorylés et recrutent la molécule phosphatase cytosolique SHP-1 qui va permettre la déphosphorylation des tyrosines kinases recrutées lors de l'engagement des récepteurs activateurs. (3)

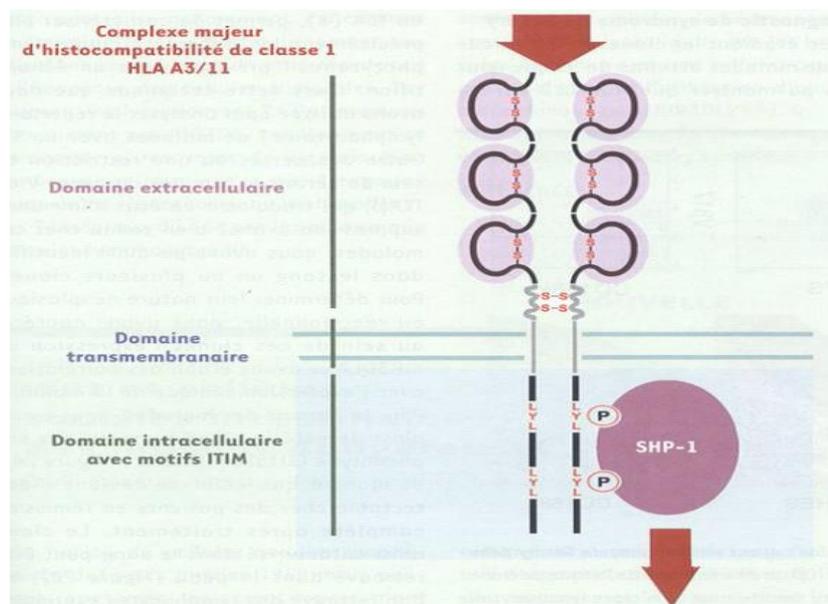


Figure 11 : Structure de KIR3DL2

Le **CD158k** est hautement spécifique du syndrome de Sézary en effet, il n'est pas exprimé de façon significative à la surface des cellules CD4+ chez les individus sains, ni chez

les patients présentant une érythrodermie bénigne. Ce marqueur permet donc de différencier une érythrodermie inflammatoire d'un réel SS. Il permet également de distinguer un MF d'un SS, qui ne sont actuellement plus considérés comme 2 versants d'une seule pathologie (5).

En effet, lors d'immunomarquages sur des lésions cutanées avec l'anticorps KIR3DL1/DL2, Wechsler *et al.* ont pu observer que le marquage des cellules tumorales était positif pour tous les cas de SS mais négatif pour les MF (5).

V. Traitements :

➤ L'objectif :

L'objectif du traitement du SS est de contrôler la maladie afin d'offrir la meilleure qualité de vie possible au patient. Il n'existe pas de prescription unique qui convienne à tous, et les traitements sont adaptés à la situation particulière de chaque patient, notamment le stade de la maladie. Les lymphomes cutanés étant indolents (à croissance lente), leur guérison est très difficile et constitue rarement l'objectif du traitement (3).

Les objectifs du traitement sont les suivants :

- ✓ Améliorer la qualité de vie de patient, en soulageant les symptômes tels que la Douleur, les démangeaisons, les brûlures et les rougeurs.
- ✓ Faire disparaître les taches, les plaques ou les tumeurs cutanées, pour minimiser les risques d'infection.
- ✓ Éliminer ou réduire le nombre de cellules de Sézary dans la peau et dans le sang.
- ✓ Empêcher la migration des cellules malignes de la peau vers d'autres organes.
- ✓ Rétablir l'équilibre et la compétence immunitaires (3).

➤ Moyens :

Ces traitements dépendent du diagnostic de certitude et du stade de la maladie. Les thérapeutiques ont pour but d'améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients. Il n'existe pas de traitement de référence pour le SS. Ces divers traitements utilisés peuvent être classés en 3 catégories principales (4) :

Les traitements locaux superficiels :

- ✓ Corticostéroïdes topiques
- ✓ Rétinoïdes topiques : Bexarotene
- ✓ Moutarde azotée : Chlorméthine
- ✓ Immunomodulateurs : Carmustine, Imiquimod
- ✓ Photothérapie UV : Puvathérapie

- ✓ Radiothérapie locale
- ✓ Electrothérapie corporelle totale

Les traitements systémiques :

- ✓ Les immunomodulateurs
- ✓ Les thérapies ciblées
- ✓ Les agents cytotoxiques

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (4).

Partie 2 : Matériel et méthodes :

1) Cytologie :

- Les numérations et les formules sanguines ont été réalisées sur les automates **Sysmex XT 5000** (**Figure 12**) au CHU, à partir de prélèvements sanguins sur des tubes EDTA (tube mauve).



Figure 12 : Automate system XT 5000

- On réalise des frottis sanguins : le fait d'étaler une goutte de sang uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche (**Figure 13**).

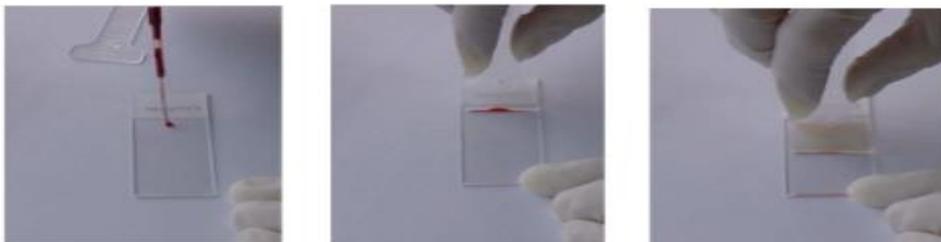


Figure 13 : les étapes de réalisation d'un frottis sanguin

- Les frottis sont colorés au **May Grunwald- Giemsa**, cette technique consiste à:
 - ✓ Placer la lame sur un support horizontal situé au-dessus d'un bac de coloration.
 - ✓ Mettre le colorant **MGG** pur de façon à recouvrir complètement le frottis.
 - ✓ Laisser agir 3 minutes
 - ✓ Rincer la lame avec l'eau
 - ✓ Diluer le **Giemsa** au 5^{ème} et laisser agir 10 minutes.

- ✓ Poser la lame de frottis vers le fond de la boîte de Laveran et le laisser agir 20 minutes.
- ✓ Rincer la lame avec de l'eau.
- ✓ Laisser sécher la lame à l'air en position inclinée en attendant le séchage complet.
- Finalement, l'étude morphologique des cellules. La recherche de CELLULE DE SEZARY est faite au microscope par un technicien d'hématologie et validée par un médecin.
- Ce protocole permet d'identifier deux types de cellules de Sézary selon leur taille: les cellules de Sézary de petite taille (< 12 µm) et les cellules de Sézary de grande taille (> 12 µm) (figure 10),

2) Cytométrie en flux :

Parallèlement, le même prélèvement sanguin était analysé en unité de cytométrie en flux suit les étapes suivantes :

- Un volume de 100 µl de sang total EDTA est additionné à un mélange d'anticorps couplés à des fluorochromes (**Tableau2**)

Fluorochrome	Cible	Volume (µL)	Canal
FL1	CD26	20	FL1
PE	CD158	10	FL2
PECF594	CD28	5	FL3
PerCP 5.5	CD7	5	FL4
PC7	CD4	2	FL5
APC	CD30	5	FL6
AA700	CD3	5	FL7
AA750	CD8	5	FL8
BV421	CD279	5	FL9
BV510	CD45	5	FL10

Tableau 2: Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes

- L'incubation à température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.
- Centrifugation 5 minutes à 1500 tours/minutes.
- L'ajout de 2 ml de tampon (**versalyse**) de lyse au culot cellulaire permet de lyser les globules rouges.
- Le culot cellulaire et la solution de lyse sont incubés 10 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante, puis centrifugés 5 minutes à 1500 tours/minutes.
- Puis, 2 ml de Cell Wash sont ajoutés au culot cellulaire et une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Les cellules lavées sont remises en suspension dans 250 μ L de Cell Wash.
- L'acquisition est réalisée sur un cymomètre **Cytomics FC500 (BECKMAN COULTERR)** (**Figure 15**).

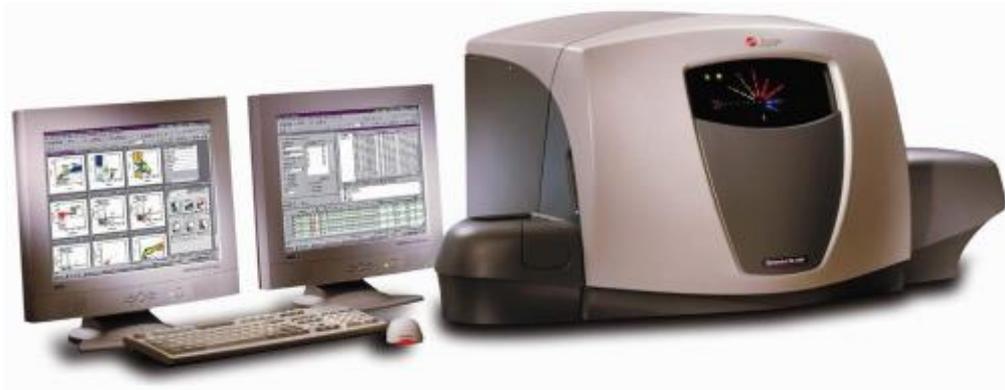


Figure 14 : un cytomètre Cytomics FC500

- puis l'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel KaluzaR qui traduit les informations sur des graphes.

3) Autre analyses :

Pendant deux mois de stage j'ai effectué autre analyses tels que :

- ✚ **NFS** : permettent la numération automatique globulaire et plaquettaire et le calcul Des constantes hématométriques (VGM, CCMH TCMH) par les appareils spécifiques (*Sysmex XE 5000 ;l'appareil XT 1800i*).

Les réactifs utilisés par l'automate : *STROMATOLYSER-FB, STROMATOLYSER-4DL, STROMATOLYSER -4DS, RET SEARCH (diluant), RET SEARCH (colorant),CELLCLEAN..*

- ✚ **La vitesse de sédimentation :**

La vitesse de sédimentation est la vitesse nécessaire qui permet aux globules rouges de chuter et déposer au fond d'un tube à essai. Cette VS dépend de la concentration des protéines, le nombre des globules rouges, la viscosité de plasma liée en particuliers à l'augmentation du taux des protéines de l'inflammation ou des immunoglobulines.

L'élévation de la vitesse de sédimentation a été reconnue longtemps comme un signe de l'inflammation dans l'organisme si la hauteur de sérum est supérieure de 15 mm chez l'homme et 20 mm chez la femme.



Figure 15 : pipette graduée et tube de la vitesse de sédimentation

- ✚ **Groupage ABO- Rhésus:** Un groupe sanguin est une classification reposant sur la présence ou l'absence des substances antigéniques héritées à la surface des hématies

Les divers groupes sont rassemblés en systèmes antigéniques.

1. **Le système ABO** : La détermination du groupe sanguin est basée sur le principe d'agglutination Ag –Ac et se réalise par deux épreuves différentes : le Beth Vincent ou l'épreuve globulaire et Simonin ou l'épreuve plasmatique.
2. **Pratique de groupage** : Pour déterminer le groupe sanguin on utilisant des plaques ou des cassettes.

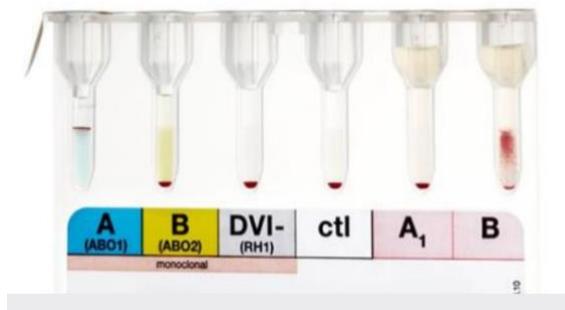


Figure16 /A : cassette du groupage



Figure 16/B: la plaque du groupage

✚ **Recherche d'anticorps irrégulier:** C'est examen consistant à dépister et identifier les anticorps dirigés contre les antigènes érythrocytaire autre que A et B dans le sérum à étudier. La plupart des anticorps sont immuns, apparus à la suite d'une grossesse ou d'une transfusion (test combs),il existe 2 test :

1. **Coombs direct** : permet de mettre en évidence la présence d'anticorps anti-érythrocytaires (IgG et/ou IgM) ou de fractions du complément à la surface des hématies. Il s'agit d'une réaction antigène-anticorps d'agglutination artificielle qui fait intervenir des antigènes particuliers et des anticorps.
2. **coombs indirecte (RAI)** : détecte les **anticorps anti-érythrocytaires libres dans le plasma ou le sérum**. Cette technique utilisée obligatoirement pour la recherche des anticorps irréguliers. Le test coombs indirecte sera utilisé dans :
 - le cadre de recherche d'agglutinations irrégulières dans le sérum des femmes enceintes ou des malades transfusées.
 - le titrage d'AC irréguliers chez une femme en période d'activité génitale.
 - le cadre d'un phénotypage .

✚ **Les tests explorant l'hémostase primaire**

✚ **Les tests explorant la coagulation :** Les tests de coagulation permettent de mesurer la capacité du sang à coaguler :

1. **Temps de céphaline activée(TCA) :** Temps de céphaline activée correspond au temps de coagulation d'un plasma ,décalcifié et déplaqueté en présence de céphaline (substitut des phospholipides plaquettaire) et d'un activateur (kaolin ,silice ..) à 37°, il explore le voie endogène (PK ..) et tronc commun. Il est exprimé en secondes ou ratio TCA patient / témoin < 1.
2. **Temps de quick ou taux de prothrombine(TP) :**Le TQ correspond au temps de coagulation d'un plasma citraté, décalcifié déplaqueté, en présence d'un excès de thromboplastine, de source de facteur tissulaire , et de calcium .
Il explore la voie extrinsèque et les facteurs du tronc commun de la coagulation .
3. **Dosage des D-Dimères :** Les D-Dimères sont les produits de dégradation de la fibrine et le témoin de la formation d'un caillot. Si leur test est positifs donc il y l'activation de la coagulation et de la fibrinolyse.
4. **Dosages des PDF :** L'action de la plasmine sur la fibrine entraine la formation de PDF (Produits de dégradation de la fibrine et fibrinogène), le teneur élevée en PDF dans le sérum témoigne sur une activité fibrinolytique circulante liée à une décharge d'activation et sur une formation de plasmine en quantité importante.
Cet examen n'est pas spécifique puisqu'il ne distingue pas la dégradation du fibrinogène et celle de la fibrine.

Les tests sont réalisés par des appareils spécifiques *l'appareil Sysmex CS-5100* (Figure 17).



Figure 17: l'appareil Sysmex CS-5100

Conclusion :

Syndrome de Sézary , est un lymphome T cutané primitif, c'est un variant « leucémie » très rare des CTCL, caractérisé par la triade : érythrodermie généralisée très prurigineuse, des polyadénopathies généralisées, avec la présence dans le sang périphérique de cellules mononuclées « monstrueuses » avec noyaux cérébriformes appelées cellules de Sézary.

Le diagnostic de syndrome de Sézary est souvent difficile et retardé. Il nécessite une approche multidisciplinaire et une corrélation clinicopathologique et moléculaire précise. L'ISCL et l'EORTC ont ficelé les dernières lignes directrices en matière de diagnostic, de stadification et de prise en charge thérapeutique de SS. Ils définissent le SS, par la présence d'érythrodermie comme critère obligatoire et au moins deux des critères biologiques suivants :

- ✚ Une numération absolue des cellules de Sézary circulantes d'au moins 1000 cellules/mm³ sur le frottis sanguin.
- ✚ La démonstration d'une anomalie immunophénotypique, soit un rapport lymphocytaire T CD4/CD8 supérieur à 10 et/ou une perte ou une expression aberrante des marqueurs pan cellulaires T en cytométrie de flux.
- ✚ La mise en évidence d'un clone cellulaire T sanguin détecté par Southern blot, PCR.
- ✚ La mise en évidence d'anomalies chromosomiques du clone T tumoral.

Le traitement de SS demeure à visée palliative, vu l'absence de ressources thérapeutiques curatives. Il doit suivre une approche progressive, adaptée au stade de la maladie. L'objectif du traitement de SS est de contrôler sa progression, le maintien de la qualité de vie devrait être au centre des stratégies thérapeutiques. Actuellement, la photochimiothérapie extracorporelle constitue un bon choix thérapeutique avec de meilleures réponses et la greffe de cellules souches allogéniques reste la seule option thérapeutique à visée curative dans le SS. Enfin, de nouvelles armes thérapeutiques sont en cours d'évaluation et constituent de nouveaux espoirs d'amélioration de la survie globale des patients.

Bibliographiques :

1. Beylot-Barry M, Dereure O, Vergier B, et al. Prise en charge des lymphomes T cutanés : recommandations du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés. Ann dermatol venereol 2010;137:611-621
2. Sézary A, Bouvrain J. Erythrodermie avec presence de cellules monstrueuses.
3. Daoud, bilal. syndrome de sézary Avancées actuelles. université mohamad 5 de Rabat :Faculté de medecine et pharmacie ,2021.
4. DOUAT-BEYRIES, Claudia.ÉTUDE DES MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES DANS LE DIAGNOSTIC.UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER:FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,2019.
5. Céline Malassigné. Identification des cellules de Sézary au CHU de Rouen et évaluation de l'apport des marqueurs CD158k, CD7 et CD26 en cytométrie de flux.
6. <http://doxa.u-pec.fr/theses/th0511330-titre.pdf>
7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15841167>