



Cytologie du lavage broncho-alvéolaire

Diane Frankel, Elise Kaspi, Patrice Roll

► To cite this version:

Diane Frankel, Elise Kaspi, Patrice Roll. Cytologie du lavage broncho-alvéolaire. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2024, 2024 (559), pp.20-32. 10.1016/S1773-035X(24)00075-3 . hal-04521188

HAL Id: hal-04521188

<https://hal.science/hal-04521188v1>

Submitted on 26 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Cytologie du lavage broncho-alvéolaire

Diane FRANKEL^{1*}, Elise KASPI¹, et Patrice ROLL¹

¹ Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, MMG, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, Marseille, France

* Auteur correspondant :

Dr Diane Frankel, PharmD, PhD. Service de Biologie Cellulaire, Hôpital la Timone, Assistance publique des Hôpitaux de Marseille, 264 rue Saint Pierre, 13385, Marseille, France. Aix-Marseille Univ, INSERM, MMG, U1251, Aix Marseille Université, Faculté des sciences médicales et paramédicales la Timone, 27 Boulevard Jean Moulin 13005 Marseille.

E-mail : diane.frankel@univ-amu.fr, Téléphone : +33 491 324 934, Fax : +33 491 384 676

Mots clés : cytologie, lavage broncho-alvéolaire.

Key words: cytology, bronchoalveolar lavage fluid

Résumé : Le lavage broncho-alvéolaire (LBA), obtenu par fibroscopie bronchique, est une procédure peu invasive réalisée pour le diagnostic ou le suivi de nombreuses pathologies pulmonaires. Cet article reprend les différentes étapes du traitement du lavage broncho-alvéolaire au laboratoire et se concentre sur l'analyse cytologique : les colorations à effectuer, les types de cellules ou autres éléments pouvant être observés, ainsi que les différents contextes pathologiques nécessitant une exploration par LBA.

Abstract: The bronchoalveolar lavage (BAL), obtained through bronchoscopy, a minimally invasive procedure performed for the diagnosis and monitoring of various lung conditions. This article outlines the various steps of bronchoalveolar lavage analysis in the laboratory and focuses on cytological analysis, including staining, types of cells or other elements that can be observed, as well as various pathological contexts requiring investigation by a BAL.

Généralités

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est un examen courant pour le diagnostic ou le suivi de pathologies pulmonaires (1). Il est obtenu par fibroscopie bronchique habituellement sous anesthésie locale chez l'adulte, et sous anesthésie générale chez l'enfant. Il existe des recommandations émises par L'European Respiratory Society (ERS) et de l'European Society of Pneumology concernant le LBA chez l'enfant et l'adulte (1–3). Le LBA est une procédure peu invasive au cours de laquelle les complications sont rares. Il doit être réalisé dans la zone la plus atteinte identifiée à l'imagerie. En cas de pathologie diffuse, il sera fait dans le lobe moyen ou la lingula, des sites facilement accessibles associés à un bon rendement de récupération du liquide. Le LBA permet d'explorer la partie distale des bronches, c'est-à-dire les alvéoles pulmonaires. La paroi des alvéoles est constituée de cellules épithéliales appelées pneumocytes. En condition physiologique, les cellules immunitaires présentes dans les alvéoles pulmonaires sont des macrophages appelés macrophages alvéolaires.

Le prélèvement s'effectue par instillation de sérum physiologique ou solution saline stérile, à 37°C ou à température ambiante. Le volume instillé est variable en fonction de l'âge du patient : entre 100 et 150 mL chez l'adulte et 5 et 20 mL chez l'enfant (2,4). Certaines équipes adaptent le volume instillé chez l'enfant en volume/kg. L'instillation se fait en plusieurs fois, le liquide est réaspiré entre chaque instillation. Le volume recueilli est toujours plus faible que le volume instillé. Le LBA est considéré comme techniquement acceptable si le volume recueilli correspond à plus de 40% du volume instillé.

Le délai idéal d'acheminement du LBA est de moins de deux heures à température ambiante. Si ce délai ne peut être respecté, il est fortement conseillé de conserver le prélèvement à +4°C pour éviter la cytolysse.

L'analyse du LBA peut comprendre plusieurs paramètres : aspect du liquide, volume recueilli, examen microbiologique, examen biochimique, analyse cytologique et cytométrie en flux pour le typage lymphocytaire par exemple. Cet article est centré sur l'analyse cytologique du LBA.

L'analyse du LBA

L'aspect du liquide

Un LBA normal est translucide comme le liquide instillé. En fonction de la pathologie, il peut être trouble à purulent (en cas d'infection), rosé à hémorragique (en cas d'hémorragie intra-alvéolaire), ou laiteux (en cas de protéinose alvéolaire).

La numération cellulaire

Il existe plusieurs études assez anciennes permettant d'établir les valeurs pour la numération des éléments nucléés chez l'enfant. Cependant, la plupart de ces études porte sur des enfants atteints de pathologies telles que la sarcoïdose (5), une bronchiolite oblitérante (6) ou une pneumopathie interstitielle (7). Deux études reprennent les résultats obtenus chez des enfants dépourvus de pathologies pulmonaires (8,9). Ces deux études concernent respectivement 48 enfants de 3 à 5 ans et 16 enfants de 2 mois à 3 ans. La concentration cellulaire (éléments nucléés) varie puisque la moyenne est, dans la première étude, de 103 ± 111 cellules / μ L, alors qu'elle est de 599 ± 329 cellules/ μ L dans la deuxième étude. La différence de numération pourrait s'expliquer par la différence d'âge des enfants. Il paraît difficile dans ce contexte, d'établir des valeurs normales de références.

Concernant les données chez l'adulte, ces valeurs sont plus homogènes mais varient en fonction du statut « fumeur/non-fumeur ». Une étude portant sur 295 adultes sains non-fumeurs retrouve une médiane de 85 éléments nucléés / μ L avec des valeurs minimale et maximale de 29 et 370 éléments nucléés/ μ L respectivement (10). Les recommandations de l'American Thoracic Society compilent plusieurs publications regroupant des volontaires sains fumeurs ou non-fumeurs. Alors que la valeur moyenne de la numération cellulaire chez des volontaires sains non-fumeurs se situe entre 94 et 158 éléments nucléés/ μ L, elle atteint des valeurs situées entre 358 et 418 éléments nucléés/ μ L chez les volontaires sains fumeurs (11).

Une numération des globules rouges peut aussi être réalisée. Elle peut être informative en cas de suspicion d'hémorragie intra-alvéolaire.

La formule des éléments nucléés et les différents contextes de variation (pathologies non néoplasiques)

La formule doit être réalisée sur au moins 300 cellules, à partir d'un frottis, d'un spot de cytocentrifugation ou par cytométrie en flux. Pour la réalisation des spots, la vitesse de

centrifugation doit se situer entre 250 et 500g pendant 5 à 10 minutes (2). Un filtre peut être utilisé au préalable si le LBA est trop muqueux afin de retenir le mucus (hors suspicion de néoplasie). Les colorations classiques utilisées sont le May Grunwald Giemsa (MGG) et la coloration de Papanicolaou. Le MGG permet de réaliser une analyse cytologique de la plupart des cellules présentes, mais l'observation des cellules épithéliales est moins aisée. La coloration de Papanicolaou a été mise au point pour observer plus spécifiquement les cellules épithéliales, et en particulier les cellules malpighiennes. Dans le cas du LBA, elle permet une meilleure reconnaissance des cellules bronchiques et des cellules malpighiennes superficielles. Les cellules hématopoïétiques sont reconnaissables au Papanicolaou, mais l'analyse de la chromatine sera moins précise qu'au MGG. De même, les granulations des polynucléaires basophiles ne sont pas visualisables au Papanicolaou, la distinction entre un polynucléaire neutrophile et un polynucléaire basophile n'est donc pas possible avec cette coloration.

En condition physiologique, La répartition des éléments nucléés est assez homogène d'une étude à l'autre, qu'elle concerne les adultes ou les enfants. Les macrophages sont les cellules majoritaires ($\geq 80\%$), suivis par les lymphocytes (10-15%), les polynucléaires neutrophiles ($< 3\%$) et les polynucléaires éosinophiles ($< 1\%$). Les cellules épithéliales (cellules malpighiennes superficielles et cellules bronchiques) ne sont pas présentes au niveau des alvéoles pulmonaires. Leur présence dans le LBA témoigne donc d'une contamination par des cellules de la sphère oropharyngée (pour les cellules malpighiennes) ou des bronches (pour les cellules bronchiques). Ces cellules sont facilement reconnaissables. Les cellules malpighiennes superficielles sont de grandes cellules, le plus souvent isolées (figure 1 C, D G) mais que l'on peut quelquefois retrouver en petit amas de 4 à 5 cellules généralement (Figure 1 A, B et H). Le noyau est de petite taille et le cytoplasme très abondant et très clair au MGG (Figure 1 F, G et H). Au Papanicolaou, ces cellules sont très reconnaissables car le cytoplasme est bleu ciel, rosé ou orange clair et peut contenir quelques granulations plutôt grosses. Des modifications de couleurs du cytoplasme au Papanicolaou sont le signe de parakératose (Figure 1 C et D) ; le cytoplasme est dans ce cas orange vif ou bleu turquoise vif. Les cellules malpighiennes intermédiaires ont un cytoplasme moins abondant (figure 1 E). Des germes peuvent aussi être présents sur ces cellules et ne sont pas signe d'infection, mais plutôt le témoin d'une contamination par la flore oropharyngée (Figure 1 G et H). Les cellules bronchiques sont des cellules cylindriques. Leur noyau est proche du pôle basal et leurs cils bien visibles sont localisés au niveau du pôle apical. Les cils sont nombreux lorsque les

cellules bronchiques sont normales (Figure 1 I, J, K, M, N et O), mais il est possible voire fréquent de voir des cellules bronchiques avec une bordure ciliaire abrasée (dans des contextes d'infection ou de tabac, figure 1 L et P). Dans ce cas, ce sera surtout sa forme cylindrique et la position basale du noyau qui permettra l'identification de la cellule. Pour qu'un LBA soit représentatif, les cellules malpighiennes et les cellules bronchiques ne doivent pas représenter plus de 5% des éléments nucléés. Ces cellules ne doivent pas être incluses dans la formule des éléments nucléés, mais il est important de les évaluer et de les mentionner dans le compte rendu pour apprécier la qualité et la représentativité du LBA. Il pourra ainsi être mentionné : « Présence de quelques/nombreuses cellules bronchiques/cellules malpighiennes superficielles. Prélèvement peu/non représentatif d'un LBA » (2). Les pneumocytes sont aussi des cellules épithéliales que l'on peut observer dans un LBA, cependant très rarement et dans certains contextes (voir plus loin, Figure 1 Q à U).

Les macrophages sont des monocytes venant des vaisseaux sanguins et présents dans les différents tissus de l'organisme. Ces cellules ont pour fonction principale la phagocytose. De ce fait, le cytoplasme est souvent très hétérogène d'un macrophage à l'autre au sein d'un même prélèvement. Le cytoplasme peut être dépourvu de matériel (Figure 2 A) ou chargé de matériel que la cellule aura plus ou moins dégradé (Figure 2 B, C et E). Le cytoplasme peut renfermer des inclusions foncées secondaires à l'inhalation de charbon, de la fumée de cigarette ou d'autres origines. Ces macrophages sont des macrophages dits « chargés », aussi appelés macrophages anthracosiques. Les macrophages spumeux sont caractérisés par la présence de vacuoles souvent multiples et « vides » dans le cytoplasme de la cellule (Figure 2 D). Ces vacuoles sont souvent des inclusions lipidiques ou sont riches en lipoprotéines qui seront révélées par la coloration d'Oil Red (voir plus loin). Des macrophages géants multinucléés sont retrouvés dans 10% des LBA (Figure 2 F) (12). Ces cellules sont de très grande taille, aux noyaux multiples, leur cytoplasme pouvant ou non contenir du matériel et des granulations. Ces cellules issues de la fusion de plusieurs macrophages peuvent être observées dans certains contextes pathologiques, mais sans aucune spécificité (sarcoïdose, pneumoconiose, autre pneumopathie interstitielle, exposition à des métaux lourds...).

Le LBA étant réalisé dans un contexte pathologique, il est fréquent que les cellules observées soient dans des proportions différentes que celles attendues. La formule permet

156 alors d'orienter le diagnostic (Tableau 1). Les LBA réalisés sur des patients fumeurs sont
 157 associés à une augmentation des éléments nucléés, une augmentation des macrophages et une
 158 diminution des lymphocytes (13,14).

159

Type cellulaire	Valeurs normales	Contextes pathologiques
Macrophages	$\geq 80\%$	
Lymphocytes	10-15%	<p>>15% de lymphocytes Pneumonie d'hypersensibilité Pneumonie interstitielle non spécifique Pneumonie virale (VIH par exemple) Fibrose pulmonaire idiopathique Hémopathie lymphoproliférative (avec identification de lymphocytes anormaux) Pneumopathie radique Pneumonie organisante cryptogénique Collagénoses Tuberculose Médicaments (anti-PD1/PD-L1, sirolimus, everolimus, etoposide)</p> <p>$\geq 25\%$ de lymphocytes Pneumonie interstitielle non spécifique Sarcoïdose Berylliose</p> <p>>50% de lymphocytes Pneumonie d'hypersensibilité</p>
Polynucléaires neutrophiles	$\leq 3\%$	<p>>3% Pneumonie bactérienne ou fongique Collagénoses Fibrose pulmonaire idiopathique Pneumonie d'inhalation Sepsis Asbestose Syndrome de détresse respiratoire aigu Dommage alvéolaire diffus Mucoviscidose Médicaments (bléomycine, erlotinib, trastuzumab, acide valproïque)</p> <p>>50% Pneumonie d'inhalation Infection bactérienne Pneumonie interstitielle aigue</p>

Polynucléaires éosinophiles	$\leq 1\%$	>1% Pneumonie à éosinophiles Aspergillose broncho-pulmonaire immunoallergique Infection parasitaire (helminthiase) Infection à <i>Pneumocystis</i> Greffe de cellules souches Asthme Bronchite Aspergillose bronchopulmonaire allergique Lymphome d'Hodgkin Inhalation de drogues (cocaïne) Médicaments (carbamazépine, sulfasalazine) >25% Pneumonie à éosinophiles aigue ou chronique Granulomatose éosinophilique avec polyangéite
Polynucléaires basophiles/mastocytes	Très rares voire absence	L'association de plus de 1% de mastocytes avec >50% de lymphocytes et >3% de polynucléaires éosinophiles oriente vers une Pneumonie d'hypersensibilité
Cellules épithéliales (bronchiques et malpighiennes)	$\leq 5\%$	Contamination si >5%
Cellules malignes	Absence	Présence Cellules à phénotyper par immunocytochimie pour préciser le diagnostic de néoplasie

Tableau 1 : Valeurs normales et pathologiques des cellules du LBA. Tableau adapté de (11) et (13).

Une lymphocytose est souvent retrouvée dans les pneumopathies interstitielles diffuses (PID). Elles regroupent des pathologies dont le point commun est la présence d'opacités infiltrantes diffuses sur l'imagerie pulmonaire. Le LBA fournit des éléments d'orientation étiologique en fonction de la formule des éléments nucléés. La pneumopathie interstitielle non spécifique est une des PID qui peut être idiopathique ou secondaire principalement à des connectivites. La pneumopathie d'hypersensibilité correspond à une hypersensibilité due à une inhalation répétée d'antigènes d'origine domestique (moisissures, oiseaux de compagnie) ou professionnelle (inhalation de moisissures, de foin moisi, exposition à des déjections d'oiseaux). Les pneumoconioses sont des fibroses pulmonaires provoquées par l'inhalation de particules minérales, les plus fréquentes étant les fibres d'amiante et de silice.

La sarcoïdose est une maladie systémique caractérisée par l'infiltration des organes atteints par des granulomes. Le LBA permet une orientation diagnostique par l'observation d'une alvéolite lymphocytaire modérée (20 à 50% de lymphocytes). L'immunophénotypage lymphocytaire met en évidence un ratio lymphocytes T CD4/CD8 augmenté (>3,5).

Le LBA est souvent réalisé pour objectiver un contexte infectieux. Bien que l'examen microbiologique soit essentiel dans ce cas, l'analyse cytologique peut mettre en évidence des bactéries (Figure 3 A), des levures (Figure 3 B et C), des filaments mycéliens (Figure 3 D), du *pneumocystis* (Figure 3 E), ou des signes d'infection virale (15). Cet examen a toute son importance pour les patients immunodéprimés, par exemple pour le suivi de transplantation pulmonaire (16), de greffe de cellules souches hématopoïétiques (17,18), de patients infectés par le VIH (19), ainsi que les patients atteints de mucoviscidose pour lesquels une augmentation des polynucléaires neutrophiles est souvent retrouvée (20,21). Chez les patients ayant bénéficié d'une transplantation pulmonaire, le LBA peut être réalisé en cas de suspicion de rejet de greffe. Il aidera à différencier un rejet de greffe d'une cause infectieuse (présence de germes). Un immunophénotypage lymphocytaire doit être prescrit dans ce contexte clinique.

Les infections pulmonaires, en fonction de leur étiologie, entraîneront une augmentation des lymphocytes (contexte viral principalement), une augmentation des polynucléaires neutrophiles (contexte bactérien) ou plus rarement une augmentation des polynucléaires éosinophiles (helminthiase ou infection par *pneumocystis*).

Les polynucléaires neutrophiles sont le plus souvent augmentés lors de contexte d'infection bactérienne. Lors de syndrome de détresse respiratoire aigüe (SDRA), une augmentation importante des polynucléaires neutrophiles est souvent constatée. On peut aussi observer des pneumocytes ayant desquamé des alvéoles pulmonaires, particulièrement dans les contextes de SDRA liés à l'infection (COVID-19 par exemple). Ces cellules retiennent en général l'attention, elles peuvent être isolées ou regroupées en petits amas, sont plus grandes qu'un macrophage, et le cytoplasme est hyperbasophile et parfois vacuolisé (Figure 1 Q à V). Il est parfois difficile de différencier des pneumocytes de cellules malignes d'adénocarcinome. Il est dans ce cas très important de connaître le contexte clinique et de demander un nouveau prélèvement de LBA à distance de l'épisode aigu.

L'augmentation des polynucléaires éosinophiles est observée lors de maladies pulmonaires à éosinophiles (22,23). Il s'agit de pathologies respiratoires caractérisées par plus

de 5% des polynucléaires éosinophiles dans le LBA. On y retrouve l'allergie pulmonaire à aspergillus, des pneumopathies d'origine médicamenteuse, le syndrome de Loeffler (ou de Löffler, helminthiase), l'inhalation de drogues, la granulomatose éosinophilique avec polyangéite (anciennement appelée syndrome de Churg Strauss) et les formes aiguë et chronique de pneumonie à éosinophiles. En cas de pneumonie aiguë à éosinophiles, les éosinophiles peuvent être dégranulés et ressembler à des polynucléaires neutrophiles. L'éosinophile dépasse 25%. L'asthme peut aussi entraîner une augmentation des polynucléaires éosinophiles, mais aussi une augmentation des polynucléaires neutrophiles, des lymphocytes et la présence de mastocytes (24).

Il est aussi possible de voir d'autres cellules telles que des polynucléaires basophiles ou des mastocytes. La présence de plus de 1% de polynucléaires basophiles associés à plus de 3% de polynucléaires éosinophiles et plus de 50% de lymphocytes oriente vers une pneumonie d'hypersensibilité.

Des cristaux peuvent être observés, bien que ce soit assez rare. Les cristaux de Charcot-Leyden sont généralement associés à une éosinophilie (figure 4 A à C). Ces cristaux sont pointus aux extrémités et plus large au centre. Des cristaux de cholestérol peuvent également être observés (figure 4 D et E). Ces derniers sont grands, avec plusieurs angles, de forme polygonale, et présentent un effet d'empilement. Les cristaux de bilirubine sont reconnaissables grâce à leur couleur jaunâtre (Figure 4 F et G), on peut les retrouver lors de fistules bilio-bronchiques (25).

Apport du LBA dans le diagnostic de néoplasie

L'identification de cellules malignes dans le LBA permet d'orienter le clinicien vers un diagnostic de néoplasie. De plus, l'observation de corps asbestosiques (ou fibres d'amiante) dans le LBA, selon leur concentration, « classe » le patient comme à risque de développer une néoplasie pleuro-pulmonaire.

Des cellules tumorales peuvent se retrouver dans le LBA. La sensibilité de cette technique est assez faible (entre 15% et 65% selon les études (26,27)) ce qui fait du LBA un examen peu pratiqué pour le diagnostic de cancer. Néanmoins, la reconnaissance des cellules tumorales est essentielle car elle permet de rendre un diagnostic pour certains patients. Dans la majorité des cas il s'agit de carcinome bronchique : adénocarcinome bronchique (figure 5

A à C), carcinome bronchique non à petites cellules (Figure 5 D à F), carcinome épidermoïde (Figure 5 G à I), ou carcinome neuroendocrine à petites cellules (figure 5 J et K). Les cellules tumorales sont généralement plus grandes que les cellules habituellement retrouvées dans un LBA. Elles sont souvent regroupées en amas mais peuvent aussi être isolées. Des dyscaryoses sont généralement observées : noyau contourné avec des nucléoles proéminents, marqués, parfois multiples. En fonction du type de carcinome, des vacuoles peuvent être présentes dans le cytoplasme, notamment pour l'adénocarcinome. L'adénocarcinome lépidique est un sous type d'adénocarcinome bien différencié développé à partir des cellules épithéliales alvéolaires. Le carcinome épidermoïde ou malpighien peut s'accompagner de cellules malpighiennes dyskératosiques (Figure 5 I), ce qui aidera pour affirmer un carcinome épidermoïde différencié et kératinisant. Le carcinome neuroendocrine à petites cellules se caractérise par des cellules de petite taille, un peu plus grandes qu'un lymphocyte, un haut rapport nucléocytoplasmique, l'absence de nucléole, et une chromatine qualifiée de « poivre et sel ». Ces cellules sont souvent en grappe (Figure 5 J et K). Outre les tumeurs primitives de bronches, des métastases par d'autres carcinomes ou un mélanome peuvent être observées. Par ailleurs, des lymphomes non hodgkiniens peuvent aussi infiltrer les alvéoles pulmonaires (figure 5 L). Dans tous les cas, il est impératif de caractériser les cellules tumorales quelle que soit leur nature, soit par immunocytochimie soit par cytométrie en flux en fonction du type de cellules. Cela permet d'éviter de multiplier les gestes chez le patient, d'accélérer le diagnostic et réserver du prélèvement pour d'éventuelles analyses complémentaires. Par exemple, il est tout à fait possible à partir d'un LBA d'effectuer un diagnostic d'adénocarcinome bronchique et d'utiliser le matériel restant pour orienter le choix du traitement (statut de PD-L1, mutation d'*EGFR*, réarrangement d'*ALK* et *ROS1*).

Le LBA est aussi indiqué pour confirmer l'exposition professionnelle ou environnementale à l'amiante. L'amiante est un cancérigène de catégorie 1 qui peut être à l'origine de cancer broncho-pulmonaire et de mésothéliome pleural malin (28). Les corps asbestosiques sont des particules fibreuses de nature minérale correspondant à la transformation dans l'organisme de fibres d'amiante en corps ferrugineux, revêtues d'une gaine protéino-ferrugineuse généralement segmentée et renflée à ses extrémités. La recherche de corps asbestosiques en microscopie optique dans le LBA permet d'objectiver l'exposition individuelle aux fibres d'amiante (Figure 5 M à R). Les corps asbestosiques se forment à partir des fibres d'amiante qui ont été inhalées et qui sont présentes depuis 4 à 6 mois dans les voies respiratoires inférieures car elles sont non dégradables par les macrophages. La présence

de corps asbestosiques dans le LBA (1 corps asbestosique / mL de LBA) confirme l'exposition à l'amiante (29). Le tableau n°30 de la sécurité sociale regroupe toutes les pathologies liées à l'exposition professionnelle consécutive à l'inhalation d'amiante (30).

Des techniques spéciales pour l'orientation diagnostique

Des colorations spéciales telles que la coloration de Perls, la coloration d'Oil Red O, la coloration de PAS (Periodic Acid Schiff) ou la recherche d'expression de CD1a permettent de confirmer ou d'aider au diagnostic de certaines pathologies.

La coloration de Perls est utilisée lors de suspicion d'hémorragie intra-alvéolaire. Cette pathologie correspond, comme son nom l'indique à la présence de sang dans les alvéoles pulmonaires. Les causes sont multiples : maladies auto-immunes (vascularites et connectivites), prise de toxique (cocaïne, chimiothérapie), embolie graisseuse, néoplasie, contexte infectieux ou encore idiopathique (31). Le LBA aura un aspect allant de rosé à hémorragique. La coloration de Perls permet de mettre en évidence l'hemosidérine présente dans les macrophages alvéolaires après qu'ils aient phagocytés les hématies. Lors de ce processus, le fer passe de l'état ferreux (Fe^{2+}) dans les hématies à ferrique (Fe^{3+}) dans les macrophages (Figure 6 A, B et C). La coloration bleutée qui en résulte ne concernera donc que les macrophages. L'hémorragie intra-alvéolaire est suspectée à partir de 20% de macrophages bleutés qui seront qualifiés de sidérophages (32). Le score de Golde correspond à un calcul basé sur la classification des macrophages du LBA en fonction de l'intensité de la coloration bleue (33). Pour chaque macrophage, on attribue un grade de 0 à 4 : 0 correspond à un macrophage sans bleu visible, 1 à une intensité du cytoplasme faible (bleu pâle), 2 à une intensité modérée (quelques grains), 3 à une intensité intense et 4 à une coloration intense recouvrant le noyau du macrophage (Figure 6 C). Le score de Golde se calcule sur 200 macrophages en multipliant le nombre de macrophages de chaque grade (0 à 4) par le grade lui-même et en additionnant le tout. Par exemple, sur 100 macrophages, on compte 10 macrophages à 0, 30 à 1, 40 à 2, 10 à 3 et 10 à 4, le score de Golde sera de $10 \times 0 + 30 \times 1 + 40 \times 2 + 10 \times 3 + 10 \times 4 = 180$. La valeur normale est un score inférieur à 20. L'hémorragie intra-alvéolaire est évoquée si le score est supérieur à 100. Il faut cependant avoir en mémoire que la présence de sidérophages ne survient que 48 à 72h après le début de l'hémorragie intra-alvéolaire. Si le LBA est réalisé de manière trop précoce, le score de Golde risque donc d'être

299 négatif (34). En cas d'hémorragie intra-alvéolaire, des images d'érythrophagocytose sont
300 fréquentes.

301 La coloration d'Oil Red O met en évidence les inclusions lipidiques présentes dans les
302 cellules (Figure 6 D à G et K). Elle permet de dénombrer le pourcentage de lipophages (35)
303 qui sont augmentés (>5%) lors de reflux gastro-œsophagien, de pneumopathie d'inhalation,
304 d'embolie graisseuse post-traumatique, de perfusion de lipides, de pneumopathie associée au
305 vapotage ou d'inhalation excessive d'huiles essentielles (36,37). Une étude a cependant
306 montré la faible spécificité de cette coloration dans la population pédiatrique dans laquelle
307 une coloration d'Oil Red O positive dans le LBA est retrouvée chez 74% des enfants (20).

308 La coloration de PAS (Periodic Acid-Schiff) aide au diagnostic de protéinose
309 alvéolaire (Figure 6 H à J, L et M). Cette pathologie rare est due à une accumulation de
310 surfactant dans les alvéoles pulmonaires. La protéinose alvéolaire peut être d'origine auto-
311 immune (caractérisée par la présence d'anticorps anti GM-CSF), génétique (mutation dans les
312 gènes *SFTPB*, *SFTPC*, *ABCA3* ou *NKX2-1* par exemple), ou secondaire à une pathologie
313 hématologique, à une inhalation de toxiques ou à une infection (38). Le LBA est d'aspect
314 laiteux et la coloration de PAS permet de marquer en rose fuchsia les polysaccharides du
315 surfactant dans les macrophages, les polynucléaires neutrophiles ou en dépôts amorphes
316 extracellulaires. Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles sont également positifs à
317 la coloration d'Oil Red O (Figure 6 J et K, M et N) car les polysaccharides du surfactant
318 pulmonaire sont associés à des lipides et des glycolipides qui se colorent à l'Oil Red O. Le
319 scanner et l'analyse du LBA permettent le diagnostic de protéinose alvéolaire.

320 L'analyse de l'expression du CD1a s'effectue par immunocytochimie ou par
321 cytométrie en flux. La présence d'au moins 5% de macrophages exprimant le CD1a dans un
322 LBA confirme le diagnostic d'histiocytose langerhansienne (39). L'histiocytose
323 langerhansienne est une maladie systémique liée à une accumulation dans les tissus de
324 cellules de Langerhans, le plus souvent organisées en granulomes. Les cellules de Langerhans
325 sont des cellules dendritiques de type Langerhans présentes en condition physiologique dans
326 les épithéliums malpighiens et dans les voies aériennes respiratoires. L'histiocytose
327 Langerhansienne touche les adultes et les enfants, bien que les formes cliniques soient assez
328 différentes. L'atteinte pulmonaire est plus spécifique de l'adulte notamment fumeur, alors que
329 les enfants auront plus fréquemment des atteintes osseuse, cutanée, ou hypophysaire. La

330 mutation *BRAF*^{V600E} est retrouvée dans 38 à 60% des cas d'histiocytose Langerhansienne
331 (41). Ces cellules de Langerhans expriment aussi la langérine et le marqueur S100 (40).

332

333 **Les points à noter dans le compte-rendu**

334 Le compte-rendu doit mentionner les informations suivantes : le volume instillé, le
335 volume recueilli, la numération des cellules (si possible), la formule des éléments nucléés (en
336 pourcentage et éventuellement en concentration par millilitre de LBA), la présence éventuelle
337 de cellules de contamination, de germes ou de cellules suspectes.

338

339 **Conclusion**

340 Le LBA est un examen essentiel lors du diagnostic et du suivi de pathologies
341 pulmonaires chez l'adulte et l'enfant. Il est important de connaître le contexte dans lequel le
342 LBA a été réalisé afin d'apporter une meilleure interprétation au clinicien.

343

344 **Points à retenir**

345 - L'analyse cytologique du LBA participe au diagnostic et au suivi de nombreuses
346 pathologies.

347 - La numération cellulaire est variable en fonction de l'âge et du statut fumeur/ non-fumeur.

348 - La formule d'un LBA en dehors d'un contexte pathologique est assez stable quel que soit
349 l'âge.

350 - Une modification de la formule ou la présence de cellules tumorales oriente le diagnostic.

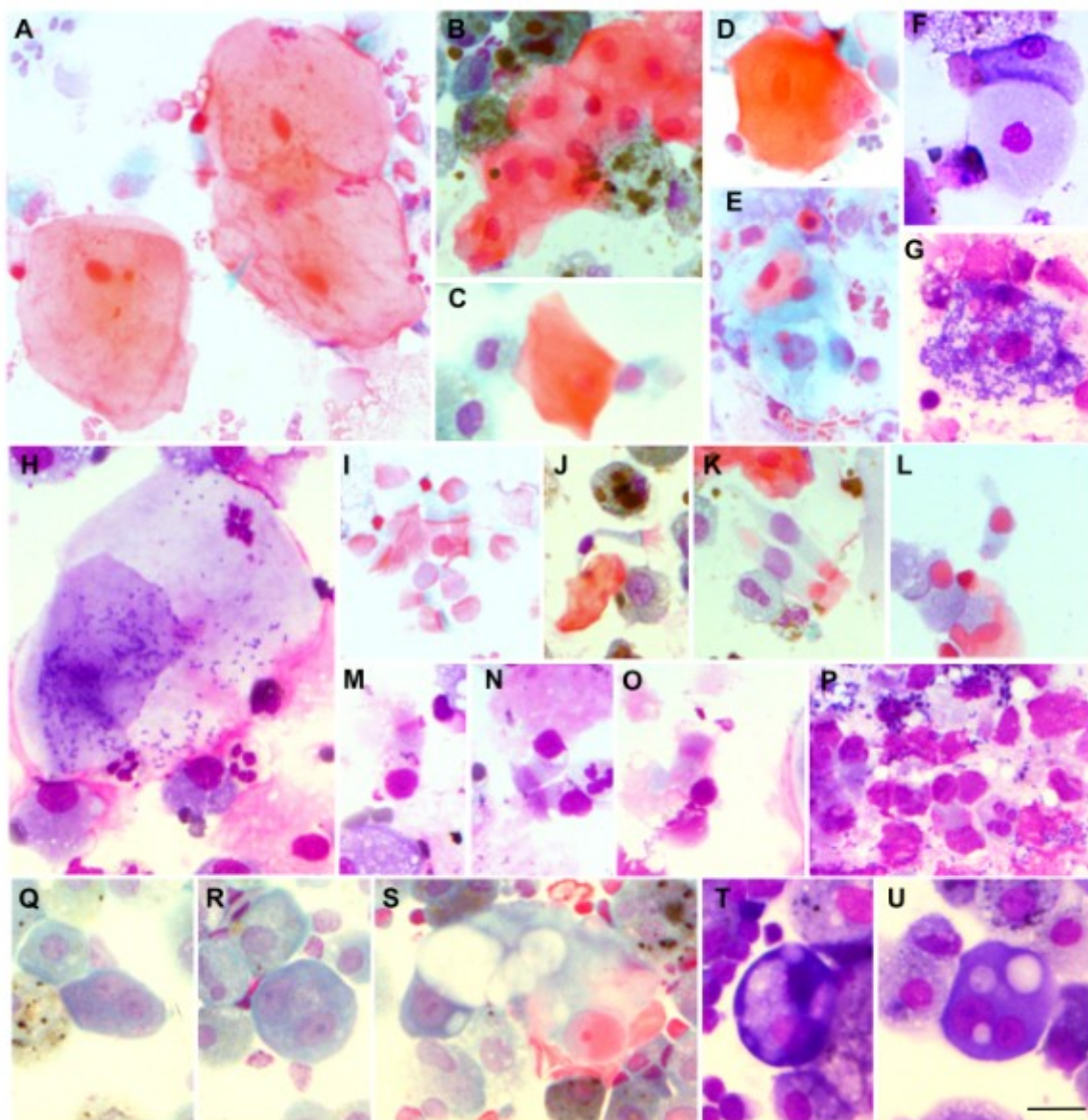
351 - Des colorations spéciales peuvent être réalisées en fonction du contexte clinique pour
352 orienter le diagnostic.

353

354

355

356 **Légende des figures :**



357

358 **Figure 1 : Cellules épithéliales pouvant être observées dans un LBA. A à H :** Cellules
 359 malpighiennes colorées au Papanicolaou (A à E) et au MGG (F à H). A et B : Cellules
 360 malpighiennes superficielles : les cellules sont de grande taille, le noyau est petit et le
 361 cytoplasme très abondant. Le cytoplasme peut être bleu clair, orangé clair ou rosé. C et D :
 362 Cellules malpighienne superficielle parakératosique : le cytoplasme est orange vif. E :
 363 Cellules malpighiennes intermédiaires, le cytoplasme est moins abondant. I à P : Cellules
 364 bronchiques colorées au Papanicolaou (I à L) ou au MGG (M à P). I à K, M et N : Les
 365 Cellules bronchiques sont des cellules cylindriques, dont les cils sont visibles au niveau du
 366 pôle apical et colorés en rose orangé au Papanicolaou. (I, J, K et O). Ces cellules peuvent être
 367 plus difficiles à observer au MGG, les cils étant moins visibles (M et N). L : Cellules ciliées
 368 où la bordure ciliaire est abrasée. P : Cellules bronchiques altérées dans un contexte

d'infection bactérienne. **Q à U** : Pneumocytes colorés au Papanicolaou (**Q à S**) et au MGG (**T à U**). Ces cellules peuvent être nucléolées (**Q, R**) isolées ou regroupées en amas, et vacuolisées (**S, T et U**). Il est important de ne pas les confondre avec des cellules tumorales. Une immunocytochimie peut être nécessaire pour s'assurer de la nature réactionnelle de ces cellules. Le contexte clinique est très important lors de la présence de ce type de cellules dans un LBA. Toutes les images ont été prises au même grossissement. La barre d'échelle représente 20µm.

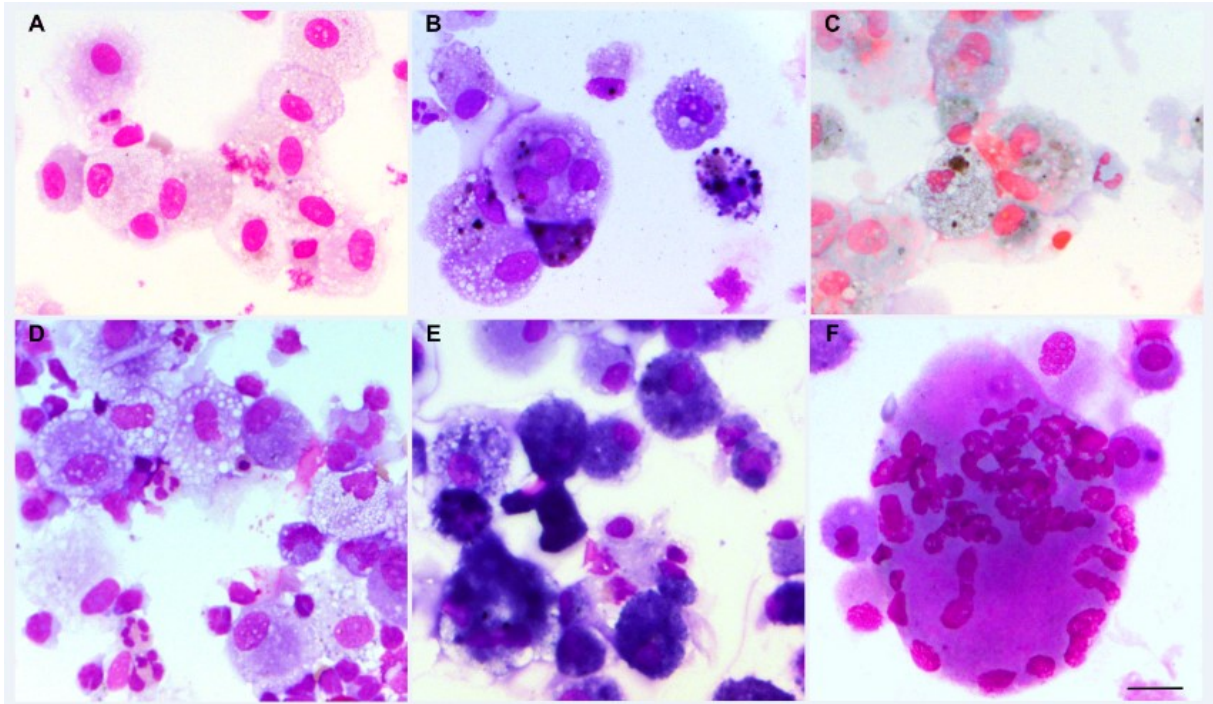


Figure 2 : Macrophages. **A, B, D à F** : Coloration MGG, **C** : Coloration au Papanicolaou. **A** : Macrophages sans inclusion cytoplasmique. **B** : **C** : Macrophages avec inclusions cytoplasmiques en faveur de sidérophages (à confirmer par une coloration de Perls) **D** : Macrophages spumeux (cytoplasme présentant des inclusions lipidiques, à confirmer par coloration d'Oil Red O). **E** : Macrophages au cytoplasme chargé. **F** : Cellule géante multinucléée. Toutes les images ont été prises au même grossissement. La barre d'échelle représente 20µm.

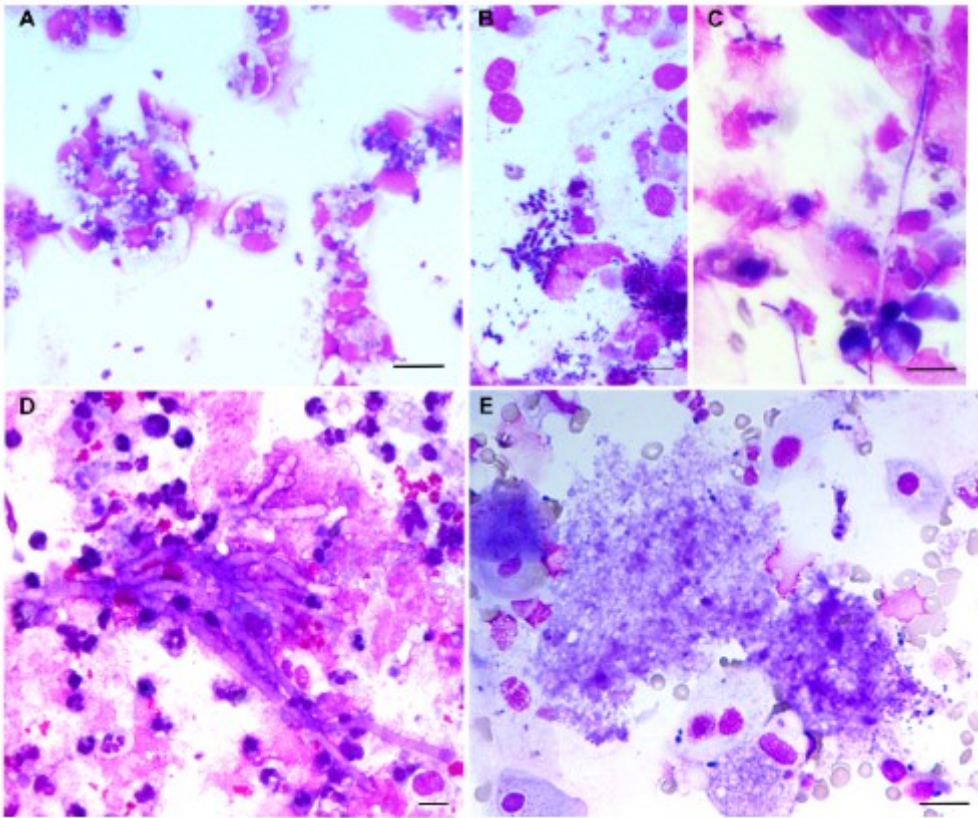
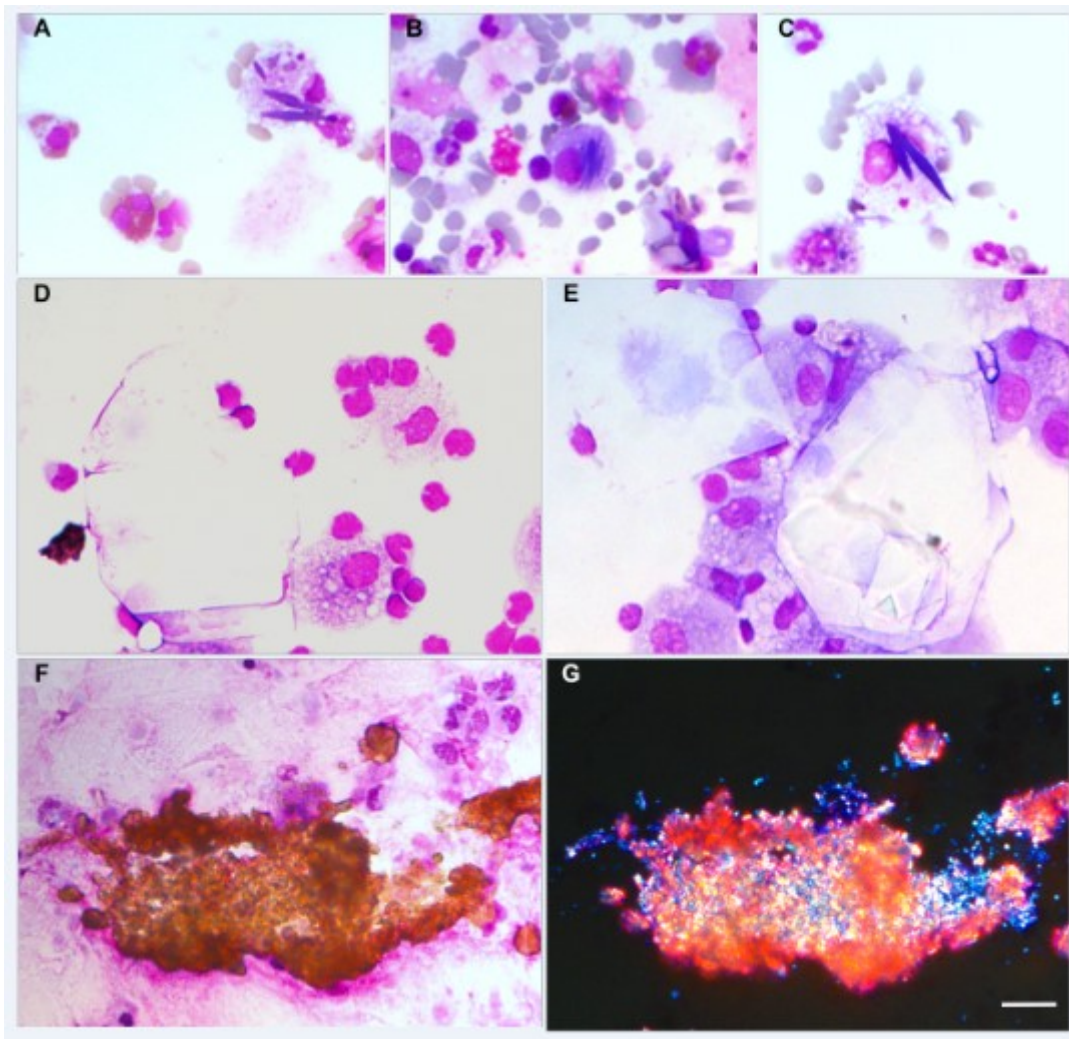


Figure 3 : Des exemples d'infections du LBA. A : Staphylococcus aureus. B et C : Candida albicans sous forme de levure (B) ou ayant filamenté (C). A noter la présence de bactéries en plus de Candida sur la figure B. D : Aspergillus flavus. E : *Pneumocystis*. La caractérisation de ces germes nécessite une analyse microbiologique spécifique. Les colorations utilisées pour analyse cytologique (MGG et Papanicolaou) permettent cependant d'orienter vers le type de microorganisme impliqué (bactérie ou champignon) de manière plus ou moins précise. Toutes les images ont été prises au même grossissement. La barre d'échelle représente 20µm.



392

393 **Figure 4 : Cristaux pouvant être retrouvés dans le LBA. A à C : Cristaux de Charcot-**
 394 **Leyden. Sur ces images les cristaux ont été phagocytés par des macrophages, mais ils peuvent**
 395 **être observés aussi en extracellulaire. D et E : Cristaux de cholestérol reconnaissables par leur**
 396 **grande taille, leur forme géométrique et l'aspect « empilé ».** **F et G : Cristaux de bilirubine :**
 397 **ces cristaux sont marrons et sont réfringents en lumière polarisée (G). Toutes les images ont**
 398 **été prises au même grossissement. La barre d'échelle représente 20µm.**

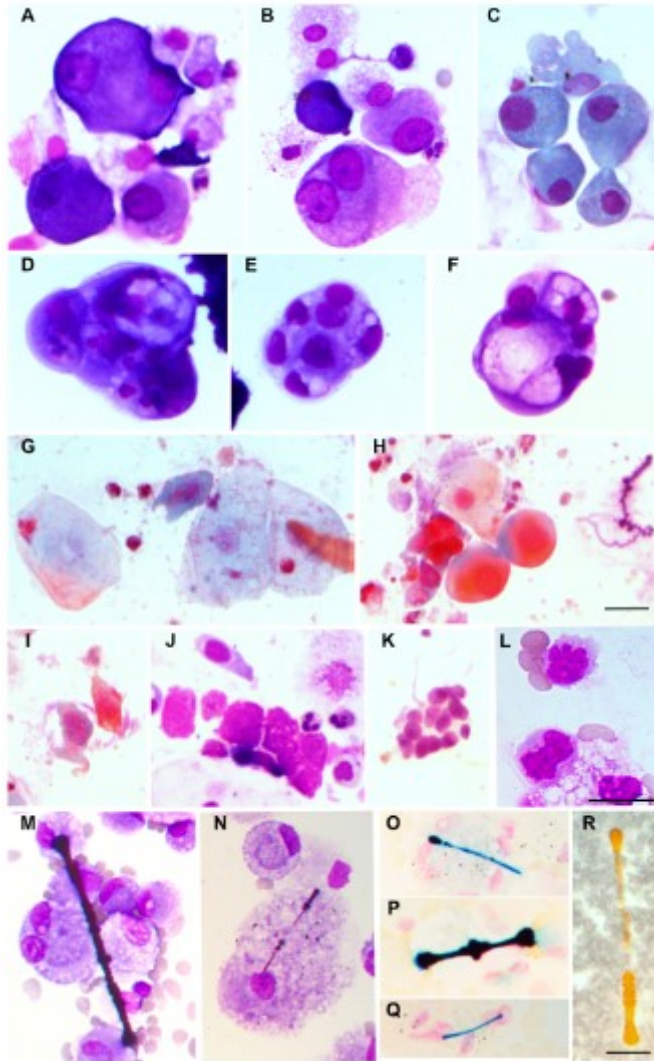
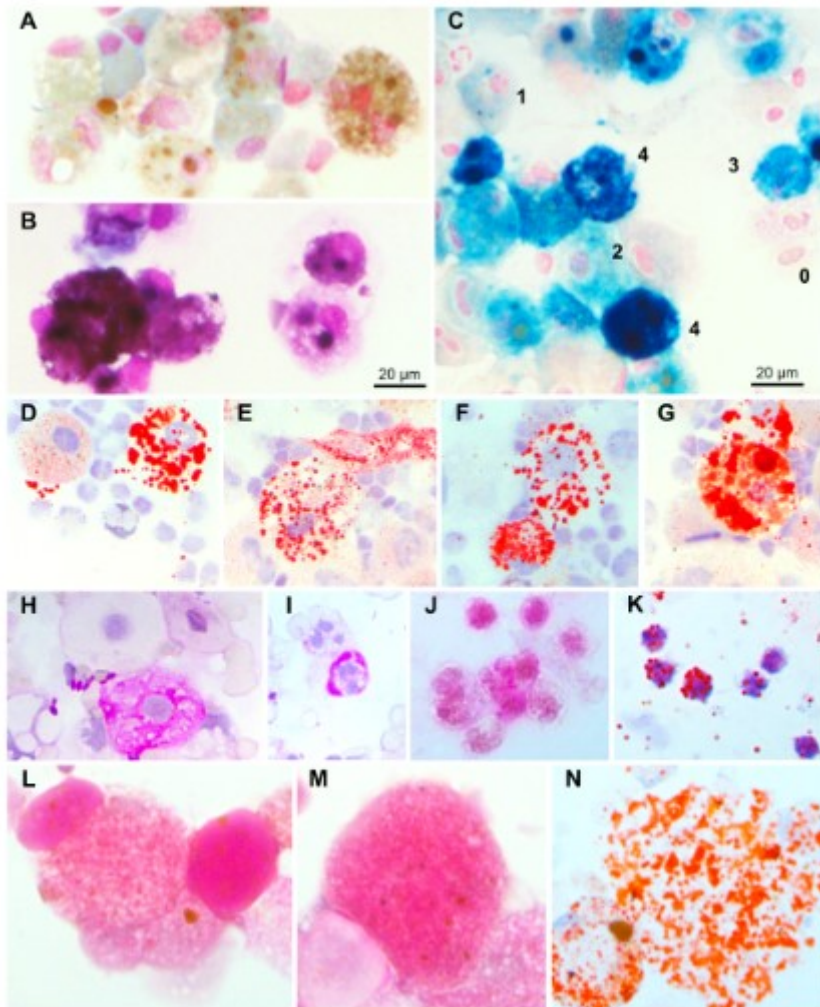


Figure 5 : Cellules malignes et corps asbestosiques. A, B et C : Adénocarcinome bronchique (A et B MGG, C Papanicolaou). D, E et F : Carcinome bronchique non à petites cellules (NOS), coloration MGG. G, H et I : Carcinome épidermoïde, coloration Papanicolaou. H : Spirale de Curschmann visible à droite. J et K : Carcinome neuroendocrine à petites cellules. Au MGG (J), les cellules sont lysées et seuls les noyaux sont encore visibles. Au Papanicolaou (K), les cellules sont mieux conservées grâce à la fixation préalable des cellules ; on note leur petite taille comparée au carcinome non à petites cellules. L : Lymphome T. Toutes les cellules tumorales ont été caractérisées par immunocytochimie (pour les cellules carcinomateuses) ou par cytométrie en flux (pour le lymphome).

M à R : Corps asbestosiques au MGG (M et N), à la coloration de Perls (O à Q, les corps asbestosiques apparaissent bleus grâce à la coloration de l'hémosidérine contenue dans la gaine protéino-ferrugineuse entourant la fibre d'amiante. R : Corps asbestosique non coloré

412 observé sur un filtre après digestion du LBA à l'hypochlorite de sodium. Toutes les images
 413 ont été prises au même grossissement sauf la figure L. Les barres d'échelles représentent 20
 414 μm , les figures sans barre d'échelle ont la même les que figures H et R.



415

416 **Figure 6 : Colorations spéciales :** A, B et C : LBA renfermant des sidérophages. Les
 417 inclusions d'hémossidérine apparaissent verdâtres au Papanicolaou (A) et quasiment noires au
 418 MGG (B). C : Les sidérophages peuvent avoir différentes gradations de bleu qui sont
 419 quantifiées lors de l'établissement du score de Golde. Les chiffres sur la photo indiquent des
 420 exemples de grade en fonction de l'intensité du marquage, utilisés pour le calcul du score de
 421 Golde. D à G, K et N : Coloration d'Oil Red O. Cette coloration permet de mettre en
 422 évidence des inclusions lipidiques dans les macrophages (D à G et N) ou dans d'autres
 423 cellules comme par exemple des polynucléaires neutrophiles (K). Un marquage positif est
 424 visualisé par la présence d'inclusion rouge vif effet « tache d'huile ». Certains macrophages
 425 peuvent avoir des granulations rougeâtres sans être rouge vif et il ne s'agit dans ce cas pas
 426 d'inclusions lipidiques. H, I, J, L et M : coloration PAS. H : une cellule malpighienne et des

levures sont positives. **I** : un polynucléaire neutrophile est positif (en bas) alors qu'un autre est négatif. **J** et **K** : polynucléaires neutrophiles doublement positifs en coloration PAS (**J**) et Oil Red O (**K**). **L** : dépôts extracellulaires positifs en coloration de PAS. **M** et **N** : macrophage doublement positif en coloration de PAS et d'Oil Red O.

Références

1. Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL): Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J.* sept 1990;3(8):937-76.
2. de Blic J, Midulla F, Barbato A, Clement A, Dab I, Eber E, et al. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. *Eur Respir J.* janv 2000;15(1):217-31.
3. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group. *Eur Respir J.* juin 1989;2(6):561-85.
4. Conan PL, Charton F, Gaspard W, Cornetto MA, Zhang L, Le Floch H, et al. Toutes les méthodes de lavage broncho-alvéolaire (LBA) sont-elles comparables ? *Revue des Maladies Respiratoires Actualités.* 1 janv 2022;14(1):69.
5. Tessier V, Chadelat K, Baculard A, Housset B, Clement A. BAL in children: a controlled study of differential cytology and cytokine expression profiles by alveolar cells in pediatric sarcoidosis. *Chest.* juin 1996;109(6):1430-8.
6. Koh YY, Jung DE, Koh JY, Kim JY, Yoo Y, Kim CK. Bronchoalveolar cellularity and interleukin-8 levels in measles bronchiolitis obliterans. *Chest.* mai 2007;131(5):1454-60.
7. Clement A, Chadelat K, Masliah J, Housset B, Sardet A, Grimfeld A, et al. A controlled study of oxygen metabolite release by alveolar macrophages from children with interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis.* déc 1987;136(6):1424-8.
8. Midulla F, Villani A, Merolla R, Bjermer L, Sandstrom T, Ronchetti R. Bronchoalveolar lavage studies in children without parenchymal lung disease: cellular constituents and protein levels. *Pediatr Pulmonol.* août 1995;20(2):112-8.
9. Ratjen F, Bredendiek M, Brendel M, Meltzer J, Costabel U. Differential cytology of bronchoalveolar lavage fluid in normal children. *Eur Respir J.* oct 1994;7(10):1865-70.
10. Olsen HH, Grunewald J, Tornling G, Sköld CM, Eklund A. Bronchoalveolar lavage results are independent of season, age, gender and collection site. *PLoS One.* 2012;7(8):e43644.
11. Meyer KC, Raghu G, Baughman RP, Brown KK, Costabel U, du Bois RM, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of

462 bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care*
463 *Med.* 1 mai 2012;185(9):1004-14.

464 12. Kern I, Kecelj P, Kosnik M, Mermolja M. Multinucleated giant cells in bronchoalveolar
465 lavage. *Acta Cytol.* 2003;47(3):426-30.

466 13. Davidson KR, Ha DM, Schwarz MI, Chan ED. Bronchoalveolar lavage as a diagnostic
467 procedure: a review of known cellular and molecular findings in various lung diseases. *J*
468 *Thorac Dis.* sept 2020;12(9):4991-5019.

469 14. Karimi R, Tornling G, Grunewald J, Eklund A, Sköld CM. Cell recovery in
470 bronchoalveolar lavage fluid in smokers is dependent on cumulative smoking history.
471 *PLoS One.* 2012;7(3):e34232.

472 15. Kerschner H, Jaksch P, Zweytick B, Puchhammer-Stöckl E. Detection of human
473 cytomegalovirus in bronchoalveolar lavage fluid of lung transplant recipients reflects
474 local virus replication and not contamination from the throat. *J Clin Microbiol.* nov
475 2010;48(11):4273-4.

476 16. Stjärne Aspelund A, Hammarström H, Inghammar M, Larsson H, Hansson L, Riise GC,
477 et al. Microbiological findings in bronchoalveolar lavage fluid from lung transplant
478 patients in Sweden. *Transpl Infect Dis.* déc 2018;20(6):e12973.

479 17. Feinstein MB, Habtes I, Giralt S, Stover DE. Utility of Bronchoscopy with
480 Bronchoalveolar Lavage among Hematologic Transplant Recipients in the Era of
481 Noninvasive Testing. *Respiration.* 2021;100(4):339-46.

482 18. Wanner TJ, Gerhardt SG, Diette GB, Rosenthal DL, Orens JB. The utility of
483 cytopathology testing in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* juill
484 2005;24(7):870-4.

485 19. Chen XM, Sun L, Yang K, Chen JM, Zhang L, Han XY, et al. Cytopathological analysis
486 of bronchoalveolar lavage fluid in patients with and without HIV infection. *BMC Pulm*
487 *Med.* 8 févr 2022;22(1):55.

488 20. Gami A, Rinaldi K, Degefe YT, Vosoughi AS, Lee D, Maleki Z. Bronchoalveolar Lavage
489 in a Pediatric Population. *Am J Clin Pathol.* 4 mai 2022;157(5):678-84.

490 21. Ratjen F, Rietschel E, Griesse M, Ballmann M, Kleinau I, Döring G, et al. Fractional
491 analysis of bronchoalveolar lavage fluid cytology in cystic fibrosis patients with normal
492 lung function. Bronchoalveolar lavage for the evaluation of anti-inflammatory treatment
493 (BEAT) study group. *Eur Respir J.* janv 2000;15(1):141-5.

494 22. De Giacomo F, Vassallo R, Yi ES, Ryu JH. Acute Eosinophilic Pneumonia. Causes,
495 Diagnosis, and Management. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mars 2018;197(6):728-36.

496 23. Cottin V. Eosinophilic Lung Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North*
497 *America.* 1 mai 2023;43(2):289-322.

498 24. Bronchoalveolar lavage in asthma. An update and perspective - PubMed [Internet]. [cité
499 19 oct 2023]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8342920/>

- 500 25. Zhang N, Chen Y, Tang L, Zhou D, Hou T. Diagnosis of bronchobiliary fistula by
501 bilirubin crystallization in the alveolar lavage fluid: case reports and literature review.
502 Ann Palliat Med. juin 2021;10(6):7121-5.
- 503 26. Domagala-Kulawik J. The relevance of bronchoalveolar lavage fluid analysis for lung
504 cancer patients. Expert Rev Respir Med. mars 2020;14(3):329-37.
- 505 27. de Gracia J, Bravo C, Miravittles M, Tallada N, Orriols R, Bellmunt J, et al. Diagnostic
506 value of bronchoalveolar lavage in peripheral lung cancer. Am Rev Respir Dis. mars
507 1993;147(3):649-52.
- 508 28. Ministère de la Transition écologique [Internet]. [cité 21 avr 2022]. Amiante dans la
509 construction. Disponible sur: <https://www.ecologie.gouv.fr/amiante-dans-construction>
- 510 29. De Vuyst P, Karjalainen A, Dumortier P, Paire JC, Monsó E, Brochard P, et al.
511 Guidelines for mineral fibre analyses in biological samples: report of the ERS Working
512 Group. European Respiratory Society. Eur Respir J. juin 1998;11(6):1416-26.
- 513 30. RG 30. Tableau - Tableaux des maladies professionnelles - INRS [Internet]. [cité 20 avr
514 2022]. Disponible sur:
515 <https://www.inrs.fr/publications/bdd/mp/tableau.html?refINRS=RG%2030>
- 516 31. Parrot A, Fartoukh M, Cadranel J. [Alveolar hemorrhage]. Rev Mal Respir. avr
517 2015;32(4):394-412.
- 518 32. De Lassence A, Fleury-Feith J, Escudier E, Beaune J, Bernaudin JF, Cordonnier C.
519 Alveolar hemorrhage. Diagnostic criteria and results in 194 immunocompromised hosts.
520 Am J Respir Crit Care Med. janv 1995;151(1):157-63.
- 521 33. Golde DW, Drew WL, Klein HZ, Finley TN, Cline MJ. Occult pulmonary haemorrhage
522 in leukaemia. Br Med J. 26 avr 1975;2(5964):166-8.
- 523 34. Sherman JM, Winnie G, Thomassen MJ, Abdul-Karim FW, Boat TF. Time course of
524 hemosiderin production and clearance by human pulmonary macrophages. Chest. sept
525 1984;86(3):409-11.
- 526 35. Sadofsky LR, Hayman YA, Hart SP, Morice AH. Lipid Laden Macrophages in
527 Respiratory Disease. J Neurogastroenterol Motil. 30 juill 2017;23(3):477-8.
- 528 36. Gratadour P, Védrette JM, Guillaume C, Gagnieu MC, Motin J. [Intra-macrophage lipid
529 particles collected by bronchoalveolar lavage: incidence and diagnostic value]. Ann Fr
530 Anesth Reanim. 1993;12(5):462-8.
- 531 37. Maddock SD, Cirulis MM, Callahan SJ, Keenan LM, Pirozzi CS, Raman SM, et al.
532 Pulmonary Lipid-Laden Macrophages and Vaping. N Engl J Med. 10 oct
533 2019;381(15):1488-9.
- 534 38. Jouneau S, Ménard C, Lederlin M. Pulmonary alveolar proteinosis. Respirology. août
535 2020;25(8):816-26.

- 536 39. Auerswald U, Barth J, Magnussen H. Value of CD-1-positive cells in bronchoalveolar
537 lavage fluid for the diagnosis of pulmonary histiocytosis X. *Lung*. 1991;169(6):305-9.
- 538 40. Phulware RH, Guleria P, Iyer VK, Bakhshi S, Seth R, Mridha AR, et al. Cytological
539 diagnosis of Langerhans cell histiocytosis: A series of 47 cases. *Cytopathology*.
540 2019;30(4):413-8.
- 541 41. Néel A, Artifoni M, Donadieu J, Lorillon G, Hamidou M, Tazi A. Histiocytose
542 langerhansienne de l'adulte. *La Revue de Médecine Interne*. 1 oct 2015;36(10):658-67.

543

544

545 **Liens d'intérêt**

546 Les auteurs n'ont pas de lien d'intérêt à déclarer.

547

548