



HAL
open science

Bêta-thalassémie majeure et lymphocytose. Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patients suivis au CHRU de Nancy

Hélène Schwaller

► To cite this version:

Hélène Schwaller. Bêta-thalassémie majeure et lymphocytose. Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patients suivis au CHRU de Nancy. Sciences pharmaceutiques. 2016. hal-01732194

HAL Id: hal-01732194

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732194v1>

Submitted on 14 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE
2016**

FACULTE DE PHARMACIE

**MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 26 septembre 2016

par SCHWALLER Hélène
née le 30 octobre 1989

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

**THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE**

**BÊTA-THALASSEMIE MAJEURE ET LYMPHOCYTOSE
Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patients
suivis au CHRU de NANCY.**

Membres du Jury

Président :	Mme Béatrice Faivre	PU, <i>Biologie cellulaire, hématologie</i> - Université de Lorraine.
Juges :	M. Julien Perrin	MCU-PH, <i>Hématologie</i> - Université de Lorraine - CHRU de Nancy (directeur de thèse)
	M. Julien Broséus	MCU-PH, <i>Hématologie</i> - Université de Lorraine - CHRU de Nancy
	Mme Dominique Steschenko	PH, <i>Pédiatrie</i> - CHRU de Nancy
	M. Pierre Feugier	PU-PH, <i>Hématologie</i> - Université de Lorraine - CHRU de Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Igor CLAROT

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Françine KEDZIEREWICZ

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POUCHON

Anne ROVEL

Gabriel TROCKLE

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS	Section CNU*	Discipline d'enseignement
PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>
PROFESSEURS DES UNIVERSITES		
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT ☿	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS		
Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE ☿	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Marianne PARENT ☒	85	Pharmacie galénique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET ☒	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☒ *En attente de nomination****Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

D'e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

À Madame le Professeur Béatrice FAIVRE, président du jury,

PU, Faculté Pharmacie de Nancy, Université de Lorraine :

*Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury.
Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance.*

À Monsieur le Docteur Julien PERRIN, directeur de thèse,

MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Université de Lorraine - Service d'hématologie biologique, CHRU de Nancy :

Merci pour ta confiance tout au long de ce travail et tout le temps que tu m'as consacré. C'était un réel plaisir de travailler avec toi.

À Monsieur le Docteur Julien BROSEUS,

MCU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine - Service d'hématologie biologique, CHRU de Nancy :

Merci pour ta pédagogie, ton amitié et ces longues heures passées derrière le microscope à lire les myélogrammes, tu nous as beaucoup appris.

À Madame le Docteur Dominique STESCHENKO,

PH, Service d'oncologie pédiatrique, CHRU de Nancy :

Merci pour votre contribution, sans vous ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de venir le juger.

À Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER,

PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine - Service d'hématologie clinique, CHRU de Nancy :

*Je vous remercie de me faire l'honneur de participer au jury de soutenance.
Je vous exprime ici mon plus profond respect.*

Au personnel du laboratoire d'hématologie :

*Je remercie tout particulièrement les techniciennes de la plateforme de cytométrie en flux, sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour votre patience et votre implication, j'ai vraiment apprécié de travailler avec vous.
Je remercie aussi l'ensemble des biologistes pour leur gentillesse et le temps qu'ils ont accordé à notre formation.*

À mes parents :

Je tiens bien évidemment à vous remercier. Vous m'avez toujours soutenue. Si je suis là aujourd'hui c'est en immense partie grâce à vous. Merci de m'avoir donné les moyens et la motivation nécessaires pour réussir mes études. Votre présence en ce jour est tellement chère à mes yeux.

À mes grands-parents, oncles, tantes et cousin(e)s :

Les moments en votre compagnie sont toujours un réel plaisir. Il paraît qu'on ne choisit pas sa famille, mais je suis certaine que je n'aurais pas pu trouver mieux.

À mes amis de toujours :

À **Sandra**, je te remercie pour tous nos bons moments : de notre époque « Barbies » puis « Spice Girls », jusqu'aujourd'hui et encore de nombreuses années à venir. C'est avec une immense joie que je serai témoin de votre mariage.

À **Marion**, à nos voyages et nos weekends à parcourir le monde, et oublie pas que "si tu fais ça je rentre chez moi !".

À **Héloïse**, ma voisine chérie, une fille avec un cœur immense. On t'aime malgré tous tes petits tocs et ton arachnophobie ;))

À **Maud**, la femme parfaite à laquelle on aimerait toutes ressembler.

À **Thomas**, merci de m'avoir supportée et soutenue pendant l'année du concours, je te dois énormément pour ça.

À **Julie, Vénicia, Kral, Tristan, Sofien, Lucas, Moumou, Nion, Flory**. À tous nos moments qui ont commencé au « brack » pour finir dans vos magnifiques maisons.

À ma coloc' et amie Katty :

C'est un plaisir de rentrer à l'appartement pour m'affaler sur le canapé avec toi et regarder « la culture ». Je remercie Hospitalor de nous avoir présentées, il aura fait quelque chose de bien.

À mes amis biologistes que j'ai eu la chance de rencontrer durant mon internat :

À **Anaëlle**, tu es une fille géniale sur qui on peut toujours compter et qui a toujours un mot ou une pensée pour nous. Ta sudation inter-pectorale ne change rien à tout l'amour que j'ai pour toi.

À **Charlotte**, tu es une fille adorable et d'une immense gentillesse, à toutes nos soirées et nos voyages passés et à venir. « Foutu pour foutu ».

A **Alexandre**, incontestablement mon meilleur ami, sans toi c'est beaucoup moins drôle. Tu me manques !

À **Brib's**, notre Briec, l'homme de toutes les situations et adulé de tous/toutes, ce dernier stage en ta compagnie est un réel plaisir.

À **Charles**, notre ami et pilote automobile adoré, Nancy sans toi c'est aussi tout de suite moins drôle.

À **Benoit** et **FX**, on n'oubliera jamais « le championnat du Périgord » et vous ne me remercierai jamais assez pour la culture que j'ai pu vous apporter.

À **Alexandra** et notre super séjour à Epinal, grâce à toi cette escapade Vosgienne fut un réel plaisir.

À **Christine**, ce petit séjour à Ars Laquenexy en ta compagnie était vraiment plaisant.

À tous les autres avec qui j'apprécie tous les moments.

À vous :

À ma **Katou Katou**, merci **Quentin** de nous avoir présentées. Tu es une amie en or et d'une générosité inégalable, merci pour ton soutien et ton amitié sans failles. Je suis tellement heureuse d'être ton futur témoin.

À **Lauriane et Mathilde**, je remercie l'hématologie d'avoir pu nous réunir. Lauriane tu es à la fois notre amie, notre avocate, notre agent immobilier, notre banquière... mais surtout ma maman ;). J'espère partager encore plein de bons moments avec vous !

À **Fanny**, notre monégasque, une fille super, surtout ne change pas.

À **Julie**, la douceur incarnée, j'apprécie tous les moments passés avec toi.

À **Charlotte**, les moments passés avec toi sont un réel plaisir, ne change surtout rien (même pas ton débit de parole 0:-)).

À **Claire, Charlotte et Marion**, merci les filles pour tous les moments passés et surtout nos soirées à danser sur les chansons de Gilbert Montagné. A nos vacances ensembles passées et à venir. Grâce à vous les étés à Nancy ont été géniaux.

Et à tous les autres dont j'ai toujours le plaisir de voir.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	7
TABLE DES FIGURES	18
TABLE DES TABLEAUX	20
LISTE DES ABREVIATIONS	22
GENERALITES β-THALASSEMIES	23
I. Hémoglobinopathies et β -thalassémie.....	23
1. Rappels sur l'hémoglobine	23
2. Les hémoglobinopathies	24
3. Les β -thalassémies	25
II. Epidémiologie	25
III. Classification des syndromes β-thalassémiques	25
IV. La β -thalassémie majeure	27
1. Physiopathologie	27
2. Clinique.....	27
3. Diagnostic biologique	28
4. Prise en charge thérapeutique.....	34
5. Evolution sous traitement et complications	37
V. β -thalassémie intermédiaire	40
1. Physiopathologie	40
2. Clinique.....	41
3. Diagnostic biologique	42
4. Prise en charge thérapeutique.....	42
VI. β -thalassémie mineure	42
PROBLEMATIQUES.....	43
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	44
1. Description de la lymphocytose.....	44
2. Origine(s) possible(s) de cette hyperlymphocytose.....	49
1. Perturbations immunologiques liées à la surcharge martiale.....	49
2. Perturbations immunologiques liées aux transfusions régulières	49
3. Perturbations immunologiques liées à la splénectomie	50
4. Perturbations immunologiques liées à la co-infection par le virus de l'hépatite C	52
5. Perturbations immunologiques liées aux carences en zinc.....	53

6. Conclusions	54
MATERIELS ET METHODES	56
ANALYSE DES RESULTATS.....	58
I. Etude interindividuelle	58
II. Etude intraindividuelle	66
III. Problématique subsidiaire :	79
DISCUSSION	82
CONCLUSION.....	84
BIBLIOGRAPHIE	85

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Sites d'érythropoïèse et ratio de synthèse des différentes chaînes de globines de la conception au stade adulte (4)	24
Figure 2 : Physiopathologie de la β -thalassémie d'après Philippe Joly et al (3) .	27
Figure 3 : Métabolisme et homéostasie du fer (8). FPN : ferroportine, RBC : red blood cells.	38
Figure 4 : Régulation de l'hepcidine dans la β -thalassémie majeure. (A) Avant transfusion, l'hyperactivité érythropoïétique supprime la sécrétion d'hepcidine. (B) Après transfusion, la baisse de l'activité érythropoïétique conduit à une augmentation de sa synthèse (11)	39
Figure 5 : Physiopathologie et complications cliniques des patients chez les NTBT d'après Mussallam KM et al (16).....	41
Figure 6 : LyTCD8 en fonction du nombre d'unités transfusionnelles reçues chez les patients non splénectomisés (A) et les patients splénectomisés (B). LyTCD4 en fonction du nombre d'unités transfusionnelles reçues chez les patients non splénectomisés (C) et les patients splénectomisés (D). Rapport LyTCD4/LyCD8 en fonction du nombre d'unités transfusionnelles reçues chez les patients non splénectomisés (E) et les patients splénectomisés (F) (18)	45
Figure 7 : Corrélation entre LyTCD4/LyTCD8 en fonction du nombre de CGR reçus (a) et de la ferritinémie (b)(19)	46
Figure 8 : Corrélation entre la concentration d'ARN du VHC circulant et le pourcentage des différentes populations lymphocytaires d'après Y Huang et al (44).....	53
Figure 9 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie (A) et rapport LyTCD4/LyTCD8 en fonction de la ferritinémie (B).....	60
Figure 10 : Répartition des proportions des populations lymphocytaires chez les patients splénectomisés (en rouge) et non splénectomisés (en orange). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; NS : non significatif.	63
Figure 11 : Comparaison de la numération de chaque population lymphocytaire chez les patients splénectomisés (en rouge) vs non splénectomisés (en orange). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; NS : non significatif.	64
Figure 12 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez les patients splénectomisés (A) et chez les patients non splénectomisés (B)	64
Figure 13 : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps chez le patient A entre 2006 et 2015	67

Figure 14 : Patient A : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie	68
Figure 15 : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps chez le patient B	71
Figure 16 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez le patient B	72
Figure 17 : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps chez le patient C	74
Figure 18 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez le patient C	75
Figure 19 : patient D : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps.....	77
Figure 20 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez le patient D	78

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification et caractéristiques des syndromes β -thalassémiques (5)	26
Tableau II : Caractéristiques des différentes techniques chromatographiques utilisées (5)	30
Tableau III : Caractéristiques des différentes techniques électrophorétiques utilisées (5)	31
Tableau IV : Caractéristiques des différentes techniques de biologie moléculaire utilisées pour le diagnostic des hémoglobinopathies (5)	33
Tableau V : Complications transfusionnelles d'après Renzo Galanello et Raffaella Origa (3)	35
Tableau VI : Principales caractéristiques des différents chélateurs d'après la HAS (2)	36
Tableau VII : Variation des populations lymphocytaires en fonctions de différentes situations cliniques	55
Tableau VIII : Paramètres et caractéristiques des patients de la cohorte	59
Tableau IX : Comparaison de la lymphocytose par tranche d'âge avec la population générale. * : $p < 0,05$	60
Tableau X : Comparaison des populations lymphocytaires entre les patients splénectomisés et non splénectomisés. * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; NS : non significatif	62
Tableau XI : Caractéristiques du patient A	66
Tableau XII : Patient A : Variation des paramètres biologiques	67
Tableau XIII : Patient A : Populations lymphocytaires à T=0 et T=3mois	70
Tableau XIV : Caractéristiques patient B	70
Tableau XV : Patient B : Variation des paramètres biologiques	71
Tableau XVI : Variation de paramètres biologiques sur 6 mois	72
Tableau XVII : Patient B : populations lymphocytaires à t=0 et t=3mois	73
Tableau XVIII : Patient C : Variation des paramètres biologiques	74
Tableau XIX : Patient C : populations lymphocytaires à t=0 et t=3mois	76

Tableau XX : Caractéristiques patient D	76
Tableau XXI : Patient D : Paramètres statistiques des variables biologiques.....	77
Tableau XXII : Patient D : populations lymphocytaires à t=0 et t=3mois.....	78
Tableau XXIII : Comparaison du compte lymphocytaire par trois techniques différentes.....	81

LISTE DES ABREVIATIONS

CGR	Concentré de globules rouges
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CMF	Cytométrie en flux
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
EPO	Erythropoïétine
HbA	Hémoglobine A
HbF	Hémoglobine F
HAS	Haute autorité de santé
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN	Interféron
IgS	Immunoglobuline de surface
IL	Interleukine
LGL	<i>Large Granular Lymphocyte</i>
Ly	Lymphocyte
LyB	Lymphocyte B
LyNK	Lymphocyte Natural Killer
LyT	Lymphocyte T
LyTCD4	Lymphocyte T CD4+
LyTCD8	Lymphocyte T CD8+
NK	<i>Natural Killer</i>
PNS	Patients non splénectomisés
PS	Patients splénectomisés
NRBC	<i>Nucleated red blood cells</i>
RBC	<i>Red blood cells</i>
NTDT	<i>Non-transfusion-dependent thalassemia</i>
SLP	Syndrome lymphoprolifératif
TRIM	<i>Transfusion-related immunomodulation</i>
VHC	Virus de l'hépatite C
VN	Valeurs normales

GENERALITES β -THALASSEMIES

(1-3)

I. Hémoglobinopathies et β -thalassémie

1. Rappels sur l'hémoglobine

Il est essentiel de rappeler la composition **de l'hémoglobine** et ses fonctions afin de bien comprendre la physiopathologie de la β -thalassémie.

L'hémoglobine est la principale constituante des érythrocytes. Son rôle majeur est le transport de l'oxygène dans l'organisme. Une molécule **d'hémoglobine** est constituée de 4 hétéro-dimères, chacun de ces hétéro-dimères comporte une partie protéique : la globine, et une partie non protéique : **l'hème.**

Différents types de globines sont synthétisées :

- **L'alpha 1 et l'alpha 2** globines dont les loci sont situés sur le chromosome 16.
- La bêta globine, la delta globine et la gamma globine dont les loci sont situés sur le chromosome 11.

En fonction de l'association des différentes chaînes de globines, on distingue différents types **d'hémoglobines** physiologiques :

- **L'hémoglobine A** constituée de deux chaînes alpha et deux chaînes bêta
- **L'hémoglobine A2** constituée de deux chaînes alpha et deux chaînes delta
- **L'hémoglobine F** constituée de deux chaînes alpha et deux chaînes gamma.

La répartition des différentes hémoglobines varie en fonction de **l'âge**, car la synthèse des chaînes de globines est elle-même variable selon les périodes de la vie (figure 1) ; ainsi **l'hémoglobine majoritaire à la naissance est l'hémoglobine F.** Elle diminue progressivement durant les 6 premiers mois de la vie, elle **s'accompagne en parallèle d'une augmentation de l'hémoglobine A.** Cette dernière étant l'hémoglobine majoritaire **chez l'adulte.**

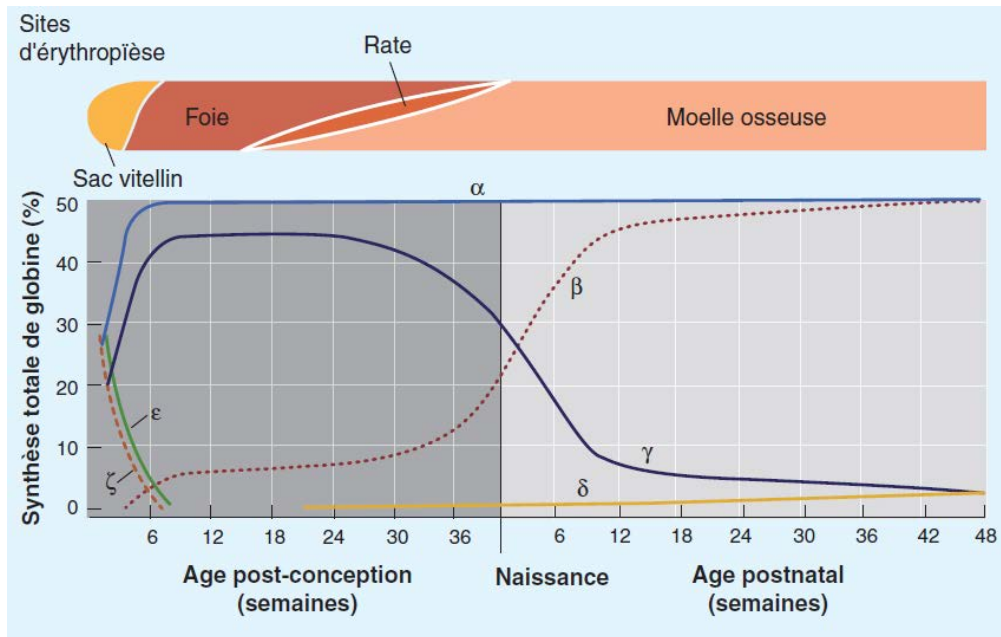


Figure 1 : Sites d'érythropoïèse et ratio de synthèse des différentes chaînes de globines de la conception au stade adulte (4)

2. Les hémoglobinopathies

On distingue deux types de variations pathologiques :

- **Les anomalies qualitatives** : mutation d'un gène codant pour une globine entraînant une synthèse d'une globine anormale. On parle alors de « variants » de l'hémoglobine. Nombre d'entre eux sont connus, la grande majorité n'ayant aucun retentissement clinico-biologique. Parmi les variants d'intérêt en termes pathologiques, les plus fréquents sont l'hémoglobine S, l'hémoglobine C et l'hémoglobine E.
- **Les anomalies quantitatives** : synthèse diminuée ou nulle d'une chaîne de globine entraînant ainsi des perturbations dans la synthèse de l'hémoglobine. L'ensemble de ces anomalies constitue les thalassémies. En fonction de la chaîne de globine affectée, on distingue les α -thalassémies, les β -thalassémies ou encore des δ/β -thalassémies.

3. Les β -thalassémies

Elles regroupent l'ensemble des hémoglobinopathies avec diminution ou absence de synthèse de β -globine. Plus de 200 mutations affectant le gène sont décrites. Ces mutations sont classées en trois groupes (3):

- Mutation β^0 : absence de production de la chaîne β lorsqu'elle est à l'état homozygote.
- Mutation β^+ : diminution de la production de la chaîne β à l'état homozygote (environ 10% de production résiduelle).
- Mutation β^{++} : faible diminution de la production de la chaîne β à l'état homozygote.

Il existe aussi des formes rares de β -thalassémies majeures avec synthèse conservée mais la chaîne β est anormale. Ces chaînes sont très instables et précipitent dans les érythroblastes (3).

II. Epidémiologie

Les syndromes β -thalassémiques sont très répandus dans le bassin méditerranéen, au Moyen Orient, en Afrique de l'Ouest et en Asie. Les prévalences du portage hétérozygote et les types de mutations sont très variables en fonction des régions.

En France on compte un peu plus de 500 patients β -thalassémiques majeurs. La fréquence des porteurs à l'état hétérozygote est de 0,005%. La plupart sont dans les zones d'immigration dont les plus importantes sont Paris, Lyon et Marseille (3).

III. Classification des syndromes β -thalassémiques

La classification est clinico-biologique, on distingue essentiellement 3 catégories :

- La β -thalassémie mineure
- La β -thalassémie intermédiaire appelée aussi « *Non Transfusion-Dependent Thalassemia* »
- La β -thalassémie majeure appelée aussi « *Transfusion-Dependent Thalassemia* »

Tableau I : Classification et caractéristiques des syndromes β -thalassémiques (5)

Statut génétique	Tableau clinique	Diagnostic biologique		
		NFS	Etude de l'Hb	Remarques
β -thalassémies hétérozygotes	Asymptomatique => conseil génétique	Microcytose isolée ou pseudopolyglobulie microcytaire hypochrome ou, plus rarement, légère anémie microcytaire	- \uparrow HbA ₂ (4 à 5 %) - \uparrow HbF associée (2 à 7 %) dans 30 à 50 % des cas <i>Remarque :</i> Taux d'HbA ₂ et F dépendant du type d'anomalie génétique en cause	Causes susceptibles d'abaisser le taux d'HbA ₂ et de masquer une β -thalassémie mineure : - carence en fer -> renouveler l'étude de l'Hb si la microcytose persiste après avoir corrigé la carence martiale ; - grossesse : devant une NFS évocatrice, il est recommandé de faire une étude de l'Hb chez le conjoint ; - période néonatale : pendant cette période, le taux d'HbA ₂ est bas et le diagnostic n'est pas possible ; - plus rarement : δ -thalassémie associée en cis ou en trans diminuant le taux d'HbA ₂ ; - carence en folates.
β -thalassémies intermédiaires	Définition clinique : expression plus sévère que celle d'une thalassémie mineure sans toutefois atteindre celle d'une thalassémie majeure => transfusions sanguines exceptionnelles => conseil génétique	Anémie microcytaire (Hb entre 6 et 9 g/dl)	- \uparrow HbF - \uparrow HbA ₂ - HbA absente ou \downarrow <i>Remarque :</i> Taux variables en fonction du type d'anomalies moléculaires en cause -> doit être complétée par des techniques de biologie moléculaire qui précisent la nature des anomalies et permettent de rechercher une α -thalassémie associée.	Sur le plan moléculaire, on retrouve : - homozygoties ou hétérozygoties composites pour des thalassémies peu graves (exemple : HbE/ β -thalassémie) ; - thalassémie majeure dont l'expression est atténuée par une autre anomalie (exemple : synthèse élevée d'HbF) ; - association aggravant une atteinte hétérozygote (exemple : tripllication α aggravant une β -thalassémie) ; - association thalassémie/Hb instable.
β -thalassémies majeures	Anémie apparaissant au cours des premiers mois de vie -> évolution fatale en l'absence de transfusions sanguines	Anémie microcytaire hypochrome (Hb < 7 g/dl)	- $\uparrow\uparrow$ HbF - HbA ₂ normale ou \uparrow - HbA : absente dans les β^0 -thalassémies, $\downarrow\downarrow$ dans les β^+ -thalassémies.	

IV. La β -thalassémie majeure

1. Physiopathologie

Elle est caractérisée par l'absence totale ou quasi-totale de synthèse de la chaîne de globine β entraînant une absence (quasi) totale d'HbA. Un mécanisme compensateur se met dès lors en place entraînant une synthèse accrue d'HbF, cela n'est néanmoins pas suffisant pour pallier le déficit complet d'HbA. Il en résulte donc une diminution de l'hémoglobine totale avec instauration d'une anémie microcytaire hypochrome. De plus, on observe un excès de chaînes d'alpha globine qui précipitent dans les érythroblastes entraînant une hémolyse intramédullaire. L'ensemble de ces éléments conduit à une érythropoïèse inefficace.

En réponse à l'anémie, une synthèse accrue d'érythropoïétine se met en place entraînant ainsi une hyperplasie érythroïde réactionnelle secondaire. Cette hyperactivité de la moelle est responsable de la déformation osseuse retrouvée chez les patients non traités.

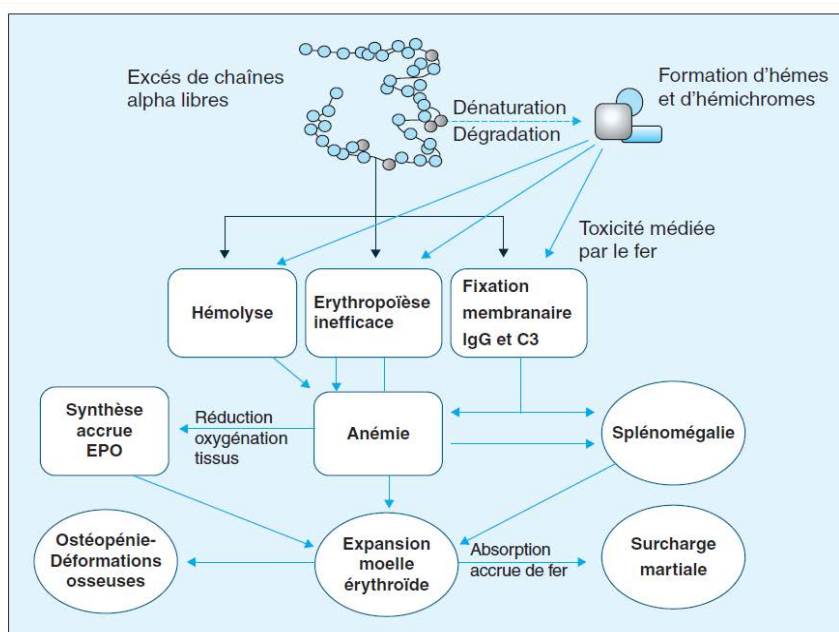


Figure 2 : Physiopathologie de la β -thalassémie d'après Philippe Joly et al (3)

2. Clinique

Elle est dominée par le développement progressif d'un syndrome anémique avec hépatosplénomégalie. L'anémie est majeure, entre 5 et 7g/dL. Elle est diagnostiquée le plus souvent entre 6 et 24 mois de vie, au moment où la synthèse des chaînes est censée décroître au profit des chaînes β (figure 1).

L'évolution est péjorative. L'hyperactivité érythroblastique et la sévérité de l'anémie entraînent des retards de croissance et des déformations osseuses

importantes (déformations mongoloïdes caractéristiques de la face et du crâne). **L'espérance de vie en l'absence d'une prise en charge appropriée est d'une vingtaine d'années.** Cette évolution est néanmoins devenue exceptionnelle grâce au diagnostic précoce et aux traitements mis en place.

La morbi-mortalité des patients traités par transfusions régulières est essentiellement liée à la surcharge martiale et aux autres complications transfusionnelles. Ces complications seront détaillées plus loin.

3. Diagnostic biologique

1) Signes biologiques d'orientation

L'hémogramme est marqué par une anémie profonde : hémoglobine nettement diminuée (<8g/dL) associée à une microcytose (VGM<80fL) et à une hypochromie (TCMH<32pg).

Le frottis sanguin montre des anomalies érythrocytaires signant la dysérythropoïèse : **présence d'une** anisopoikilocytose avec hématies en cible, hématies présentant des ponctuations basophiles, et hématies en larmes (dacryocytes) si une splénomégalie est présente.

Face à ces anomalies, la première **étape est d'effectuer** le diagnostic différentiel avec les autres anémies microcytaires : notamment **l'anémie par carence martiale et l'anémie inflammatoire.**

2) Diagnostic étiologique

Etude phénotypique :

D'après les recommandations du Réseau DHOS 'Pathologie héréditaire de l'érythrocyte', l'étude de l'hémoglobine doit comporter **aux moins 3 tests phénotypiques** (comprenant au moins une technique électrophorétique) parmi ceux-ci :

- Méthodes chromatographiques : chromatographie liquide haute performance par **échanges d'ions**, CLHP en phase inverse des chaînes de globines.
- Méthodes électrophorétiques : iso-électrolocalisation, électrophorèse capillaire, électrophorèse de l'hémoglobine à pH alcalin ou acide.
- Test spécifique : par exemple, **test d'Itano** si suspicion d'HbS (4).

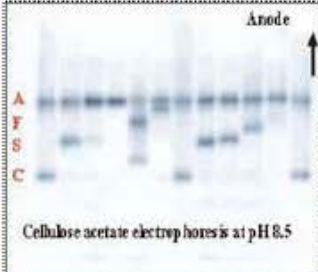
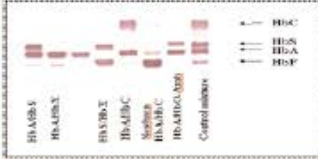

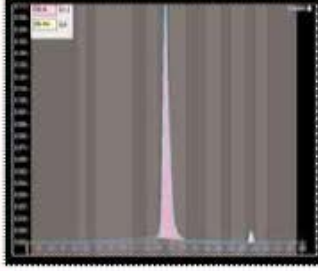
Le syndrome β -thalassémique majeur s'exprime par :

- **L'absence totale d'hémoglobine A**
- **HbF > 80% et HbA2 > 3.5%**

Tableau II : Caractéristiques des différentes techniques chromatographiques utilisées (5)

TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES					
	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
<p>Chromatographie liquide* sur colonne échangeuse de cations (CL-EC)</p> <p>* CLHP</p>	<p>Les différentes fractions d'hémoglobine sont séparées par un gradient de tampons de force ionique et de pH croissants</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Automatisée et adaptée à de grandes séries - Calibrée -> excellente précision pour le dosage des fractions HbA₂ et HbF - Identification présomptive des variants les plus courants (HbS, HbC) faite par leur temps d'éluion à l'intérieur de « fenêtres » définies par le constructeur 	<p>D'autres variants pouvant coéluer avec les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats à ceux obtenus par une autre technique</p>	<p>Considérée par de nombreux laboratoires comme la méthode de choix pour dépister et quantifier les différentes fractions d'Hb normales et anormales (cf programmes de contrôle de qualité internationaux)</p>	
<p>Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RT-HPLC)</p>	<p>Etude séparative des chaînes de globine -> les chaînes polypeptidiques sont séparées en fonction de leur hydrophobicité</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Contribution à la séparation et l'identification des variants rares (exemple : HbS Antilles) - Caractérisation des Hb fœtales (diagnostic de PHHP) 		<p>Réservée aux laboratoires spécialisés pour l'étude de l'Hb</p>	

Tableau III : Caractéristiques des différentes techniques électrophorétiques utilisées (5)

TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES					
	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
Electrophorèse à pH alcalin sur acétate de cellulose	A pH 8,5, la molécule d'Hb chargée négativement migre vers l'anode -> les hémoglobines qui ont un gain de charge positive migrent plus lentement.	Simple à mettre en œuvre	- pas suffisamment précise pour quantifier les fractions mineures, HbA2 et HbF - faible pouvoir résolutif -> impossible de distinguer des variants de même migration : HbS/D-Punjab ou HbE/HbC/HbO-Arab - mise en défaut chez le nouveau-né où l'HbF est mal séparée des HbA et HbS	Technique la plus utilisée -> 73 % des participants lors de la dernière opération de contrôle de qualité organisée par l'AFSSAPS en 2004	
Electrophorèse sur gel d'agar à pH acide	La mobilité de la molécule d'hémoglobine dépend des modifications structurales induites par la mutation dans certaines régions positivement chargées de la protéine	Contribue à l'identification des Hb anormales préalablement identifiées par l'électrophorèse à pH alcalin ou la focalisation isoélectrique	Extrêmement sensible aux conditions expérimentales -> reproductibilité difficile	La nomenclature la réserve au cas où l'électrophorèse en gel de polyacrylamide suggère la présence d'HbC ou E.	
Focalisation isoélectrique sur gel d'agarose ou de polyacrylamide	Utilise la différence de point isoélectrique des Hb	- Permet traiter de grandes séries - Très bonne résolution -> méthode de choix pour la détection des Hb anormales	- Technique semi automatisée, plus longue et plus complexe à mettre en œuvre que l'électrophorèse sur acétate de cellulose - Pas suffisamment précise pour quantifier les fractions mineures, HbA2 et HbF - ne différencie pas HbS/HbD/HbG/HbLepore, non plus que HbC/HbE/HbO-Arab.	Méthode utilisée pour le dépistage néonatal	
Electrophorèse capillaire		- Rapide - Automatisée - Performances satisfaisantes pour doser les fractions mineures, HbA2 et HbF - Bonne résolution : à l'écran, en plaçant le curseur sur le pic anormal, le logiciel indique pour chaque zone définie par le constructeur, une liste de variants potentiels	Plusieurs variants ayant le même comportement que les Hb anormales les plus courantes, il reste impératif de confronter les résultats à ceux obtenus par une autre technique	Tend à devenir une technique de choix de première intention pour l'étude de l'Hb	

Diagnostic génétique

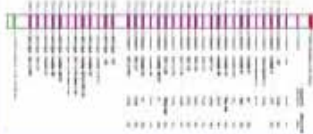
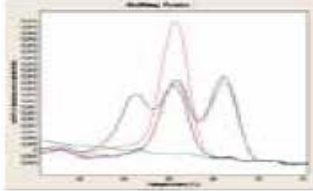
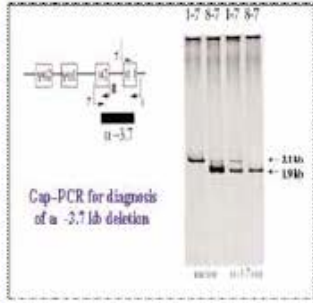

Il s'agit de rechercher les mutations en cause par différentes techniques de biologie moléculaire. Les mutations recherchées vont dépendre essentiellement **de l'origine** ethnique du patient. En effet, les mutations retrouvées sont très variables en fonction des régions géographiques. Pour cela, différentes techniques sont utilisables (tableau IV).

La biologie moléculaire présente un intérêt majeur pour le dépistage systématique des hétérozygotes dans les régions à forte prévalence. Ces **dépistages sont organisés durant l'enfance, en période** prémaritale ou pendant la grossesse (2).

De nombreuses mutations sont décrites, elles sont classées en trois groupes en fonction de la **synthèse résiduelle de la chaîne bêta (β_0 , $\beta+$, $\beta++$)**. Ce sont les mutations β_0 qui, à l'état homozygote, entraînent un syndrome β -thalassémique majeur. On distingue essentiellement trois types de mutations :

- Les mutations **du codon d'initiation** : ATG-> AGG retrouvée en Chine par exemple.
- Les mutations **du site d'épissage** : IVS-I-1 (T->G) retrouvée dans le bassin méditerranéen et en Asie notamment.
- Les mutations non-sens et délétions/insertions entraînant un décalage du cadre de lecture : codon 39 (C->T) retrouvée dans le bassin méditerranéen par exemple (3).

Tableau IV : Caractéristiques des différentes techniques de biologie moléculaire utilisées pour le diagnostic des hémoglobinopathies (5)

TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE (analyses soumises à la réglementation : décret n°2008-321 du 4 avril 2008)					
	Principe	Intérêt	Limites	Remarques	Illustration
Reverse dot-blot	Amplification par PCR et marquage d'un fragment cible d'ADN -> hybridation sur un support portant des sondes, spécifiques des principales mutations recherchées	Permet de rechercher plusieurs mutations en une seule étape d'hybridation		- Trousses commerciales destinées à l'identification des mutations β -thalassémiques les plus fréquentes dans les principales régions du monde -> diagnostic anténatal	
Méthodes d'amorçage allèle-spécifique	Reposent sur le principe qu'une sonde pour PCR est d'autant plus efficace qu'elle est plus spécifique de la séquence à amplifier et qu'une sonde présentant une erreur d'appariement l'est moins	Plusieurs mutations peuvent être recherchées simultanément dans une même PCR (PCR multiplex)	- Disposer d'une batterie d'amorces spécifiques de chacune des mutations que l'on cherche à caractériser - Pour un diagnostic d'homozygotie -> s'assurer, par un test indépendant, de l'absence de la séquence normale à la position de la mutation.	Appliqué au diagnostic anténatal de drépanocytose	
GAP-PCR	Les sondes sont construites de façon à être complémentaires des frontières de la délétion et d'amplifier ainsi un fragment spécifique à la délétion et qui la recouvre. Dans le cas de délétions étendues, la distance entre les deux sondes est trop importante pour permettre l'amplification de l'ADN normal.	- Mise en évidence des délétions plus ou moins étendues des gènes α et β - Plusieurs délétions peuvent être recherchées simultanément dans une même PCR (PCR multiplex)	- Disposer d'une batterie d'amorces spécifiques des délétions que l'on cherche à caractériser - Pour détecter la présence de la région normale chez un sujet hétérozygote, il est parfois nécessaire d'amplifier en parallèle une séquence comprise à l'intérieur des limites de la délétion - Le diagnostic des délétions dont on ne connaît pas précisément les limites doit être effectué par Southern blot	- Trousses commerciales pour le diagnostic anténatal des α -thalassémies - Permet le diagnostic de certaines $\delta\beta$ -thalassémies, des Hb Lepore, anti-Lepore et des PHHP délétionnelles	
Séquençage des gènes	Amplification sélective des gènes β , $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ puis séquençage	Identification des variants rares	- Pas adaptée à la détection des délétions importantes - Ne met pas en évidence les modifications post-traductionnelles (rares cas de mutations suivies d'oxydation, de désamidation de création de ponts disulfure)	Les résultats doivent toujours être comparés à ceux du phénotype	

4. Prise en charge thérapeutique

a. Thérapeutique curative

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est la seule thérapeutique curative à l'heure actuelle. S'il existe un donneur géno-identique HLA compatible, la greffe sera toujours proposée. En cas d'absence de donneur HLA compatible dans la fratrie, uniquement certaines situations particulières peuvent motiver une allogreffe, notamment en cas d'impossibilité de maintenir les transfusions ou les traitements chélateurs.

La thérapie génique est à l'étude clinique et présente des résultats prometteurs. Les deux principaux vecteurs appartiennent à la famille des lentivirus (BB305 et HPV569). C'est en 2008 que le premier patient β -thalassémique a été traité avec succès par une équipe française. Le traitement consiste en une autogreffe de cellules souches CD34+ après transduction par un lentivirus inactivé vecteur du gène codant pour une β -globine particulière : la « β AT87Q globine ». Les deux principaux lentivirus utilisés sont le BB305 et l'HPV569. La β -globine ainsi synthétisée est une forme mutée mais fonctionnelle de la β -globine humaine normale. La mutation génétique effectuée conduit à une modification de l'acide aminé en position 87 : remplacement de la thréonine par la glutamine. Cette modification permet notamment de suivre l'efficacité de la synthèse par CLHP (6).

b. Transfusions régulières de concentrés de globules rouges

Pour les patients ne pouvant bénéficier d'allogreffe, le traitement repose sur les transfusions régulières de CGR phénotypés et déleucocytés. La périodicité est variable, généralement toutes les 3 à 5 semaines, elles visent à maintenir un **taux d'hémoglobine en permanence** supérieur à 9-10,5g/dL.

Les transfusions répétées de CGR présentent des risques de complications :

- Immédiates : incompatibilité rhésus Kell, complications infectieuses...
- Chroniques : (celle-ci seront détaillées plus loin)
 - **Infection virale chronique** : VHC, VHB, syphilis et VIH. Ces risques sont devenus presque nuls à l'heure actuelle grâce à l'efficacité de la sélection des donneurs de sang et des tests de dépistage mis en place.
 - **Surcharge en fer et hémochromatose secondaire.**
 - **Risque d'allo-immunisation** pouvant conduire à des difficultés transfusionnelles voire des impasses si le patient développe un anticorps anti-public.

Tableau V : Complications transfusionnelles d'après Renzo Galanello et Raffaella Origa (3)

Table 2: Transfusion-dependent complications.

Iron overload	
Infections	<p><i>Known</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Viral (HIV, HCV, HBV, HTLV1, West Nile virus) - Bacterial - Parasitic <p><i>Rare</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Creutzfeld-Jacob disease - Emerging and new pathogens
Hemolytic reactions	<p><i>Acute hemolytic reactions</i></p> <p><i>Delayed hemolytic reactions</i></p> <p><i>Autoimmune hemolytic anemia</i></p>
Non-Hemolytic reactions	<p><i>Allergic and anaphylactic reactions</i></p> <p><i>Febrile non-hemolytic reactions</i></p> <p><i>Transfusion-related acute lung injury (TRALI)</i></p> <p><i>Transfusion-associated graft-versus-host disease</i></p> <p><i>Circulatory overload</i></p> <p><i>Post-transfusion purpura</i></p>

c. Chélateur du fer

Le traitement est généralement débuté après 10 ou 20 transfusions ou lorsque la ferritinémie dépasse 1000µg/L (2). **D'après les recommandations** de la Haute Autorité de Santé, le chélateur doit permettre de maintenir une ferritinémie entre 500-1000µg/L pour limiter au maximum la surcharge tissulaire.

Les différents chélateurs disponibles

Tableau VI : Principales caractéristiques des différents chélateurs d'après la HAS (2)

	Déféroxamine (Desféral®) 20-60 mg/kg/jour	Défériprone (Ferriprox®) 50-100 mg/kg/jour en 3 prises	Déférasirox (Exjade®) 10-30 mg/kg/jour en 1 seule prise
Voie	SC, IV, IM	<i>Per os</i>	<i>Per os</i>
Demi-vie	20 minutes	3 heures	8-16 heures
Excrétion	Urines + selles	Urines	Selles
Action sur les ferritinémies	+++	+++	+++
Action sur la CFH	+++	+	+++
Action sur le fer cardiaque	+	+++	Évaluation en cours
Toxicité	Locale (voie SC) Neurosensorielle Croissance Infections à <i>Yersinia</i> et <i>Klebsiella sp.</i>	Agranulocytose Articulaire Digestive Hépatique	Rénale Cutanée Digestive Hépatique
Statut 2007 (AMM dans le cadre de la TM)	Surcharge martiale post-TF	Surcharge martiale post-TF des patients âgés de plus de 10 ans si DFO contre-indiquée ou inadéquate	Surcharge martiale post-TF des patients âgés de plus de 6 ans sous TF systématiques En cas de DFO contre-indiquée ou inadéquate si âgé entre 2 et 6 ans ou moins transfusés

SC : sous cutané, IV : intravasculaire, IM : intramusculaire, CFH : concentration hépatique en fer, TF : transfusion, DFO : déféroxamine

d. La splénectomie

Elle est rarement indiquée dans la thalassémie majeure (7), seulement en cas d'hypersplénisme (neutropénie, thrombopénie, splénomégalie) ou si les besoins transfusionnels sont trop importants (2).

e. Inducteurs de synthèses de l'HbF et de l'érythropoïétine

- Hydroxyurée et EPO : ces médicaments ne disposent **pas d'AMM** dans cette indication, leur utilisation se fait essentiellement dans le cadre d'études.
- Médicaments prometteurs en développement :
 - **Agonistes de l'hepcidine** : la diminution de l'absorption du fer a été prouvée lors d'étude préclinique sur des souris permettant donc de réduire l'hémochromatose secondaire (3).

f. Traitement des complications de la surcharge martiale

- Dépistage et prise en charge des troubles endocriniens : hypothyroïdies, diabète, hypogonadisme.
- Surveillance régulière de la charge martiale myocardique et hépatique **par des techniques d'imagerie spécifiques**, ajustement du chélateur en fonction des résultats et prise en charge des complications.
- **Dépistage, mesures préventives et traitement de l'ostéoporose.**

5. Evolution sous traitement et complications

L'évolution des patients est étroitement liée aux complications des traitements utilisés.

1) Complications liées à l'hémochromatose secondaire

Elle est fréquente malgré un traitement chélateur bien conduit. Son origine est multifactorielle. Elle est à la fois la conséquence des transfusions régulières et de l'**hyper**-absorption intestinale.

Rappel sur le métabolisme du fer

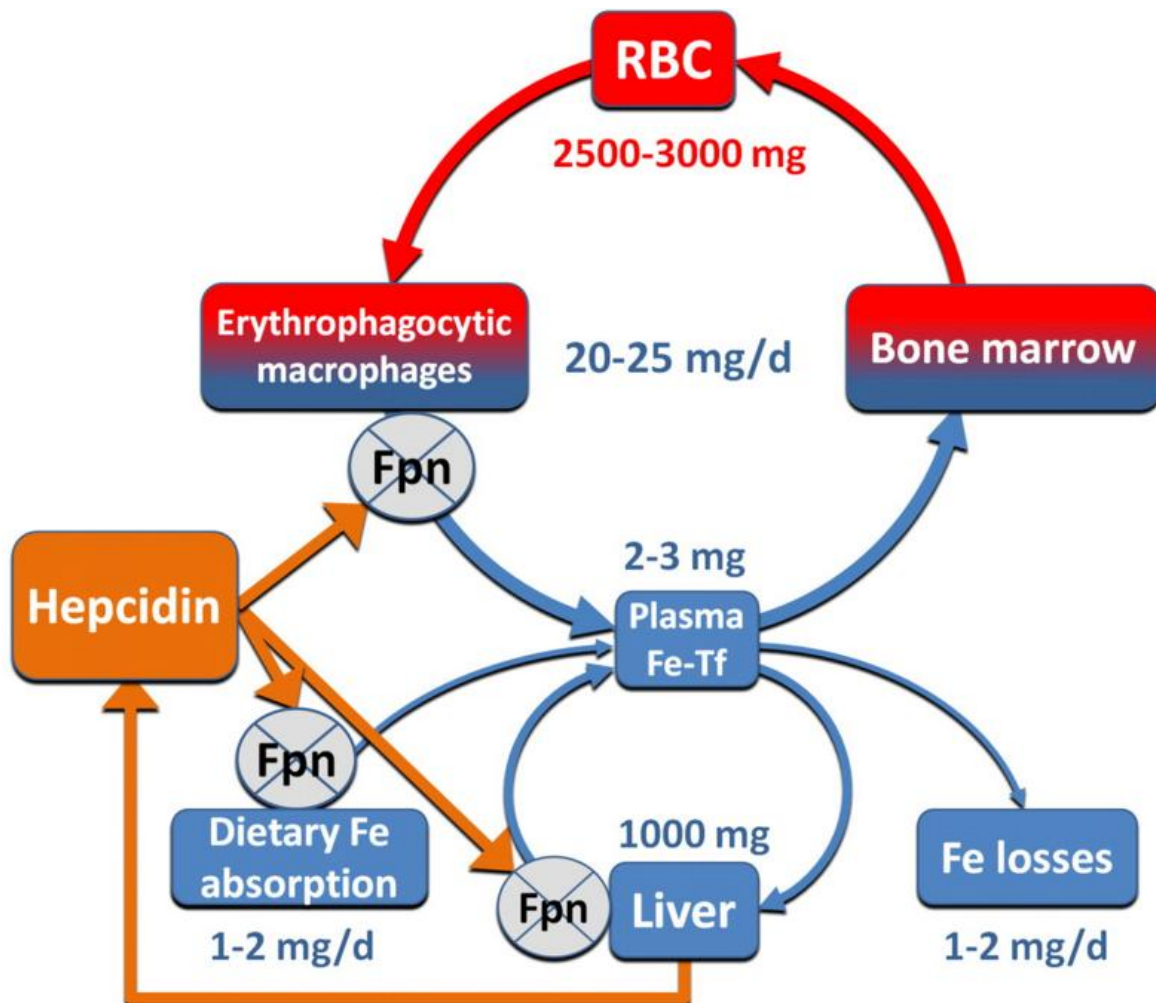


Figure 3 : Métabolisme et homéostasie du fer (8). FPN : ferroportine, RBC : red blood cells.

Les besoins journaliers sont de 1-2mg par jour. L'apport en fer nécessaire est de 8 à 10 mg car l'absorption est évaluée à 5% pour le fer ferrique d'origine végétale et de 20% pour le fer ferreux d'origine animale (9).

Les pertes journalières sont évaluées à 1mg/j chez l'homme et 2mg/j chez la femme (augmentation liée aux menstruations).

Il existe des mécanismes régulateurs : l'hépcidine est la molécule clé dans l'homéostasie du fer (10), cette molécule synthétisée par le foie agit directement sur la ferroportine (molécule membranaire des macrophages et hépatocytes). Par son action, elle bloque la libération du fer par la cellule et stimule son internalisation et sa dégradation, elle inhibe également son absorption intestinale. Physiologiquement, toute augmentation du fer circulant conduit à une diminution de la synthèse de l'hépcidine et inversement.

Perturbation de l'homéostasie du fer chez le patient β -thalassémique

Chez le patient β -thalassémique majeur, les transfusions mensuelles apportent une quantité très importante de fer. En effet, un concentré de globules rouges apporte entre 200 et 250mg de fer soit plus de 200 fois les besoins journaliers.

De plus il existe une dysrégulation dans le métabolisme du fer favorisant l'hémochromatose. En effet, du fait de l'anémie et de l'hypoxie, il y a une importante augmentation de la synthèse d'EPO. Cette augmentation stimule l'activité érythropoïétique qui inhibe ainsi la synthèse d'hepcidine. Malgré l'augmentation du fer circulant, il en résulte une diminution de la synthèse d'hepcidine entraînant une hyperabsorption intestinale du fer. Ce processus entretient l'hémochromatose. *A contrario*, les transfusions, en augmentant le taux d'hémoglobine, conduisent donc à augmenter la synthèse d'hepcidine.

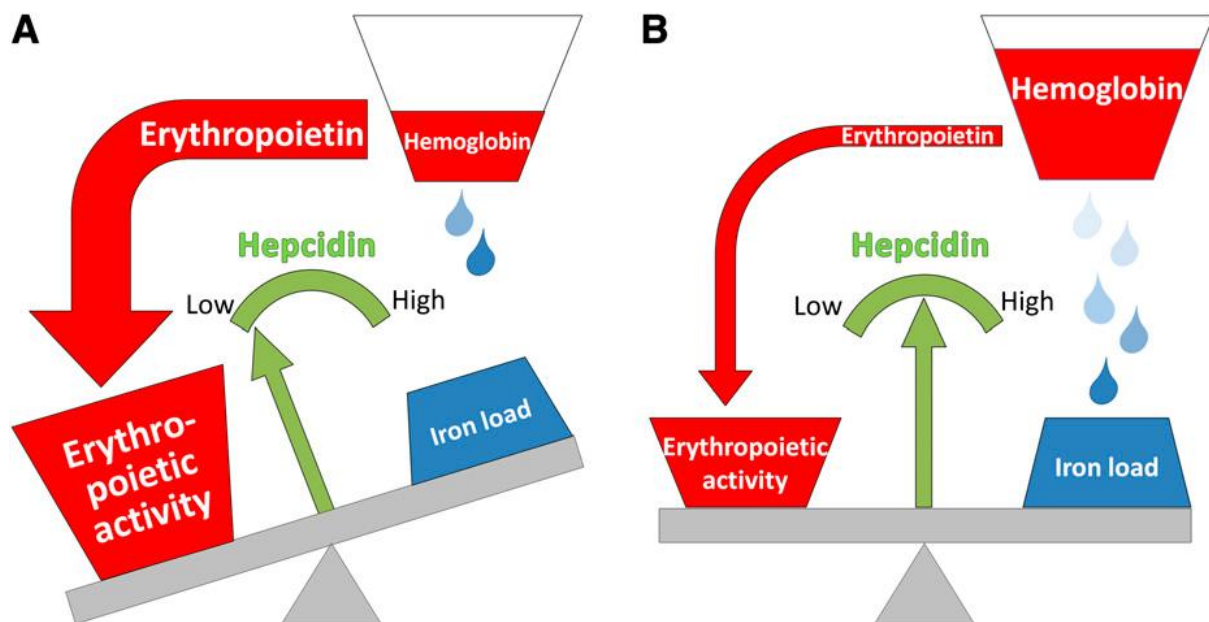


Figure 4 : Régulation de l'hepcidine dans la β -thalassémie majeure. (A) Avant transfusion, l'hyperactivité érythropoïétique supprime la sécrétion d'hepcidine. (B) Après transfusion, la baisse de l'activité érythropoïétique conduit à une augmentation de sa synthèse (11)

L'hémochromatose secondaire n'est donc pas uniquement liée aux transfusions. En effet, les patients NTDT présentent aussi une surcharge martiale en particulier hépatique (11,12).

Les complications liées à la surcharge martiale sont variées :

- Nombreux troubles endocriniens : diabète, hypothyroïdie, hypogonadisme chez l'homme, ostéoporose.
- Les complications liées à la surcharge myocardique restent la principale cause de décès. La surveillance par l'imagerie et l'électrocardiogramme est donc primordiale pour dépister et prendre en charge rapidement tout signe d'insuffisance cardiaque ou de trouble du rythme.

- La surcharge hépatique avec le risque d'évolution secondaire en cirrhose est aussi une comorbidité importante à dépister et prévenir.

2) *Autres complications chroniques transfusionnelles*

Infection par le virus de l'hépatite C

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN dont la transmission se fait principalement par voie parentérale. Le risque majeur chez les patients séropositifs est **l'évolution vers la cirrhose**, celle-ci est inconstante et est estimée entre 10 et 20% (13).

De nombreux patients β -thalassémiques suivis présentent une infection par le **VHC d'origine post-transfusionnelle**. En effet, avant mars 1990 (dépistage systématique des dons du sang), de nombreux cas de contamination ont été recensés. Les patients β -thalassémiques majeurs étant transfusés mensuellement ont particulièrement été touchés. **Le risque d'évolution vers la cirrhose se potentialise avec la présence de l'hémochromatose secondaire.**

La prévalence de l'infection est faible en France, elle est estimée à 0,84% dans la population générale. **D'après la littérature, on note des prévalences de l'infection par le VHC** chez les patients β -thalassémiques majeurs aux alentours de 10-15%. En effet, une étude pakistanaise de 2011 réalisée sur 130 patients **l'estime à 13,1%** (14) **et une étude iranienne de 2007 sur 113 patients l'estime à 10,6%** (15). **Malheureusement, il n'y a pas d'étude française sur le sujet.**

Infections par les virus de l'hépatite B, le VIH, la syphilis

Elles sont nettement moins fréquentes mais le risque était tout de même important avant le dépistage systématique des dons du sang.

3) *Troubles de l'immunité*

Leurs origines sont multifactorielles : les transfusions mensuelles, la surcharge martiale, la splénectomie et les carences en zinc sont autant **d'éléments qui conduisent à un état dysimmunitaire. C'est pourquoi** la deuxième cause de décès chez les patients β -thalassémiques **est d'origine infectieuse.**

V. **β -thalassémie intermédiaire**

1. **Physiopathologie**

La physiopathologie est semblable à la forme majeure. Cependant dans la forme intermédiaire on retrouve une synthèse de chaînes de β -globines en proportion variable.

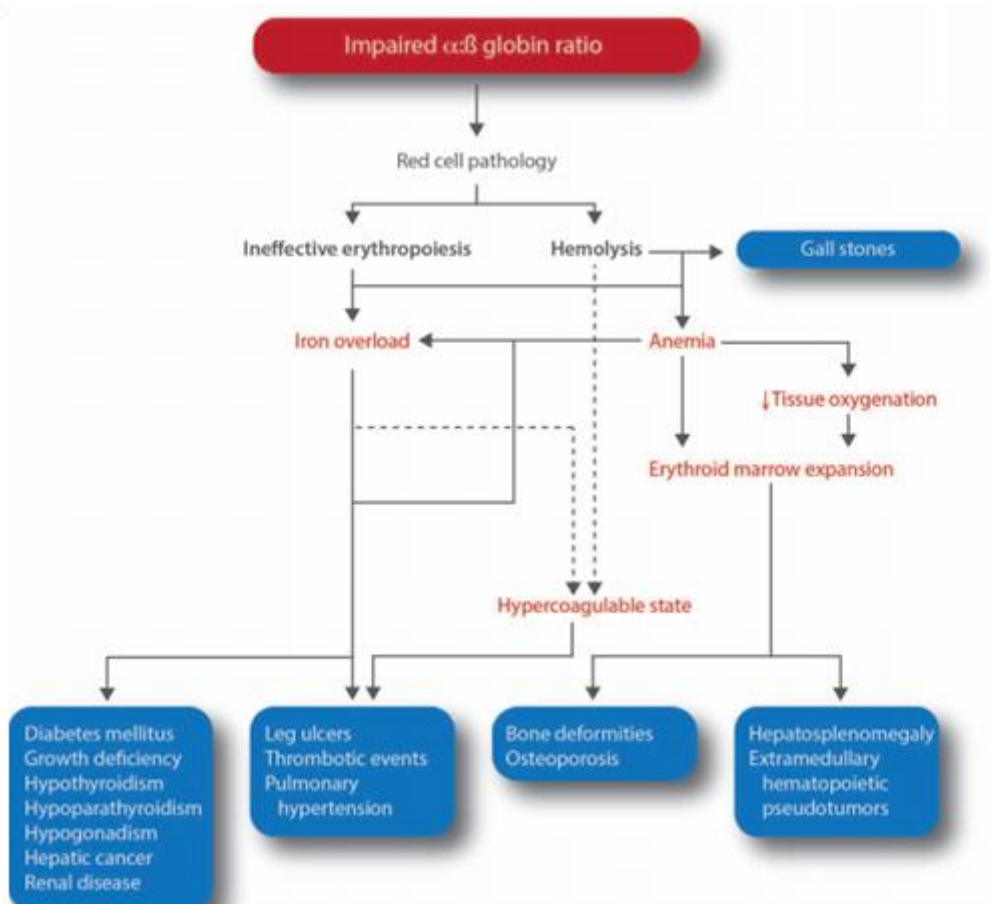


Figure 5 : Physiopathologie et complications cliniques des patients chez les NTBT d’après Mussallam KM et al (16)

2. Clinique

Ce groupe est caractérisé par une forte hétérogénéité clinique. Les signes **de l’anémie n’apparaissent généralement qu’à partir de 4 ans** et cette dernière est souvent modérée (hémoglobine : 7g/dL à 10g/dL).

Les complications apparaissent **à l’âge adulte** : elles sont la conséquence **de l’hémolyse chronique et de l’hémochromatose secondaire** dues à **l’érythropoïèse inefficace** (hépatosplénomégalie, ostéoporose, hypertension artérielle pulmonaire, évènements thrombotiques, diabète, hypothyroïdie et hypogonadisme notamment).

3. Diagnostic biologique

1) Signes biologiques d'orientation

L'hémogramme révèle une anémie modérée microcytaire et hypochrome

2) Diagnostic étiologique

Etude phénotypique

L'étude de l'hémoglobine montre en différentes proportions :

- Une diminution de la fraction de l'HbA
- Une augmentation des fractions de l'HbA2 et de l'HbF

Diagnostic génétique

Le diagnostic se fait par les techniques de biologie moléculaire décrites précédemment. **Ce sont les mutations qui, à l'état homozygote,** entraînent une synthèse résiduelle de la chaîne de β -globine. Si cette synthèse est très diminuée on parle de mutation $\beta+$ sinon de mutation $\beta++$.

Elles concernent essentiellement les séquences promotrices du gène, on trouve notamment la mutation $\beta+$: IVSI-5 (G->T) retrouvée en Asie du Sud-Est (3)

4. Prise en charge thérapeutique

Il s'agit d'un groupe de patients cliniquement très hétérogène dont les évolutions et complications sont variables.

En fonction de l'évolution clinico-biologique, la mise en place d'un traitement chélateur et/ou transfusionnel peut s'avérer nécessaire pour limiter le risque des complications (17).

VI. β -thalassémie mineure

La β -thalassémie mineure est la forme hétérozygote de cette pathologie. Cette pathologie est asymptomatique dans la grande majorité des cas.

L'hémoglobine se situe dans les valeurs normales, mais il existe une microcytose importante caractéristique associée à une pseudo-polyglobulie.

L'étude de l'hémoglobine montre :

- Une augmentation de l'hémoglobine A2 > 3,5%
- Un taux d'hémoglobine F normal ou peu augmenté.

PROBLEMATIQUES

Lors de mon stage en hématologie biologique au CHRU de Nancy, nous avons constaté des hyperlymphocytoses chez des patients β -thalassémiques majeurs. Des explications clinico-biologiques ont été recherchées, notamment la **présence d'un syndrome infectieux** voire **d'un syndrome lymphoprolifératif** connu. Aucune raison évidente **n'a** été retrouvée. **Or, avec l'amélioration de la prise en charge** de ces patients, certains atteignent maintenant **des tranches d'âges où la question d'une hémopathie maligne peut se poser**. Nous avons ainsi entrepris différentes recherches bibliographiques et explorations biologiques afin de tenter de répondre à différentes interrogations :

- Cette hyperlymphocytose est-elle présente chez tous les patients β -thalassémiques suivis ?
- Quelles sont les caractéristiques de cette population lymphocytaire, en termes :
 - De répartition des différentes sous-populations et de recherche **d'une clonalité**.
 - **D'évolution** au cours du temps ?
- Certains facteurs clinico-biologiques y sont-ils associés ?

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Description de la lymphocytose

Il existe un certain nombre de données dans la littérature, mais les conclusions diffèrent.

Dès 1984 une étude américaine a comparé 39 patients β -thalassémiques majeurs, âgés de 4 à 35 ans dont 19 étaient splénectomisés, à un groupe contrôle de 17 témoins. Les formules sanguines ont été réalisées seulement si une hyperleucocytose était trouvée **à l'hémogramme**. Le comptage lymphocytaire a donc été réalisé chez seulement 3 des patients non splénectomisés et 10 des patients splénectomisés. Chez 7 patients splénectomisés a été observée **une population lymphocytaire significativement augmentée par rapport au groupe témoin**. Le rapport LyTCD4/LyTCD8 dans les deux populations β -thalassémiques ne différait pas de la population saine (non splénectomisés : 1,91, splénectomisés : 1,86 et témoin : 1,89). Les auteurs décrivent en revanche **une corrélation inversement proportionnelle entre le rapport LyTCD4/LyTCD8 et le nombre d'unités transfusionnelles reçues** (figure 6) aussi bien chez les patients splénectomisés que non splénectomisés (18).

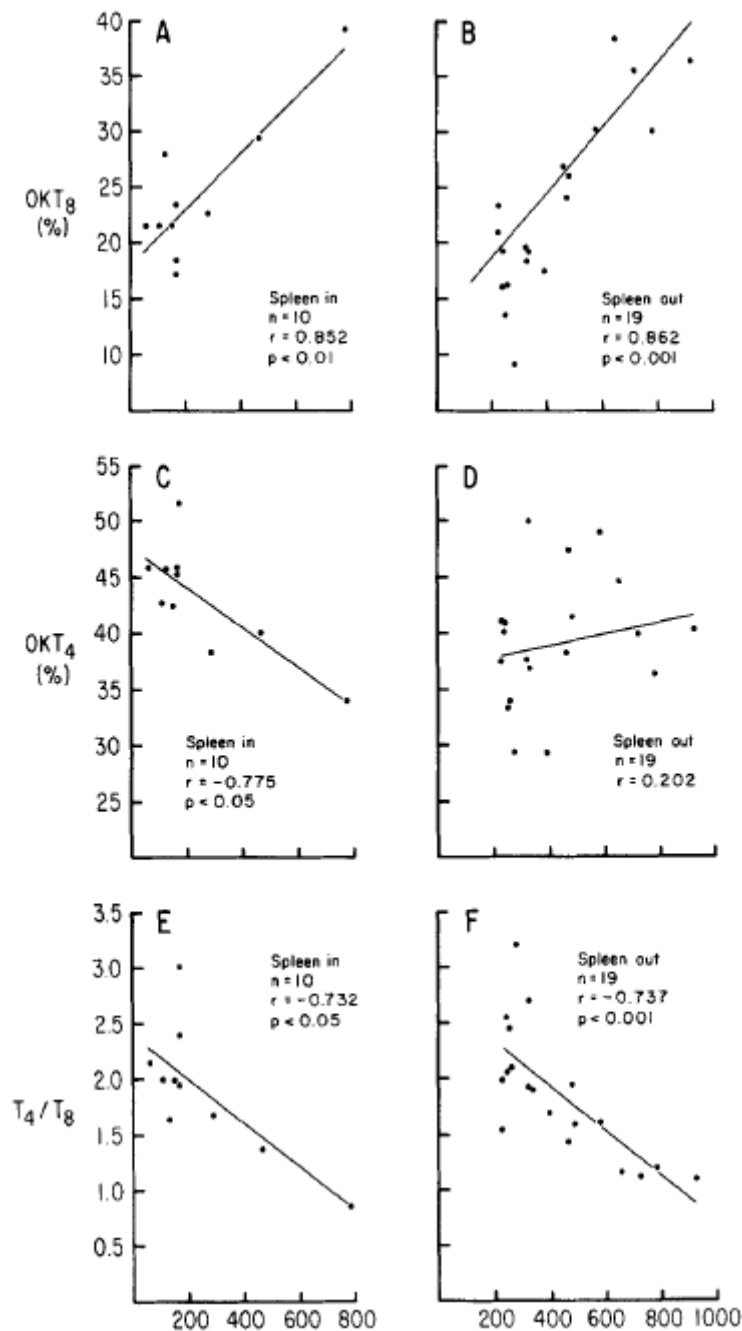


Figure 6 : LyTC8 en fonction du nombre d'unités transfusionnelles reçues chez les patients non splénectomisés (A) et les patients splénectomisés (B). LyTC4 en fonction du nombre d'unités transfusionnelles reçues chez les patients non splénectomisés (C) et les patients splénectomisés (D). Rapport LyTC4/LyCD8 en fonction du nombre d'unités transfusionnelles reçues chez les patients non splénectomisés (E) et les patients splénectomisés (F) (18)

Une étude Grecque en 1986 a comparé une population de 50 enfants β -thalassémiques à un groupe témoin de 50 enfants tous âgés de 2 à 18 ans. Parmi les patients seulement 4 étaient splénectomisés et 41 recevaient un traitement chélateur par voie sous-cutanée. On note que 26 d'entre eux présentaient des marqueurs sérologiques d'exposition à l'hépatite B (il n'est pas détaillé s'il s'agit de patients guéris ou d'hépatite B chroniques) et les 24 autres patients étaient vaccinés. **Aucune différence significative entre la**

lymphocytose des deux populations n'a été décrite. En revanche le rapport LyTCD4/LyTCD8 est plus faible chez les enfants β -thalassémiques que dans le groupe témoin (1,34 vs 1,69). Les auteurs ont ensuite cherché à étudier la valeur de ce rapport en tenant compte de différents paramètres notamment le sexe, le statut viral et la splénectomie. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre homme/femme, VHB+/ VHB- et splénectomisés et non-splénectomisés. Il est toutefois démontré **une corrélation négative entre le rapport LyTCD4/LyTCD8, la ferritinémie et le nombre d'unités transfusionnelles reçues** (figure 7) (19).

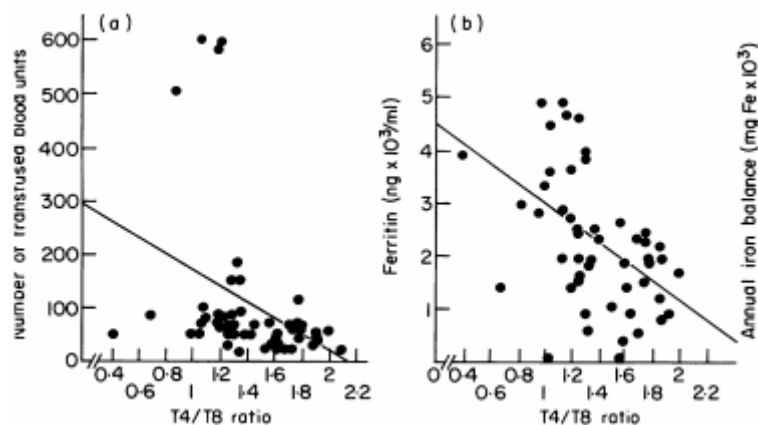


Figure 7 : Corrélation entre LyTCD4/LyTCD8 en fonction du nombre de CGR reçus (a) et de la ferritinémie (b) (19)

Dans une étude Australienne de 1998 a été comparée une population de 25 patients β -thalassémiques homozygotes, âgés de 6 à 28 ans, dont 17 patients étaient splénectomisés et 9 étaient VHC positifs, à un groupe de 38 témoins. L'étude conclue à **une augmentation de la lymphocytose par rapport au groupe témoin** (5,2G/L vs 2,2G/L). Cette augmentation a été observée chez tous les patients splénectomisés mais elle concerne seulement 3 des 8 patients non-splénectomisés. En revanche, ils n'objectivent **pas de modification du ratio LyTCD4/LyTCD8 par rapport au groupe témoin** (1,3 vs 1,4) (20).

Une étude thaïlandaise réalisée en 2000 présentait 126 patients thalassémiques, dont 73 étaient β -thalassémiques/HbE dont 38 splénectomisés, 43 étaient α -thalassémiques majeurs et 10 hémoglobines apha/Constant Spring. La grande différence avec les études préalablement décrites est **l'inclusion de patients n'ayant pas de syndrome β -thalassémique majeur**. En effet sur les 73 patients β -thalassémiques/HbE, seulement 12 recevaient des transfusions et uniquement de façon occasionnelle. Cette population a été comparée avec un groupe de 33 témoins. **Aucune différence significative dans la répartition lymphocytaire entre les différents groupes et la population saine n'a été mise en évidence sauf pour les patients β -thalassémiques/HbE splénectomisés**. Cette population présente en effet une modification de la répartition des populations lymphocytaires avec **une diminution de la proportion des lymphocytes T** (61,9% pour les splénectomisés vs 66,7% pour

la population témoin) qui est expliquée par une diminution du pourcentage des LyTCD8 (24,5% vs 28,7%) sans modification significative de celui des LyTCD4 (32,1% vs 35,2%). En parallèle les auteurs ont décrit **une augmentation du pourcentage des LyB** (18,2% vs 14,4%) et **un pourcentage de LyNK inchangé** (18,7% vs 18,8%). **Le ratio LyTCD4/LyTCD8 lui ne diffère pas significativement** (1,4 vs 1,3) (21).

Une étude de 2007 en Iran s'est intéressée à une population (n=28) de patients β -thalassémiques majeurs, âgés de 14 à 39 ans et traités par déféroxamine (connu sous la spécialité Desferal® en France). Sur ces 28 patients, 13 étaient splénectomisés. L'étude a été réalisée par comparaison avec un groupe témoin de 30 sujets sains de 14 à 37 ans. Cette étude a décrit **une élévation significative des lymphocytes sériques** (patients : 3,3G/L vs témoins : 2,3G/L) avec **une augmentation des lymphocytes T** (2,5G/L vs 1,5G/L) en particulier celle des LyTCD4 (1,5G/L vs 1,0G/L). À contrario, pas d'augmentation significative des LyTCD8 (0,8 G/L vs 0,7G/L). On note donc **une élévation significative du rapport LyTCD4/LyTCD8** (1,8 vs 1,4). Pour la population lymphocytaire B, pas de différence significative entre les patients de l'étude et les sujets sains (0,3 G/L vs 0,2G/L). Cette étude a également fait une comparaison entre les patients splénectomisés et non splénectomisés. Il a été mis en évidence **une augmentation significative de la lymphocytose chez les patients splénectomisés par rapport aux non splénectomisés** (patients splénectomisés 4,6G/L vs patients non splénectomisés 2,4G/L) (22).

Une étude au Koweït a été réalisée en 2009 : 49 patients β -thalassémiques homozygotes dont 8 patients splénectomisés, étaient comparés à un groupe contrôle de 60 témoins. Les patients et les sujets sains étaient âgés de 2 à 37 ans. Les patients β -thalassémiques présentaient tous une ferritinémie augmentée (de 522 à 8412 ng/mL). La comparaison des deux populations conclue à **une augmentation significative des LyT** (patients : 2,3G/L vs témoins : 1,5G/L) **et des LyB** (0,6G/L vs 0,3G/L), **pas de modification significative en revanche du rapport LyTCD4/LyTCD8** (1,6 vs 1,8) (23).

Une dernière étude de 2014 réalisée en Indonésie comparait une population splénectomisée (n=58) et une population non splénectomisée (n=58), âgées de 12 à 38 ans. La moitié des patients sont β -thalassémiques/hémoglobine E, les autres sont β -thalassémiques homozygotes. Le traitement par chélateur est variable mais présentait la même répartition dans les deux populations étudiées. De plus une part importante de chaque population était VHC+ et/ou VHB+. Les résultats s'intéressaient uniquement à l'étude des lymphocytes T. Il a été démontré **une augmentation significative des lymphocytes T circulants chez les patients splénectomisés par rapport aux patients non splénectomisés** (splénectomisés : 4,4G/L vs non splénectomisés : 1,3G/L), cette élévation concernait à la fois les lymphocytes LyTCD4 et LyTCD8. Cependant **aucune différence du ratio LyTCD4/LyTCD8 entre les deux**

populations n'a été observée (0,98 vs 0,97). Les proportions lymphocytaires T ne semblent donc pas modifiées par la splénectomie (24).

La plupart des études conclue à une augmentation de la population lymphocytaire globale. Cette augmentation est plus importante chez les patients splénectomisés. Certains auteurs ne décrivent pas de modification significative du rapport LyTCD4/LyTCD8 (20,23), **alors que d'autres témoignent d'une** diminution de celui-ci. Cette diminution est par ailleurs proportionnelle au **nombre d'unités transfusionnelles reçues et à la ferritinémie** (18,19). On constate par ailleurs que ce ratio décrit dans la population témoin est très variable, il va de 0,97 (24) à 1,89 (18).

Les conclusions des études divergent, il en est de même pour les populations étudiées. Les lieux de réalisation de ces études sont variables avec les différences ethnico-socio-économiques qui en découlent, certaines ne **s'effectuent que sur des** enfants (19), **d'autres** en revanche concernent des **tranches d'âges plus larges** (18). La part des patients splénectomisés est variable et la dissociation en deux groupes (splénectomisés et non splénectomisés) **n'est** pas toujours réalisée. De plus, **certaines études n'ont pas exclu** les maladies **infectieuses chroniques comme l'hépatite C et B de l'échantillon étudié** (5). Il est **donc difficile de comparer les résultats d'une étude** directement avec une autre. **On note par ailleurs, qu'aucune de ces études n'a été faite** avec des patients de plus de 40 ans.

De nombreuses perturbations immunologiques, en plus de celles citées précédemment, ont été décrites : on note des perturbations dans les concentrations de cytokines sériques (25), dans les taux des principales immunoglobulines sériques (IgM, IgG et IgA) (26) et **une diminution de l'activité** des lymphocytes NK (27).

L'ensemble de ces modifications immunologiques contribue donc à **l'augmentation** du risque infectieux. Il est important de rappeler que celui-ci est la deuxième cause de décès.

En conclusion, la plupart des études concluent à :

- Une augmentation de la lymphocytose chez les patients β -thalassémiques majeurs.
- Une augmentation significativement plus importante chez les patients splénectomisés.
- Une **répartition des populations lymphocytaires variable d'une étude à l'autre de même que le rapport LyTCD4/LyTCD8.**
- Une corrélation négative entre le ratio LyTCD4/LyTCD8 et la ferritinémie.

Aucune étude ne fait mention à **l'évolution de la lymphocytose au cours du** temps.

2. Origine(s) possible(s) de cette hyperlymphocytose

1. Perturbations immunologiques liées à la surcharge martiale

Le fer et de nombreuses protéines intervenant dans son métabolisme ont un rôle majeur dans l'immunité. Les interactions avec les cellules phagocytaires sont bien décrites (28). En revanche le rôle des lymphocytes est nettement moins connu. Ceux-ci expriment à leur surface un récepteur à la transferrine permettant son internalisation. Le fer est un élément essentiel à leur expansion et leur activation. Par ailleurs les lymphocytes sont également capables de synthétiser la ferritine : ils peuvent donc servir de réservoir en séquestrant le fer et ainsi jouer un rôle protecteur au cours d'une surcharge martiale. **Il existe peu d'études s'intéressant aux populations lymphocytaires chez les patients ayant une hémochromatose primaire.** Certaines sont effectuées chez les patients β -thalassémiques, **les résultats ne permettent donc pas d'évaluer isolément la surcharge martiale (29).**

Une étude de 2002 réalisée en Italie comparait 17 patients adultes présentant une hémochromatose primaire homozygote (mutation C282Y du gène HFE) âgés de 19 à 70 ans à un groupe témoin de 14 patients. Les auteurs ont décrit **un nombre de lymphocytes diminué** chez les patients par rapport au témoin (patients : 1,9G/L vs témoins : 2,3G/L), en revanche **pas de différence dans le taux de lymphocytes T (0,5 vs 0,5G/L) et le ratio LyTCD4/LyTCD8 (1,9 vs 2,0) (30).**

2. Perturbations immunologiques liées aux transfusions régulières

a. Aigues post-transfusionnelles

(31-33)

- Incompatibilités majeures ou mineures entraînant des réactions immunologiques pouvant conduire au décès (incompatibilité ABO en particulier). La fréquence des allo-immunisations chez les patients β -thalassémiques varie de 5% à 22% en fonction des études.
- Des réactions fébriles non liées à des incompatibilités transfusionnelles sont fréquentes, elles sont liées à la présence de leucocytes résiduels et de cytokines dans les CGR.

b. Chronique : Transfusion-related immunomodulation (TRIM)

De nombreuses études portant sur des patients transfusés témoignent de différents retentissements cliniques, ces immuno-modulations peuvent avoir des effets négatifs ou positifs en fonction des contextes cliniques (34):

- Positif :
 - Une **diminution de l'inflammation** intestinale chez les patients atteints de maladie de Crohn.
 - Diminution du risque de rejet de greffe en transplantation rénale **grâce à l'effet immunosuppresseur**.
- Négatif :
 - Un risque augmenté de récurrence de certains cancers.
 - Un risque augmenté **d'infection** et de progression plus rapide des infections virales.

Les transfusions répétées, en apportant des allo antigènes (antigènes solubles HLA-I, leucocytes, cytokines) sont **responsables d'une stimulation** allogénique continue, concourant ainsi à des **perturbations de l'immunité**. Différentes modifications immunologiques ont été décrites **notamment une augmentation des LyTCD8, une diminution des LyTCD4 et une diminution des LyNK** (33).

D'autres perturbations sont recensées, notamment une augmentation de l'activité TH2 (pro-tumorale) **par rapport à l'activité TH1** (anti-tumorale) avec une **diminution de la synthèse de l'interleukine 2 (IL-2) et de l'interféron gamma (IFN-γ)** et une augmentation de la synthèse des IL-4, IL-5 et IL-10. Ces modifications entraînent des perturbations immunologiques en cascades, dont notamment une **diminution de l'activité** des monocytes-macrophages et une libération de prostaglandines immunosuppressives. Tous ces éléments concourent à expliquer les perturbations dans la lutte anti-tumorale et anti-infectieuse (35). On pourrait donc supposer un risque accru de cancer chez ces patients.

3. Perturbations immunologiques liées à la splénectomie

La splénectomie conduit à une modification **au niveau de l'immunité**. La rate est un organe lymphoïde secondaire qui joue un rôle majeur dans le système immunitaire. Elle est constituée anatomiquement de deux zones :

- **La pulpe rouge** : véritable réservoir de monocytes et macrophages ; son **rôle majeur est de filtrer le sang et d'éliminer** les érythrocytes anormaux et/ou âgés.
- **La zone marginale** : jonction entre la pulpe rouge et la pulpe blanche, elle permet le passage des différentes cellules entre les deux zones. Elle contient elle-même des cellules qui lui sont propres : des lymphocytes B et

des macrophages aux phénotypes particuliers. Ces macrophages présentent des récepteurs spécifiques qui vont leur permettre de reconnaître efficacement les polysaccharides des antigènes bactériens. Cette reconnaissance est cruciale pour la capture et la clairance de *Streptococcus pneumoniae* et de *Neisseria meningitidis* (36).

- **La pulpe blanche**, véritable organe lymphoïde :
 - Le follicule : contient de nombreux lymphocytes B, semblable au follicule d'un ganglion lymphatique.
 - La « T cell zone » : lieu de présentation de l'antigène par l'interaction des cellules dendritiques avec les lymphocytes T (37).

Le fonctionnement de la rate dans l'immunité est complexe, mais elle a un rôle important aussi bien dans l'immunité innée qu'adaptative. Son ablation augmente considérablement le risque infectieux en particulier pour les bactéries encapsulées (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae*)

Il est primordial de bien sélectionner les études, car nombre d'entre elles présentent d'importants biais de sélections. En effet, certaines décrivent les perturbations immunologiques post-splénectomie chez des patients β -thalassémiques sans tenir compte de l'ensemble des autres éléments pouvant modifier l'immunité (38). Ces études ne seront pas décrites car elles ne s'attachent pas uniquement aux conséquences de la splénectomie. En revanche, une étude hongroise de 1985 compare 41 patients ayant bénéficiés d'une splénectomie post-traumatique à un groupe témoin de 200 patients non splénectomisés. On note une augmentation significative de la lymphocytose (splénectomisés : 3,2G/L vs témoins : 1,7G/L) et une augmentation significative et permanente des LGL (*large granular lymphocyte*) (33,5% vs 14,5%) (39).

Des cas décrits dans la littérature concernant des patients splénectomisés pour purpura thrombopénique auto-immun relèvent une hyperlymphocytose persistante chez trois des seize patients suivis. L'étude de cette hyperlymphocytose objective une augmentation des LNK avec morphologiquement une augmentation des LGL. En revanche, l'étude lymphocytaire des autres patients n'a pas été effectuée, on ne peut donc pas savoir s'ils présentaient aussi une expansion des LyNK (40).

Une étude autrichienne de 1999, décrivait la population lymphocytaire d'un groupe de 12 adultes splénectomisés âgés de 22 à 42 ans. Tous les patients avaient bénéficié d'une splénectomie post-traumatique plus de 4 ans avant l'étude. Celle-ci a été réalisée versus un groupe de 14 sujets sains et 11 patients ayant bénéficié d'une chirurgie abdominale post-traumatique sans splénectomie associée. Les auteurs décrivent une diminution de la proportion des LyT en post splénectomie (splénectomie : 64% vs chirurgie sans splénectomie : 72% vs

sujets sains : 70%) expliquée par une baisse des LyTCD4 (splénectomie : 35% **vs** chirurgie sans splénectomie : 44% **vs** sujets sains : 46%). Ils ne relèvent pas d'autres modifications significatives (41).

4. Perturbations immunologiques liées à la co-infection par le virus de l'hépatite C

L'infection chronique au virus de l'hépatite C interfère aussi sur l'immunité. Plusieurs études témoignent de l'impact de l'infection par ce virus sur le système immunitaire.

Une étude de 2015 aux USA décrivait plusieurs tests *in vitro* sur des cultures cellulaires de lymphocytes T. Les auteurs ont démontré **qu'après contact avec le VHC, il s'ensuit une inhibition significative du test de prolifération cellulaire.** Cette **diminution de la prolifération cellulaire concerne les LyTCD4, la prolifération des LyTCD8 n'est pas impactée par le contact avec le VHC.** En revanche, tous les génotypes du VHC ne semblent pas avoir le même impact. Les génotypes 1a, 1b et 3a conduisent à cette inhibition alors que **le génotype 2b n'a pas montré d'effet *in vitro* sur la prolifération cellulaire par rapport au témoin.** En revanche, il a été mis en évidence que le VHC **n'a pas d'effet pro-apoptotique.** Celui-ci inhibe uniquement la prolifération des LyTCD4 mais ne favorise pas leur dégradation (42). Une étude précédente de 2006 au Canada avait déjà démontré une prolifération diminuée des LyTCD4 par rapport au LyTCD8 après culture avec un inoculum contenant le génotype 1a du VHC (43).

Dans une étude chinoise récente de 2015 portant sur 69 patients VHC+, la valeur du ratio LyTCD4/LyTCD8 en fonction de la charge virale a été étudiée. Pour cela, les 69 patients ont été subdivisés en trois groupes en fonction de la charge virale : un « *high load group* » avec une concentration en ARN viral $>10^5$ copies/mL, un « *middle load group* » avec un ARN viral entre 10^3 et 10^5 copies/mL et un « *low load group* » avec un ARN viral $<10^3$ copie/mL. Les auteurs ont ainsi **prouvé une diminution de la concentration des LyTCD4 et une augmentation de celle des LyTCD8 proportionnellement à l'augmentation de la charge virale** (figure 8) (44).

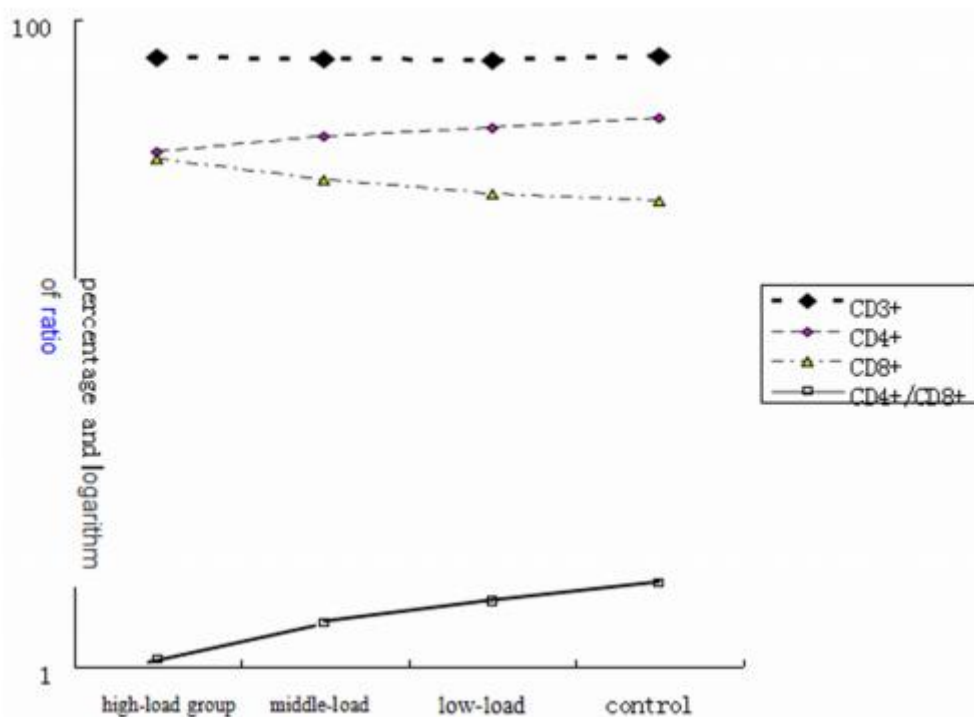


Figure 8 : Corrélation entre la concentration d'ARN du VHC circulant et le pourcentage des différentes populations lymphocytaires d'après Y Huang et al (44)

5. Perturbations immunologiques liées aux carences en zinc

Le zinc est essentiel à l'activité de nombreux systèmes enzymatiques, immunologiques et antioxydants. Il a un rôle majeur dans la croissance, en effet un déficit en zinc conduit à des taux diminués de l'hormone de croissance (45). De plus il a un rôle important de protection contre le stress oxydant impliqué dans de nombreuses pathologies : athérosclérose, neuro-dégénérescence, etc.

On relève deux types de déficits en fonction de la sévérité clinique :

- **Un déficit majeur** : il se traduit par des perturbations cliniques avec alopécie, diarrhée, hypogonadisme chez les hommes, troubles émotionnels, perte de poids, infections à répétitions. Sans correction l'évolution est fatale. Ces cas de déficits très sévères ont été décrits dans le cas d'alimentation parentérale totale sans supplémentation en zinc, lors de consommation excessive d'alcool ainsi que lors de traitement au long cours par la pénicilline.
- **Un déficit modéré** : il s'exprime par un retard de croissance, un hypogonadisme chez les hommes et une perte de l'appétit.

Le zinc est crucial pour le développement normal des cellules de l'immunité innée telle que les neutrophiles, lymphocytes NK et monocytes-macrophages dont il intervient dans les fonctions phagocytaires.

Il présente toutefois aussi **un rôle important dans l'immunité acquise**. Il est notamment nécessaire à la fonctionnalité de **la thymuline** (hormone produite par le thymus) qui agit directement sur les lymphocytes T en stimulant leur **activité cytotoxique et la production d'IL2** (46).

Une étude de restriction des apports en zinc dans une population saine a permis de mettre en évidence des changements au niveau de l'immunité. Une **diminution du rapport LyTCD4/LyTCD8** et une **diminution de l'IL2** ont été rapportées. Ces anomalies ont été corrigées après arrêt de la déplétion. Par ailleurs elle rapporte aussi des perturbations cytokiniques telle que la diminution de **l'IFNgamma circulant conduisant à un déséquilibre** dans la répartition TH1 et TH2 en faveur de la réponse TH2. En revanche, aucune corrélation significative **entre la ferritinémie et la concentration en Zinc n'a été mise** en évidence (46).

Chez les patients β -thalassémiques, des déficits en zinc ont été mis en évidence. En effet, une étude Iranienne effectuée sur 333 patients β -thalassémiques majeurs objective une prévalence du déficit à 100% (47). Tandis qu'une autre étude multicentrique à Téhéran l'évalue à **79,6%** (48), une autre étude à 65% (49) et une à 22,2% (50).

Les causes du déficit en zinc chez ces patients sont plurielles :

- La principale explication est **l'élimination du zinc** par complexation avec le traitement chélateur qui capte le zinc **sous forme d'ions** bivalents entraînant ainsi :
 - **La diminution de l'absorption intestinale** si le traitement chélateur est administré par voie orale.
 - **L'augmentation de l'excrétion urinaire** avec hyperzincurie (45).
- Un apport insuffisant est fréquent aussi : régimes alimentaires déficitaires en aliments riches en zinc (huîtres, viandes, poissons et blé complet).

La prévalence du déficit en zinc est donc très variable d'une étude à l'autre. Les discordances observées peuvent s'expliquer via les différentes méthodes d'analyses utilisées ou encore le régime alimentaire différent des populations étudiées.

6. Conclusions

Il est difficile de trouver des études complètes **décrivant uniquement l'effet d'un élément précis sur l'immunité acquise**. En effet, on retrouve souvent des études où les patients présentent différentes perturbations (association splénectomie et hémopathies non malignes, transfusions répétées et surcharges martiales, etc.). Les résultats de celles-ci sont limités mais ont le mérite de **s'affranchir** de nombreux biais (tableau VII).

Chez les patients β -thalassémiques, toutes les causes peuvent être présentes et donc se potentialiser pour expliquer les perturbations observées.

Tableau VII : Variation des populations lymphocytaires en fonctions de différentes situations cliniques

	Lymphocytose	LyT	LyB	LyNK	LyTCD4/ LyTCD8	Remarques
Surcharges martiale	↓	=	NR	NR	=	/
Transfusions régulières	NR	NR	NR	↓	↓	/
Splénectomie	↑	NR	NR	↑	NR	Augmentation des LGL
VHC	NR	NR	NR	NR	↓	Diminution de la prolifération des LyTCD4
Carence en zinc	NR	NR	NR	NR	↓	Carence en Zn variable en fonction des études

NR : non renseigné

MATERIELS ET METHODES

Pour tenter de répondre aux différentes questions non résolues, nous avons réalisé une étude sur 2 axes, rétrospectif et prospectif chez une cohorte de 16 patients.

Critères de recrutement : patients suivis dans le service d'**oncohématologie** pédiatrique du CHRU de Nancy pour un syndrome β -thalassémique majeur bénéficiant de transfusion toutes les 3-5 semaines, parmi lesquels 13 sont β -thalassémiques homozygotes et 3 sont β -thalassémiques/hémoglobinoase E. Les prélèvements sont réalisés au cours du soin, dans le cadre de leur prise en charge standard.

Nous avons réalisé cette étude en deux phases :

- **Une phase rétrospective** : nous avons récupéré les bilans biologiques réalisés pour ces patients (hémogramme, ferritinémie et protéine C réactive) **depuis l'utilisation** du système informatique de laboratoire actuel au CHRU de Nancy : Glims® (mars 2006). **L'objectif de cette analyse est d'observer l'évolution de la lymphocytose au cours du temps, ainsi que de rechercher d'éventuelles corrélations avec d'autres paramètres biologiques ou cliniques.** Les hémogrammes ont été réalisés par **l'automate Advia® jusqu'en octobre 2013** puis par **l'automate Sysmex XN 9000 ®** depuis.
- **Une phase prospective** : celle-ci a pour but de réaliser une étude plus précise de la lymphocytose. Deux prélèvements réalisés dans le cadre du soin, juste avant **l'épisode transfusionnel**, sont réalisés à **quelques mois d'intervalles (de 3 à 6 mois)**. **Les lymphocytes sont étudiés et dénombrés au microscope optique, par un technicien de laboratoire et recomptés par nos soins, puis par cytométrie en flux (BD FACS Canto II®) où une étude de la répartition des différentes populations lymphocytaires et de la clonalité B est réalisée.**
 - Première étape : analyse des différentes sous populations lymphocytaire (LyTCD4, LyTCD8, LB et LyNK) :
 - Utilisation **d'un mélange d'anticorps monoclonaux** marqués avec différents fluorochromes BD Multitest 6-color TBNK ® contenant les anticorps suivants : anti CD45-PerCP-Cy5.5, anti CD19-APC, anti CD3-FITC, anti CD4-PE-Cy7, anti CD8-APC-Cy7, anti CD16+CD56-PE.
 - **Préparation de l'échantillon via** le BD FACS sample prep assistant 3®.

- Analyse par le cytomètre BD FACS Canto II® et traitement des résultats par le logiciel FACS Canto Software®.
- Deuxième étape : recherche **d'une monoclonalité** des lymphocytes B circulants :
 - Utilisation kappa-FITC DAKO®, lambda-PE DAKO®, anti CD19-Per-Cy7 Coulter® et CD45-V500 BD®. Analyse sur le cytomètre BD FACS Canto II® et traitement des résultats par le logiciel FACS Diva®.
- Les intervalles de références utilisés sont ceux définis par le laboratoire, sauf pour le ratio LyTCD4/LyTCD8 où les normes décrites dans la littérature seront utilisées (51).

ANALYSE DES RESULTATS

I. Etude interindividuelle

Les principales caractéristiques des patients de notre étude sont répertoriées dans le tableau VIII. Le dernier patient (en rouge) a été exclu de **l'analyse statistique**. **En effet** il présente une hyperlymphocytose très élevée, bien plus importante que **les autres patients de l'étude**. **L'inclure rendrait** la plupart des tests statistiques non exploitables. En revanche **ce patient fera l'objet d'une description plus détaillée par la suite**.

Tableau VIII : Paramètres et caractéristiques des patients de la cohorte

Age	Thalassémie	Chélateur	Splénectomie	VHC	Ferritinémie (µg/L)	Ly (G/L)	Ly à grains/Ly (%)	LyTCD4/ LyTCD8	IgS Kappa/lambda
2	β-thalassémie homozygote	/	Non	-	1360	2,7	8	2,1	1,3
8	β-thalassémie/HbE	Ferriprox®	Non	-	1362	3,5	32	0,9	1,3
13	β-thalassémie/HbE	Exjade®	Non	-	1774	1,9	16	1,0	1,3
14	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Non	-	339	1,9	14	1,3	1,3
22	β-thalassémie homozygote	Ferriprox®	Non	-	5833	1,2	21	1,4	1,4
24	β-thalassémie homozygote	Desferal® + Exjade®	Non	+	4982	2,8	19	1,3	Ininterprétable
27	β-thalassémie/HbE	Ferriprox®	Non	-	12543	2,4	13	0,8	1,2
11	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	-	3006	7,0	10	2,2	1,6
46	β-thalassémie homozygote	Desferal®	Oui	+	2380	6,1	36	1	2,5
48	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	+	1056	5,5	28	3,5	1,6
50	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	-	582	3,9	24	2,4	1,6
51	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	-	386	2,6	19	1,6	1,3
51	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	+	376	3,4	34	2,9	1,3
54	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	+	196	3,8	15	1,8	1,0
55	β-thalassémie homozygote	Exjade®	Oui	+	478	3,2	16	2,5	1,13
60	β-thalassémie homozygote	Ferriprox®	Oui	-	1133	14,2	53	0,4	1,0

Lymphocytose globale vs population générale

On note une augmentation significative de la lymphocytose moyenne dans la population adulte de notre étude par rapport à la lymphocytose moyenne de référence (3,5 **vs** 1,8) (52). **Nous n'avons pas inclus** assez de patients dans les classes pédiatriques pour effectuer une comparaison de moyenne fiable (tableau IX).

Nous remarquons par ailleurs un taux de lymphocytes à grains circulant augmenté. En effet, dans notre population on note en moyenne 20,3% de lymphocytes à grains parmi les lymphocytes totaux. Les valeurs de références communément admises sont de 10 à 15% (53).

Tableau IX : Comparaison de la lymphocytose par tranche d'âge avec la population générale. * : $p < 0,05$

Lymphocytose moyenne	Cohorte CHU Nancy	Population générale	t de Student ($p < 0.05$)
2-5 ans (n=1)	2,7	3,3	NA
5-10 ans (n=1)	3,5	2,8	NA
10-16 ans (n=3)	3,6	2,2	NA
Adultes (n=10)	3,5	1,8	*

Lymphocytose en fonction de la ferritinémie

Aucune corrélation significative n'est mise en évidence entre la lymphocytose et la ferritinémie ($p > 0.05$) (figure 9A) En revanche une corrélation négative significative ($p < 0.02$) est objectivée entre la ferritinémie et le rapport LyTCD4/LyTCD8 avec un coefficient de corrélation de Pearson à -0,464 (figure 9B).

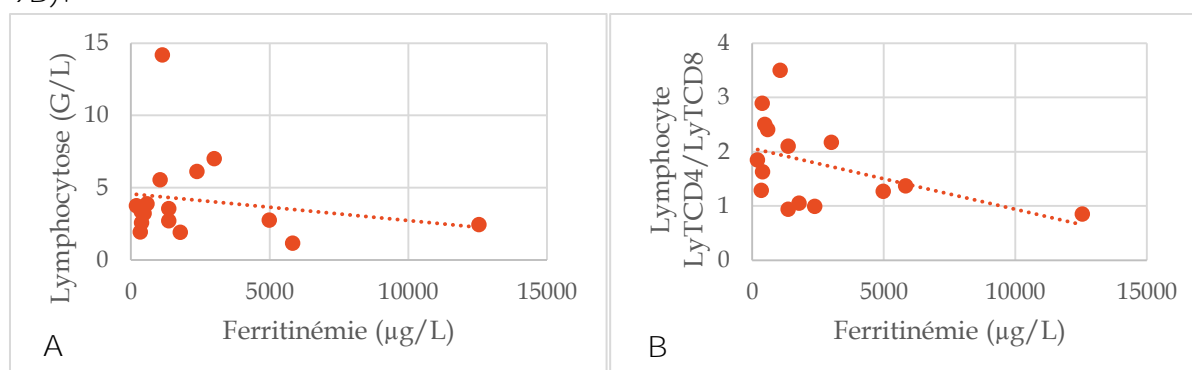


Figure 9 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie (A) et rapport LyTCD4/LyTCD8 en fonction de la ferritinémie (B)

Comparaison patients splénectomisés vs patients non splénectomisés

La lymphocytose est significativement plus élevée chez les patients splénectomisés par rapport aux non splénectomisés. Par ailleurs, on constate **qu'aucun des patients non splénectomisés ne présente une hyperlymphocytose** au moment du prélèvement.

On peut comparer les différentes populations en numération (G/L) et en proportions respectives (%) (tableau X) :

- La comparaison des proportions révèle une augmentation significative de la part des LyNK et une diminution significative de la part des LyT chez les patients splénectomisés. On ne note en revanche pas de modification de la part des LyB. Parmi les LyT on note une diminution significative du pourcentage des LyTCD8 sans modification significative de celui des LyTCD4 (figure 10).
- On observe par ailleurs une augmentation significative du ratio LyTCD4/LyTCD8 chez les patients splénectomisés (2,2 **vs** 1,3).
- **On constate que l'augmentation du taux des lymphocytes à grains décrite précédemment concerne les deux échantillons : 17,6% de Ly à grains chez les patients non splénectomisés **vs** 22,7% chez les patients splénectomisés.** La différence entre les deux échantillons est toutefois non significative ($p > 0,1$).

Tableau X : Comparaison des populations lymphocytaires entre les patients splénectomisés et non splénectomisés. * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; * : p<0,001 ; NS : non significatif**

	Patients splénectomisés (n=8)	Patients non splénectomisés (n=7)	t de Student
	Moyenne	Moyenne	
Lymphocytose	4,4 +/-1,6	2,4 +/-0,8	*
CD3+ %	62,8 +/-7,1	70,9 +/-5,0	*
CD3+ (G/L)	2,7 +/-0,8	1,7 +/-0,5	*
CD3+CD4+ %	41,9 +/-6,9	36,8 +/-6,4	NS
CD3+CD4+ (G/L)	1,8 +/-0,5	0,9 +/-0,3	***
CD3+CD8+ %	20,3 +/-6,0	30,2 +/-4,5	**
CD3+CD8+ (G/L)	0,9 +/-0,5	0,7 +/-0,3	NS
CD19+ %	19,9 +/-7,0	19,6 +/-3,7	NS
CD19+ (G/L)	0,9 +/-0,6	0,4 +/-0,1	NS
CD16+CD56+%	16,3 +/-4,7	8,5 +/-4,9	**
CD16+CD56+(G/L)	0,7 +/-0,3	0,2 +/-0,2	**
Ratio T4/T8	2,2 +/-0,9	1,3 +/-0,4	*
Ly à grains/Ly (%)	22,7 +/-9,4	17,6 +/-7,6	NS
Ly à grains (G/L)	1,01 +/-0,6	0,4 +/-0,3	**

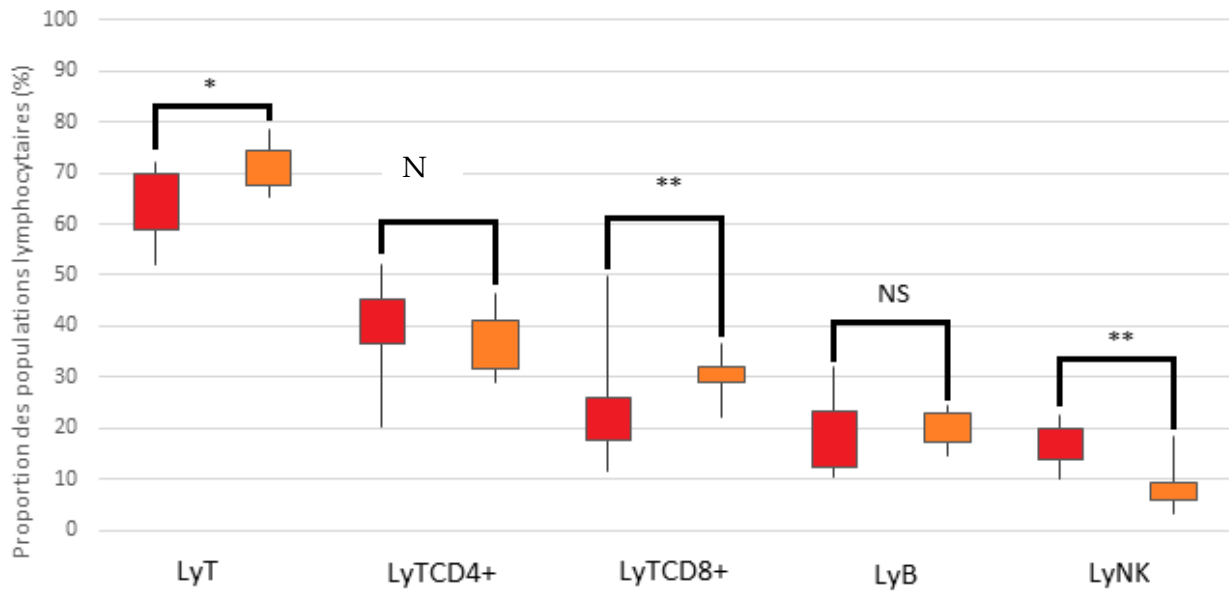


Figure 10 : Répartition des proportions des populations lymphocytaires chez les patients splénectomisés (en rouge) et non splénectomisés (en orange). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; NS : non significatif

- La comparaison des numérations des différentes populations lymphocytaires suggère que les patients splénectomisés présentent une augmentation significative de la concentration des LyT et LyNK. En revanche, il n'y a pas de différence significative de la concentration des LyB. Parmi les lymphocytes T, on note une augmentation significative de la concentration des LyTCD4 sans augmentation significative de la concentration des lymphocytes LyTCD8 (figure 11).

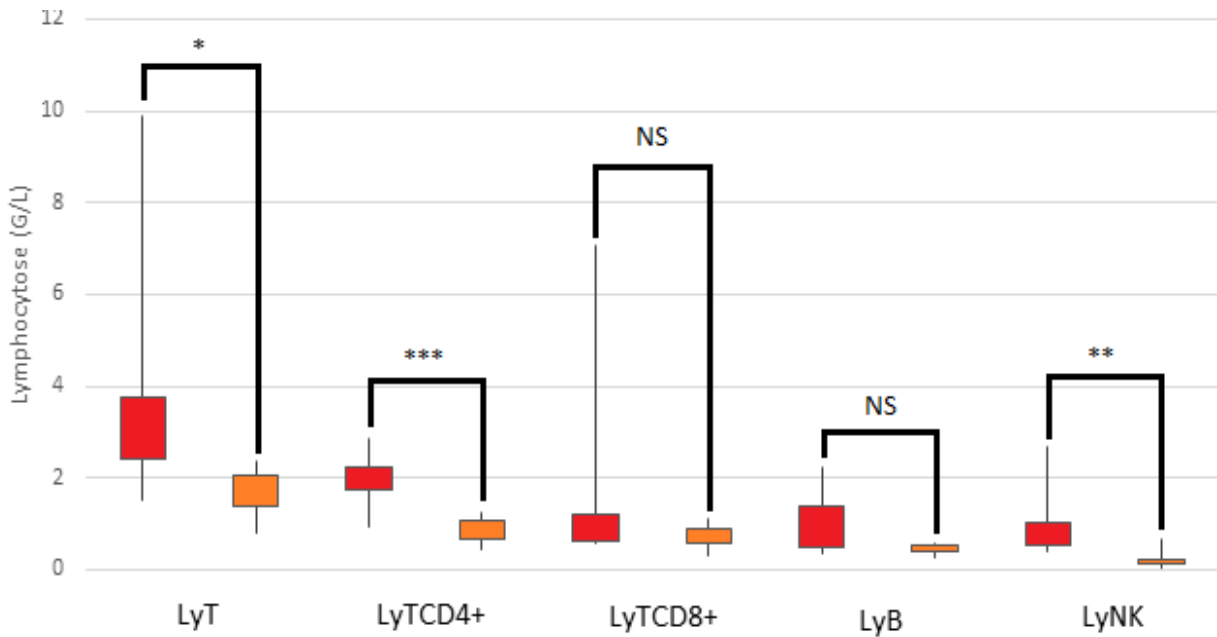


Figure 11 : Comparaison de la numération de chaque population lymphocytaire chez les patients splénectomisés (en rouge) vs non splénectomisés (en orange). * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; * : $p < 0,001$; NS : non significatif**

Nous avons décrit au préalable qu'il n'existait pas de corrélation entre la ferritinémie et la lymphocytose dans la population étudiée. En revanche, en séparant les patients splénectomisés des non splénectomisés, nous n'obtenons pas le même résultat. En effet, dans la population splénectomisée on note une corrélation positive significative entre ces deux paramètres ($p < 0.001$) alors qu'il n'y a pas de corrélation dans la population non splénectomisée ($p > 0.05$) (figure 12).

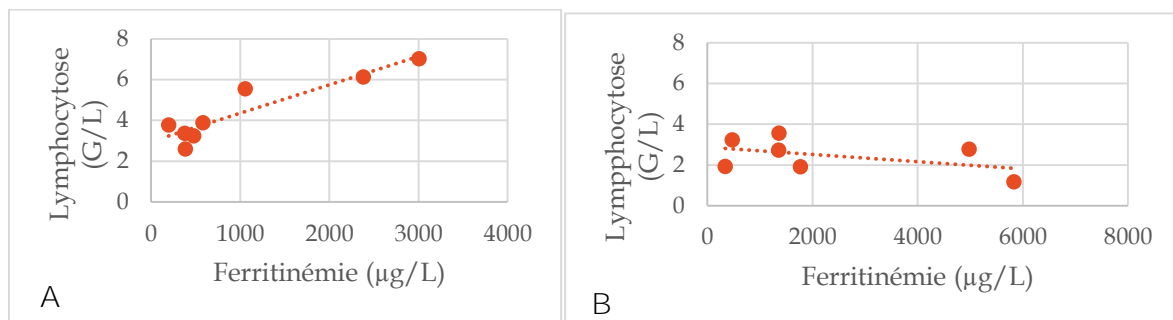


Figure 12 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez les patients splénectomisés (A) et chez les patients non splénectomisés (B)

Comparaison patient VHC+ et VHC-

La lymphocytose moyenne est plus élevée chez les patients VHC+ (4,4G/L) que VHC- (3,0G/L) mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative ($p > 0,1$). De plus tous les patients VHC+ de notre étude sont splénectomisés contre seulement 3 des patients VHC-. Il est donc difficile de comparer uniquement l'effet de l'infection par l'hépatite C dans notre échantillon.

Si on compare les patients VHC+ splénectomisés avec les patients VHC- splénectomisés, on constate que la lymphocytose moyenne est semblable (VHC+ splénectomisés : 4,4G/L **vs** VHC- splénectomisés : 4,5G/L). Par ailleurs certains patients ont été traités et ont une charge virale indétectable. Il est donc difficile **au sein de notre échantillon d'évaluer l'impact réel de l'infection par le VHC.**

Comparaison des différents chélateurs utilisés

La majorité des patients est traité par **Exjade ®** lors de l'analyse, on ne **peut pas donc comparer l'effet potentiel des** différents chélateurs.

Lymphocytose en fonction de l'âge

On note une corrélation positive entre les deux paramètres. Cependant il existe un biais important : il faut tenir compte du fait que les patients les plus âgés de notre étude sont ceux qui sont aussi splénectomisés. **D'après les** résultats précédents il paraît donc normal que les patients les plus âgés aient la lymphocytose la plus importante.

Si on évalue en revanche les deux échantillons indépendamment (splénectomisés **vs** non splénectomisés), aucun des deux échantillons ne présente **une corrélation entre l'âge et la lymphocytose.** On ne peut donc pas affirmer un lien de causalité entre ces deux paramètres.

Recherche d'une clonalité B

Le rapport kappa/lambda des immunoglobulines de surface (IgS) des LB **témoigne de l'absence d'une monoclonalité B** chez ces patients (tableau VIII). En effet, les ratios calculés sont compris entre 0,3 et 3 correspondant ainsi aux valeurs normales communément admises (54). **Il n'y a donc pas d'argument en faveur d'une** évolution monoclonale pouvant faire évoquer un syndrome lymphoprolifératif B.

Remarque : pour un des patients le marquage des anticorps **de surface n'a pas pu être réalisé en raison d'un problème technique** rencontré lors de l'analyse.

Conclusion de l'étude interindividuelle

Cette première étude a permis de mettre en évidence différents éléments :

- **Dans notre population d'étude** est présente :
 - Une lymphocytose augmentée.
 - Une corrélation significative négative entre le rapport LyTCD4/LyTCD8 et la ferritinémie.
 - Une augmentation du taux des lymphocytes à grains.

- Pas **d'argument en faveur d'une prolifération** monoclonal des lymphocytes B.
- Entre les patients splénectomisés **vs** non splénectomisés, on observe :
 - Une corrélation significative positive entre la lymphocytose et la ferritinémie seulement chez les patients splénectomisés.
 - Une augmentation de la lymphocytose chez les patients **splénectomisés par rapport aux non splénectomisés. L'augmentation concerne l'ensemble des populations lymphocytaires** en différentes proportions.
 - Un ratio LyTCD4/LyTCD8 plus élevé chez les patients splénectomisés.

II. Etude intraindividuelle

Nous avons étudié indépendamment les 16 patients de l'étude mais 4 cas seront détaillés ici. Ce sont les cas les plus pertinents qui présentaient une hyperlymphocytose lors de la réalisation de l'immunophénotypage.

Patient A :

Patiente de notre étude qui présentait l'hyperlymphocytose la plus importante lors de la réalisation de l'immunophénotypage. Nous l'avons écartée de notre étude précédente pour des raisons statistiques.

Tableau XI : Caractéristiques du patient A

Sexe	Age	Splénectomisé	Hépatite C	Chélateur
F	60 ans	Oui	Non	Exjade jusqu'en 2014 puis Ferriprox

L'étude des résultats biologiques recueillis de mars 2006 à septembre 2015 montre :

- Une concentration en hémoglobine relativement stable aux alentours de 9.3g/dL de moyenne.
- Une ferritinémie très variable, avec des périodes de très bon contrôle et **d'autres d'échappement.**
- Une lymphocytose toujours élevée mais avec des fluctuations importantes en dents de scie.

Tableau XII : Patient A : Variation des paramètres biologiques

	Hémoglobine (g/dL)	Leucocytose (G/L)	Lymphocytose (G/L)	Ferritinémie (µg/L)
Moyenne	9,3	22,3	11,8	654
Ecart type	0,5	2,8	1,8	195
CV	5	12	15	30
Mimumum	8,1	12,8	5,8	66
Maximum	11,1	36,5	20,1	1532

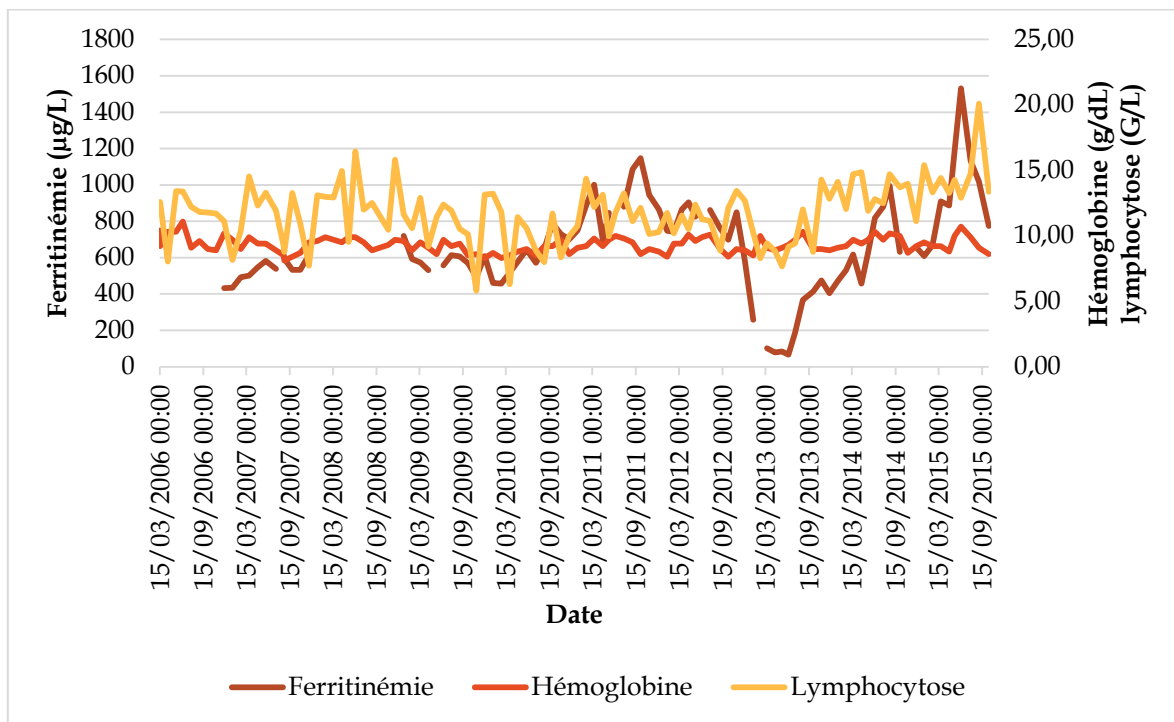


Figure 13 : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps chez le patient A entre 2006 et 2015

Chez cette patiente, nous avons par ailleurs mis en évidence une corrélation positive significative entre la lymphocytose et la ferritinémie ($p < 0.01$) (figure 14).

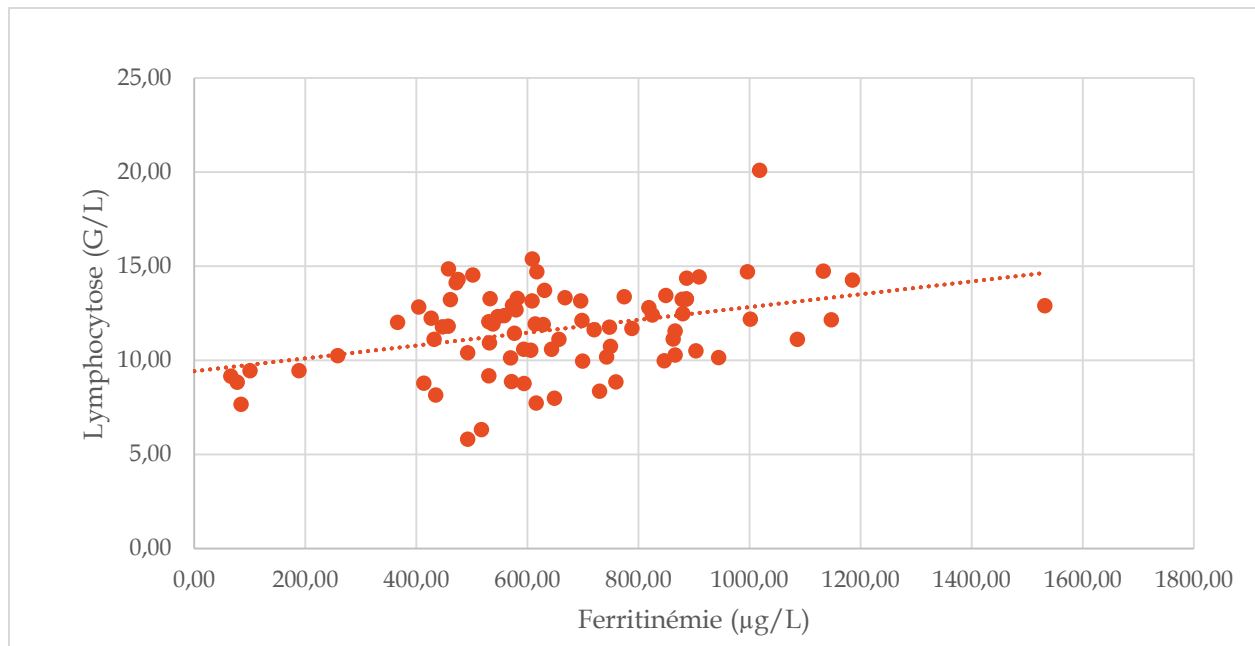


Figure 14 : Patient A : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie

Etude des populations lymphocytaires

On note une augmentation de chacune des populations lymphocytaires qui sont en dehors des valeurs de références fixées par le laboratoire (52). Le **laboratoire n'a pas fixé de valeurs normales de références pour les pourcentages** des différentes populations ainsi que pour le ratio LyTCD4/LyTCD8, nous avons donc utilisé les valeurs définies par une autre étude réalisée en 2008 au Kenya sur un échantillon de 1293 adultes sains et séronégatifs (55). On constate que les différentes proportions LyB, LyT et LyNK **sont conservées, il n'y a donc pas d'augmentation sélective d'une population par rapport à une autre. En revanche,** on a une modification dans la distribution des lymphocytes T circulants. En effet le résultat le plus inattendu est la diminution importante du rapport LyTCD4/LyTCD8 (rapport à 0,4). On a donc une augmentation importante des LyTCD8 par rapport aux LyTCD4. Ce résultat est contradictoire avec le résultat de notre étude interindividuelle précédente où on trouvait un rapport moyen LyTCD4/LyTCD8 à 2,24 chez les patients splénectomisés.

L'hyperlymphocytose majeure et l'importante augmentation des LyTCD8 peuvent faire évoquer une maladie clonale, notamment la leucémie à lymphocytes granuleux.

La leucémie à LGL est une hémopathie chronique rare **d'installation** progressive et indolente dans la grande majorité des cas. On distingue la forme avec expansion clonale des LyT (85% des cas) souvent associée à une maladie auto-immune de la forme avec expansion des LyNK (15% des cas). Le diagnostic **est souvent réalisé en phase asymptomatique lors de l'exploration d'une**

cytopénie **et/ou d'une hyperlymphocytose**. La recherche d'une leucémie à lymphocytes granuleux est préconisée lors de la persistance (**>6mois**) d'une concentration en lymphocyte granuleux **>0,5G/L** dans un contexte clinique évocateur (maladie auto-immune, splénomégalie, adénopathies) et/ou en présence de cytopénies associées. **Le traitement repose sur l'utilisation d'immunosuppresseur et concerne uniquement les formes symptomatiques** (56).

Chez cette patiente le frottis sanguin met en évidence une population de lymphocytes granuleux estimée à 53% des lymphocytes circulants, soit 4,2G/L. **L'augmentation est donc** importante et peut être mise en relation avec **l'augmentation des LyTCD8**. Toutefois, **cette augmentation n'est pas isolée**. On note aussi une augmentation des LyNK. Comme décrit précédemment, ces lymphocytes se présentent aussi sous forme de lymphocytes granuleux, il y a donc probablement une composante des deux populations. On note aussi que les autres populations lymphocytaires sont augmentées : LyTCD4 et LyB. **L'augmentation des LyTCD8 n'est donc pas isolée mais elle est** toutefois plus importante.

Dans un contexte de perturbations immunitaires avec une hyperlymphocytose fluctuante il est fort probable que la lymphocytose à lymphocytes granuleux ne soit pas monoclonale. Toutefois si un contexte clinique (maladie auto-immune de type polyarthrite rhumatoïde, adénopathies...) et/ou **l'apparition d'une neutropénie/thrombopénie l'envisage**, une recherche de la clonalité du TCR pourra être réalisée pour infirmer ou confirmer le diagnostic et mettre en place un traitement adéquat si besoin.

Tableau XIII : Patient A : Populations lymphocytaires à T=0 et T=3mois

	28/07/2015	16/10/2015
Lymphocytes totaux (G/L) (1,000-4,000)	14,2	12,1
Lymphocytes CD3+ (%) (55-84%)	69,9	69,1
Lymphocytes CD3+ (G/L) (0,700-2,100)	9,99	8,4
Lymphocytes CD3+CD4+CD8- (%) (30-55%)	20,2	19,4
Lymphocytes CD3+CD4+CD8-(G/L) (0,300-1,400)	2,9	2,4
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (%) (14-39%)	49,7	49,3
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (G/L) (0,200-0,900)	7,1	6,0
LTCD4/CTCD8 (0.9-3.3)	0.4	0.4
Lymphocytes CD3-CD19+ (%) (6-22)	10,6	12,9
Lymphocytes CD3-CD19+ (G/L) (0,100-0,500)	1,5	1,6
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%) (4-30)	18,9	17,5
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (0.090-0.600)	2,7	2,1

En conclusion l'étude du patient A montre :

- Une hyperlymphocytose majeure avec d'importantes fluctuations en dents de scie.
- Une augmentation de LGL circulant correspondant à environ 50% de la population lymphocytaire.
- Une augmentation proportionnelle des LyB, LyT et LyNK.
- Une augmentation plus importante des LyTCD8 avec un rapport LyTCD4/LyTCD8 diminué.
- Une corrélation positive entre la lymphocytose et la ferritinémie.

Patient B :

Tableau XIV : Caractéristiques patient B

Sexe	Age	Splénectomisé	Hépatite C	Chélateur
H	47 ans	Oui	Oui	Desféral®

On note chez ce patient des fluctuations très importantes de la lymphocytose au cours du temps (CV : 31%) (tableau XV). **En effet d'un mois à l'autre la lymphocytose peut parfois passer du simple au double et inversement.**

Tableau XV : Patient B : Variation des paramètres biologiques

	Hémoglobine (g/dL)	Leucocytose (G /L)	Lymphocytose (G/L)	Ferritinémie (µg/L)
Moyenne	9,9	18,5	6,8	908
Ecart type	0,7	5,4	2,2	448
CV (%)	7	29	31	48
Mimumum	8,0	10,5	2,4	343
Maximum	11,8	46,4	18,3	2493

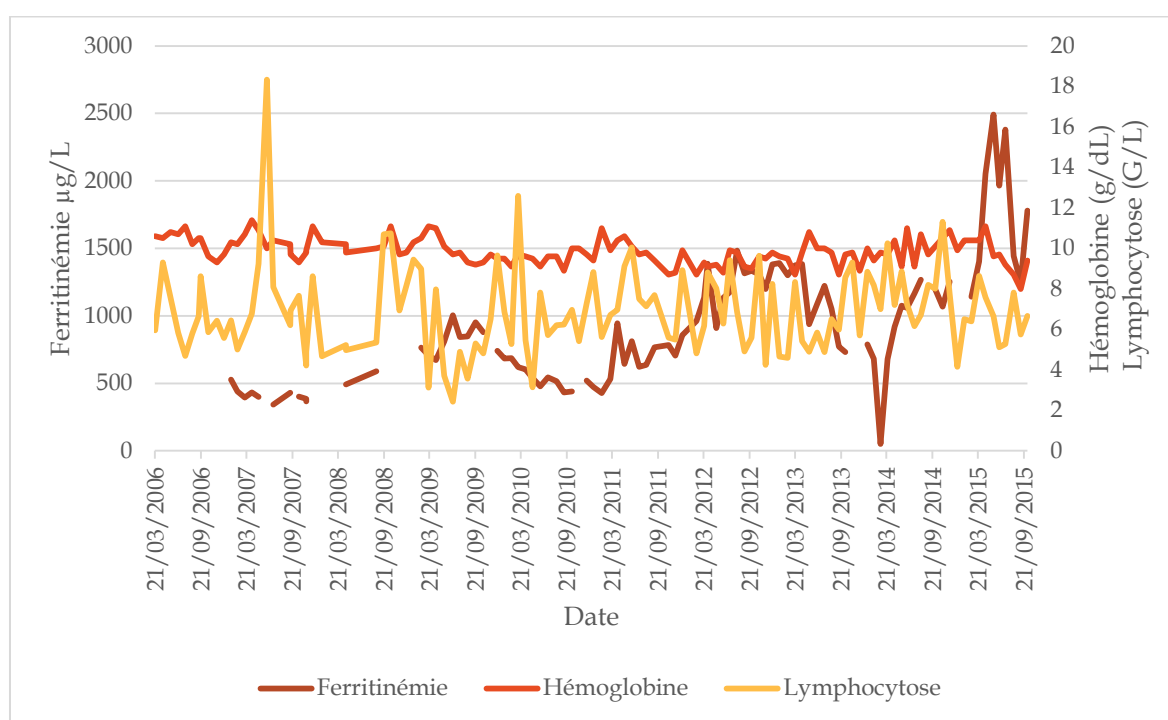


Figure 15 : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps chez le patient B

On constate aussi des périodes d'augmentations progressives (tableau XVI). En effet sur 5 mois successifs on note une élévation progressive de la lymphocytose. Cette augmentation pourrait nous orienter vers une prolifération clonale. Toutefois l'augmentation de la lymphocytose s'accompagne d'une augmentation des autres populations leucocytaires (dont les polynucléaires neutrophiles), elle n'est donc pas isolée. La première étiologie à rechercher est alors un syndrome infectieux. Or, aucun syndrome infectieux n'a été documenté à ces différentes périodes, de plus la CRP est toujours inférieure à 5mg/L.

Il est donc difficile chez ce patient de définir un seuil à partir duquel il serait logique d'évoquer un possible syndrome lymphoprolifératif.

Tableau XVI : Variation de paramètres biologiques sur 6 mois

Date	Hémoglobine (g/dL)	Leucocytose(G/L)	Lymphocytose (G/L)
07/02/2011	11,0	13,7	5,6
14/03/2011	9,9	14,0	6,7
11/04/2011	10,4	19,3	6,9
09/05/2011	10,6	24,0	9,1
08/06/2011	10,1	29,6	10,1
07/07/2011	9,7	17,4	7,5

En comparaison avec le patient précédent, chez celui-ci on ne note aucune corrélation entre la lymphocytose et la ferritinémie (figure 16).

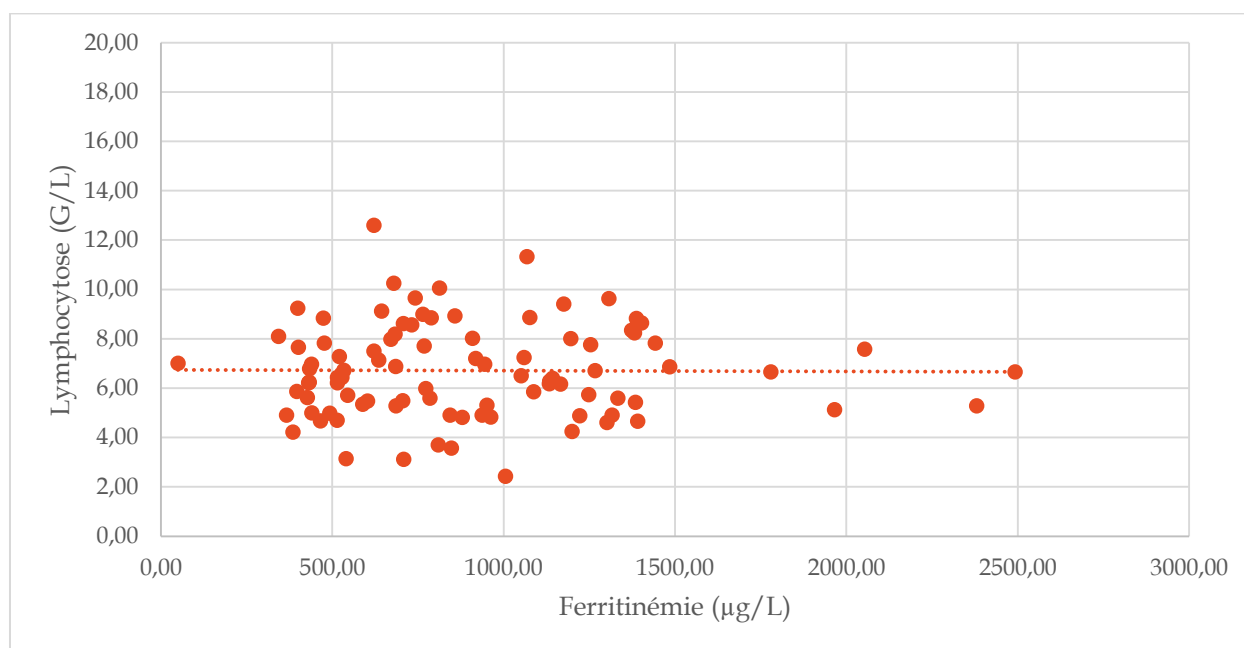


Figure 16 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez le patient B

L'augmentation de la lymphocytose s'explique par l'augmentation de toutes les populations lymphocytaires proportionnellement (tableau XVII), en effet les différentes proportions de chaque population sont conservées. Le taux de lymphocytes à grains est estimé à 36% des lymphocytes circulants, on a donc comme précédemment une augmentation importante des LGL (VN : 10-15%).

Tableau XVII : Patient B : populations lymphocytaires à t=0 et t=3mois

	09/07/2015	05/10/2015
Lymphocytes totaux (G/L) (1,000-4,000)	6,1	7,4
Lymphocytes CD3+ (%) (55-84)	61,1	59,5
Lymphocytes CD3+ (G/L) (0,700-2,100)	3,7	4,4
Lymphocytes CD3+CD4+CD8- (%) (30-55)	30,8	29,7
Lymphocytes CD3+CD4+CD8-(G/L) (0,300-1,400)	1,0	2,2
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (%) (14-39)	31	30,9
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (G/L) (0,200-0,900)	1,9	2,3
LTCD4/CTCD8 (0.9-3.3)	1,0	0,9
Lymphocytes CD3-CD19+ (%) (6-22)	21,0	22,6
Lymphocytes CD3-CD19+ (G/L) (0,100-0,500)	1,3	1,7
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%) (4-30)	16,6	16,9
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (0.090-0.600)	1,0	1,2

En conclusion :

- Lymphocytose très fluctuante, patient généralement en hyperlymphocytose.
- Période de progression inquiétante de la lymphocytose sur plusieurs mois mais associée à une augmentation des autres leucocytes circulants.
- Rapport LyTCD4/LyTCD8 dans les valeurs normales.
- Augmentation du taux des lymphocytes à grains circulants.

Patient C :

Sexe	Age	Splénectomisé	Hépatite C	Chélateur
H	48 ans	Oui	Oui	Exjade

Ce patient présentait aussi une hyperlymphocytose lors de la réalisation du premier immunophénotypage (lymphocytes : 5,5G/L). La plupart des observations sont semblables au précédent : on note des fluctuations importantes dans la lymphocytose et des périodes d'augmentations progressives.

Tableau XVIII : Patient C : Variation des paramètres biologiques

	Hémoglobine (g/dL)	Leucocytose (G /L)	Lymphocytose (G/L)	Ferritinémie (µg/L)
Moyenne	9,9	16,7	5,6	1018
Ecart type	0,95	3,20	1,21	462
CV (%)	10	19	22	45
Mimumum	7,4	7,6	2,3	377
Maximum	13,1	27,1	9,1	2842

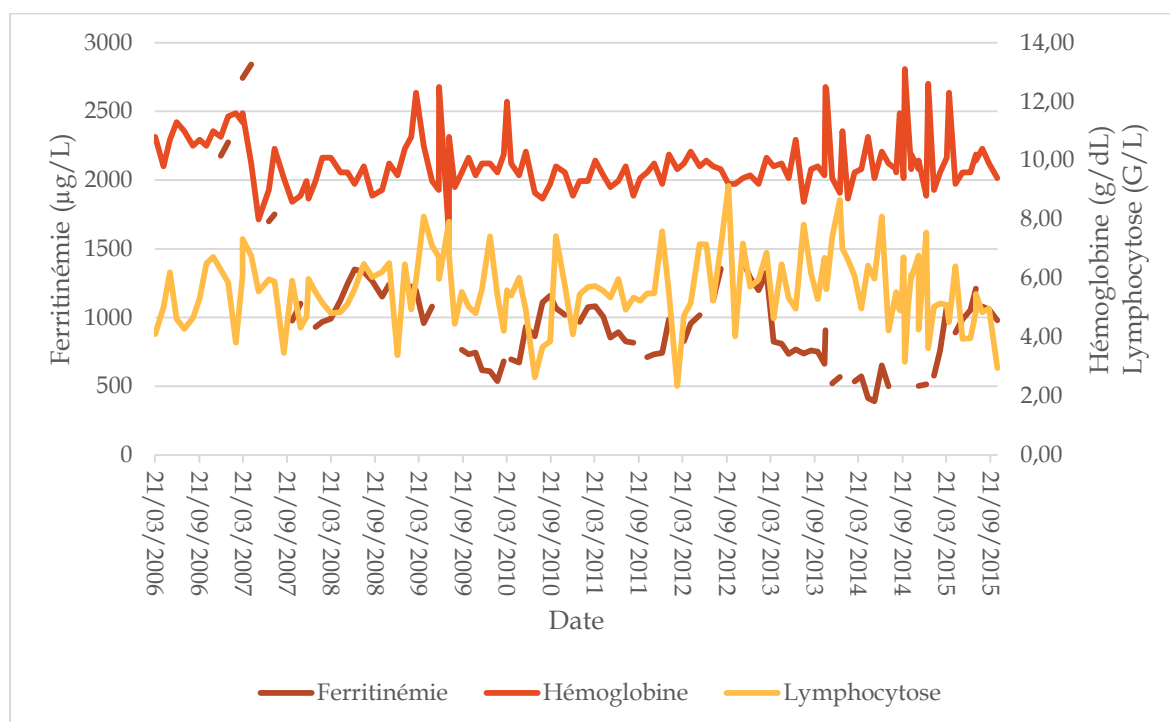


Figure 17 : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps chez le patient C

Parallèlement au patient B, nous n’objectivons pas de corrélation significative entre la lymphocytose et la ferritinémie (figure 18).

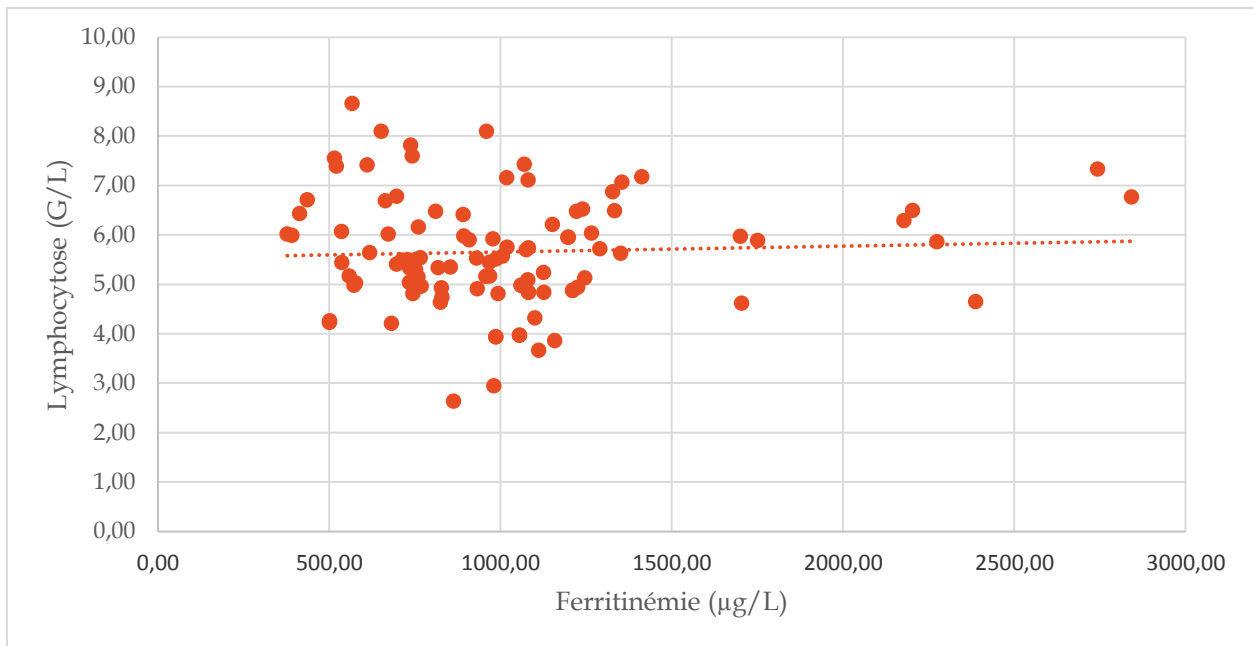


Figure 18 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez le patient C

Les différentes populations lymphocytaires (LyT, LyB et LyNK) sont aussi augmentées proportionnellement (tableau XIX).

La différence avec le patient décrit précédemment est une augmentation préférentielle des LyTCD4 par rapport au LyTCD8, en effet on retrouve un ratio LyTCD4/LyTCD8 augmenté à 3,5. **Il est difficile d'expliquer cette différence** sachant que ce sont deux patients du même âge, splénectomisés tous les deux et hépatite C positif.

Ce patient présente aussi un taux de lymphocytes à grains circulant augmenté à 28%.

Tableau XIX : Patient C : populations lymphocytaires à t=0 et t=3mois

	30/06/2015	20/10/2015
Lymphocytes totaux (G/L) (1,000-4,000)	5,543	5,153
Lymphocytes CD3+ (%) (55-84)	52,22	55,3
Lymphocytes CD3+ (G/L) (0,700-2,100)	2,894	2,851
Lymphocytes CD3+CD4+CD8- (%) (30-55)	40,44	43
Lymphocytes CD3+CD4+CD8-(G/L) (0,300-1,400)	2,241	2,215
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (%) (14-39)	11,52	12,1
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (G/L) (0,200-0,900)	0,638	0,625
LTCD4/CTCD8 (0.9-3.3)	3.5	3.5
Lymphocytes CD3-CD19+ (%) (6-22)	24,74	26,9
Lymphocytes CD3-CD19+ (G/L) (0,100-0,500)	1,371	1,386
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%) (4-30)	22,41	16,5
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (0.090-0.600)	1.242	0.85

En conclusion :

- Lymphocytose très fluctuante.
- Période de progression sur plusieurs mois mais non isolée
- Rapport LyTCD4/LyTCD8 augmenté
- Un taux de lymphocyte à grains augmenté

Patient D :

Tableau XX : Caractéristiques patient D

Sexe	Age	Splénectomisé	Hépatite C	Chélateur
H	22 ans	Oui	Non	Exjade

Les résultats biologiques ne sont disponibles sur le système informatique du laboratoire (SIL) depuis 2013. Il présente une hyperlymphocytose sur toute la durée du recueil. Elle est très fluctuante comme les patients précédents (CV : 26%) (tableau XXI). En revanche, **nous n'avons pas noté d'augmentation progressive sur plus de 3 mois pouvant évoquer un SLP.**

Tableau XXI : Patient D : Paramètres statistiques des variables biologiques

	Hémoglobine (g/dL)	Leucocytose (G /L)	Lymphocytose (G/L)	Ferritinémie (µg/L)
Moyenne	9,9	18,1	7,8	2138
Ecart type	0,8	2,8	2,0	690
CV	8	16	28	32
Mimumum	8,3	14,7	4,8	776
Maximum	11,2	25,6	13,5	3102

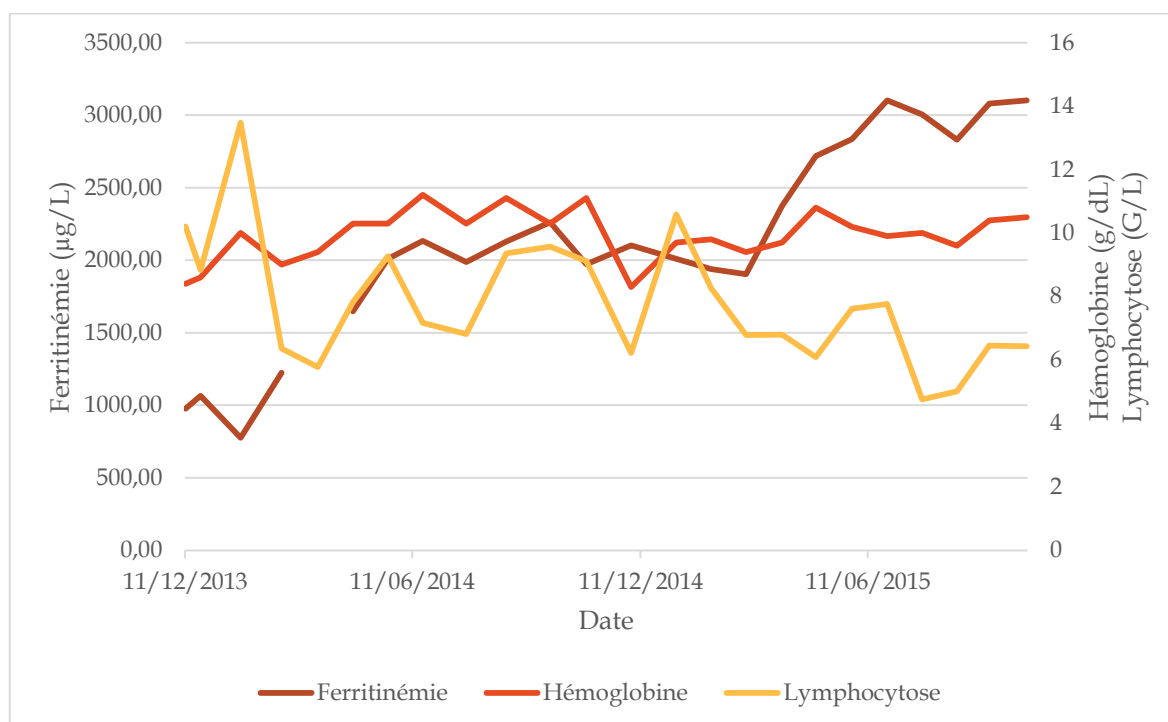


Figure 19 : patient D : Ferritinémie, hémoglobine et lymphocytose en fonction du temps

Comme chez le patient A on note une corrélation significative entre la lymphocytose et la ferritinémie, seulement celle-ci est ici négative ($p < 0.01$) (figure 20).

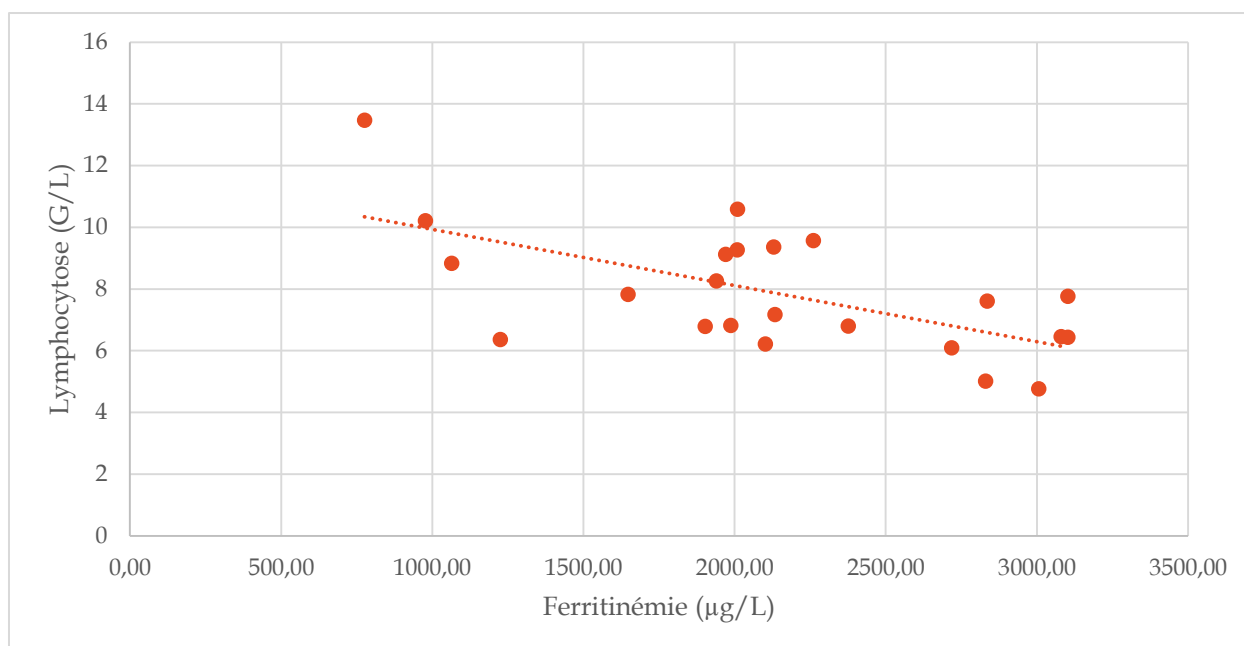


Figure 20 : Lymphocytose en fonction de la ferritinémie chez le patient D

On constate, comme précédemment, une augmentation proportionnelle des différentes populations lymphocytaires avec un rapport LyTCD4/LyTCD8 dans les valeurs de références (tableau XXII). En revanche, le taux de lymphocytes à grains est de 10%, il n'est donc pas augmenté chez ce patient.

Tableau XXII : Patient D : populations lymphocytaires à t=0 et t=3mois

	24/07/2015	18/10/2015
Lymphocytes totaux (G/L) (1,000-4,000)	7,0	5,6
Lymphocytes CD3+ (%) (55-84)	56,5	53,0
Lymphocytes CD3+ (G/L) (0,700-2,100)	4,0	2,9
Lymphocytes CD3+CD4+CD8- (%) (30-55)	37,9	37,5
Lymphocytes CD3+CD4+CD8-(G/L) (0,300-1,400)	2,7	2,1
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (%) (14-39)	17,5	15,2
Lymphocytes CD3+CD8+CD4- (G/L) (0,200-0,900)	1,2	0,8
LTCD4/CTCD8 (0.9-3.3)	2,2	2,5
Lymphocytes CD3-CD19+ (%) (6-22)	32,0	36,0
Lymphocytes CD3-CD19+ (G/L) (0,100-0,500)	2,3	2,0
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (%) (4-30)	10,2	10,1
Lymphocytes CD3-CD16+CD56+ (0.090-0.600)	0,7	0,6

Conclusion :

- Hyperlymphocytose toujours présente mais fluctuante.
- **Pas de période d'augmentation progressive** de la lymphocytose sur plus de 3 mois.
- Corrélation négative significative entre la lymphocytose et la ferritinémie.
- Rapport LyTCD4/LyTCD8 dans les valeurs de références.
- **Pas d'augmentation du taux de lymphocyte à grains.**

Conclusion étude des cas :

Les 4 cas présentés ci-dessus concernent des patients présentant une hyperlymphocytose durant la quasi-totalité de la durée du recueil des données. Nous avons aussi étudié en détail les autres patients de notre étude mais les résultats étant similaires **il n'était donc pas pertinent de tous les détailler**. Leur étude a permis de mettre plusieurs éléments en évidence :

- **L'hémoglobine est stable (CV<10%) généralement entre 9-10g/dL** grâce aux transfusions mensuelles.
- La lymphocytose est fluctuante, elle peut passer du simple au double **d'un mois à l'autre et inversement**. Cette variation est aussi observée chez les **patients ne présentant pas d'hyperlymphocytose**.
- Chez certains patients on retrouve **des périodes d'augmentation progressive** sur plusieurs mois pouvant faire évoquer un SLP. Sans signes cliniques évocateur d'une hémopathie lymphoïde maligne, une étude de la lymphocytose ne semble donc pas se justifier. En revanche, nous avons constaté **que l'augmentation ne dépasse** jamais 5 mois, donc si celle-ci se poursuit au-delà de 6 mois, une exploration pourrait se justifier.
- **L'augmentation** de la lymphocytose est expliquée **par l'augmentation de l'ensemble** des populations lymphocytaires. Cependant la répartition des LyT est variable, en effet on note une différence importante du rapport LyTCD4/LyTCD8 en fonction des patients.
- Le taux de lymphocytes à grains **est très variable d'un patient à l'autre**.
- Une corrélation significative entre la ferritinémie et la lymphocytose est retrouvée chez certains patients. Cependant cette corrélation est variable, tantôt positive et tantôt négative, aucun élément pertinent ne semble expliquer ces disparités.

III. Problématique subsidiaire :

Une difficulté a été rencontrée durant **l'analyse des résultats**. Il a été constaté sur certains bilans des disparités importantes entre le nombre de lymphocytes obtenu par la CMF et celui obtenu après lecture du frottis au microscope.

Le Sysmex permet à la fois de réaliser le comptage leucocytaire et de faire la formule sanguine. Dans certaines conditions, une formule manuelle par lecture du frottis sanguin doit être réalisée. Un comptage des différents éléments leucocytaires sur 100 cellules est donc effectué.

Deux patients présentaient d'importantes discordances entre la numération lymphocytaire effectuée par le cytomètre en flux et le résultat figurant sur l'hémogramme (tableau XXIII) :

- Patient 1 : Lymphocytose à **4,8G/L sur l'hémogramme vs 7,0G/L** lors de l'étude par CMF, soit un delta (Δ) important de +29%.
- Patient 7 : Lymphocytose à **5,3G/L sur l'hémogramme vs 3,9G/L** en CMF, soit un Δ de +36%.
- Patient 12 : Lymphocytose à **2,9G/L sur l'hémogramme vs 5,2G/L** en CMF, soit un Δ de -44%.

Les autres patients de l'étude présentent des différences moins marquées.

Les conséquences ne sont pas anodines surtout pour le patient 12 où on passe **d'une numération lymphocytaire** normale à une hyperlymphocytose et inversement pour le patient 7. **Plusieurs causes d'erreurs sont possibles, la cause** la plus évidente serait une erreur lors du comptage microscopique du frottis sanguin. Pour avoir une meilleure approximation du taux de lymphocytes, nous avons réalisé un compte sur 300 cellules de plusieurs frottis.

Tableau XXIII : Comparaison du compte lymphocytaire par trois techniques différentes

Patient	Hémogramme	Recompte	CMF
1	4,8	7,6	7,0
2	6,4	6,2	5,6
3	0,9	1,0	1,2
4	1,1	1,0	1,1
5	2,9	2,9	3,2
6	3,4	3,4	3,6
7	5,3	5,0	3,9
8	6,2	5,9	5,6
9	2,4	2,3	2,7
10	3,1	3,4	3,5
11	4,8	4,3	5,5
12	2,9	5,2	5,2
13	2,4	2,4	2,5
14	2,2	2,1	2,4
15	4,8	3,9	3,8
16	4,6	3,5	3,6
17	2,7	2,6	2,6
18	3,0	3,2	2,8
19	2,6	3,4	3,4
20	5,3	4,9	6,1
21	6,6	6,6	7,4
22	14,1	15,5	14,2
23	13,4	14,0	12,1
24	2,7	2,3	2,8

Après comptage sur 300 cellules on trouve pour nos deux patients des valeurs très proches de la CMF (patient 1 : 7,6G/L **vs** 7,0G/L et patient 12 : 5,2G/L **vs** 5,2G/L). Les différences retrouvées précédemment **s'expliquent** donc bien par une erreur technique lors de la lecture du frottis. En effet, un comptage sur 100 leucocytes **peut s'avérer** insuffisant pour évaluer avec précision et reproductibilité les différentes populations leucocytaires.

Cependant sur l'ensemble des échantillons analysés, **l'étude statistique de** la répartition ne montre pas de différence significative entre les deux modes de comptages manuels par rapport à la CMF ($p > 0,30$ et $p > 0,50$). **L'approximation** par le comptage sur 100 cellules est donc acceptable au risque de 5%.

DISCUSSION

Lors de mon stage au laboratoire, nous avons noté la présence d'une hyperlymphocytose parfois marquée chez certains patients β -thalassémiques majeurs. Avec l'augmentation de l'espérance de vie grâce aux traitements bien conduits, la présence d'une hyperlymphocytose peut donc évoquer l'évolution vers un syndrome lymphoprolifératif. Nous nous sommes donc proposé de réaliser une étude rétrospective et prospective afin de décrire cette lymphocytose : ses causes, la répartition des populations lymphocytaires et son évolution dans le temps.

L'analyse bibliographique réalisée dans un premier temps a permis de mettre en évidence :

- Une augmentation de la lymphocytose chez les patients β -thalassémiques majeurs, plus importante parmi les patients splénectomisés avec variation de la répartition des sous populations lymphocytaires et notamment du **ratio LyTCD4/LyTCD8 d'une étude à l'autre.**
- Différents contextes peuvent expliquer les perturbations lymphocytaires :
 - La splénectomie
 - Les transfusions régulières
 - La surcharge martiale
 - La carence en zinc
 - **L'infection par le VHC**

Du fait de cette hyperlymphocytose, les patients ont donc bénéficié **d'une** étude par immunophénotypage des sous populations lymphocytaires. Les résultats de notre étude **témoignent d'une** lymphocytose moyenne augmentée **par rapport à la population générale mais qui ne dépasse pas le seuil d'alerte** fixée à 4G/L. Par ailleurs cette augmentation est plus importante chez les patients splénectomisés et nous avons également retrouvé une corrélation inversement proportionnelle entre le ratio LyTCD4/LyTCD8 et la ferritinémie. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (19,20,22,24). Nous avons relevé également une augmentation de la part des LyNK et une diminution de la part des LyT chez les patients splénectomisés, ces résultats confirment les études réalisées sur les patients splénectomisés (39,40).

En revanche, le ratio LyTCD4/LyTCD8 est significativement plus élevé chez les patients splénectomisés par rapport aux non splénectomisés, alors que les **études n'ont pas relevé** de différences significatives (18,24). On constate également la présence de LGL en quantité augmentée aussi bien chez les patients splénectomisés que non splénectomisés, or cela a seulement été décrit chez les patients splénectomisés (39,40).

Notre étude rétrospective a permis de mettre en évidence une fluctuation **importante de la lymphocytose au cours du temps, en effet d'un mois à l'autre**

celle-ci peut passer du simple au double **et inversement**. **Cet élément n'avait pas** été décrit dans la littérature, en effet la majorité des études se sont intéressées à la description de la lymphocytose uniquement à un instant t. La variabilité **importante permet donc d'exclure rapidement une évolution** vers un SLP qui se caractérise généralement par une augmentation progressive de la lymphocytose. **Toutefois chez certains patients, on a relevé la présence d'une évolution** progressive sur quelques mois. La difficulté consiste alors à fixer un seuil **d'alerte**. **Au vu de nos résultats, il semble pertinent de proposer un seuil d'alerte** à 6 mois successifs **d'augmentation**.

Les principaux résultats sont donc comparables avec ceux décrits dans la littérature, ce qui "valide" le schéma de notre étude et les données. Notre étude présente toutefois certaines limites. Outre le faible effectif général, il a été **difficile de mettre en évidence l'impact de l'infection par le VHC**. **En effet, il est difficile de s'affranchir du biais lié à la splénectomie**. Par ailleurs, plusieurs des patients ont bénéficié de traitements antiviraux et ont une charge virale indétectable. Une cohorte comportant plus de patients VHC+ non traités et non splénectomisés serait donc nécessaire pour évaluer le véritable impact de **l'infection sur les populations lymphocytaires**. En raison du même biais, il a aussi **été impossible d'évaluer la lymphocytose en fonction de l'âge des patients**. Une plus grande cohorte comportant plus de patients non splénectomisés serait nécessaire pour évaluer l'impact de l'âge sur l'évolution de la lymphocytose.

CONCLUSION

Nous avons cherché dans ce travail à décrire et expliquer les raisons de la **lymphocytose des patients β -thalassémiques**. Nous avons mis en évidence une augmentation significative de la lymphocytose **dans notre population d'étude**.

Les raisons des perturbations immunologiques sont multiples : splénectomie, transfusions régulières, surcharge martiale, infection par le virus de l'hépatite C ou encore carence en zinc sont d'autant de raisons pouvant expliquer les modifications rencontrées.

La splénectomie semble être l'élément majeur de ces perturbations, en effet nous avons noté une augmentation significative de la lymphocytose chez les patients splénectomisés. Par ailleurs, nous avons décrit une augmentation de la part des LyNK, une diminution de celle les LyT et un rapport LyTCD4/LyTCD8 augmenté.

Les résultats laissent place à d'autres interrogations. Il pourrait être intéressant d'étudier les fonctions immunologiques plus en détail en évaluant la répartition des différentes formes mémoires et effectrices des lymphocytes B et T circulants. En effet, il est probable que la répartition des formes circulantes soit différente de la population saine vu les différentes stimulations et perturbations immunologiques auxquelles sont soumis ces patients. Par ailleurs, une étude comparative du répertoire V β du TCR serait également intéressante à réaliser.

Une autre perspective d'étude serait d'évaluer l'impact de l'infection par le VHC sur le système immunitaire sur une grande cohorte de patients VHC+, traités ou non, avec des charges virales variables. Cela permettrait de confronter les résultats aux rares études retrouvées dans la littérature afin de confirmer ou d'infirmer la présence d'une corrélation entre le rapport LyTCD4/LyTCD8 et la charge virale (43).

Il serait aussi intéressant d'étudier la zincémie des patients β -thalassémiques suivis, en effet de nombreuses études concluent à des carences chez ces patients, seulement nous n'avons pas trouvé d'étude réalisée en France. Vu les différences socio-économiques et culturelles, il serait donc justifié d'évaluer la prévalence de la carence en zinc et de mettre en place si besoin une supplémentation adaptée.

BIBLIOGRAPHIE

1. JOLY P, PONDARRE C et BADENS C. Les bêta-thalassémie : aspects moléculaires, épidémiologiques, diagnostiques et cliniques. *Ann Biol Clin* 2014, 72(6), pp.639-68.
2. Syndrome thalassémique majeure. HAS. Juin 2008.
3. GALANELLO R, ORIGA R. Review : beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010, 5(11).
4. AGUILAR-MARTINEZ P, BADENS C, BONELLO-PALOT N, CADET E, COUQUE N, DUCROCQ R, et al. Arbres décisionnels pour le diagnostic et la caractérisation moléculaire des hémoglobinopathies. *Annales de Biologie Clinique*, 2010, pp.455–464.
5. **VINATIER I. Recommandations pour la mise en oeuvre et l'interprétation de l'étude de l'hémoglobine.** Laboratoire CERBA.
6. NEGRE O, EGGIMANN A-V, BEUZARD Y, RIBEIL J-A, BOURGET P, BORWORNPINYO S, et al. Gene Therapy of the β -Hemoglobinopathies by Lentiviral Transfer of the $\beta^{A(T87Q)}$ - *Globin* Gene. *Hum Gene Ther*. 2016, 27(2), pp.148–65.
7. EASOW MATHEW M, SHARMA A, ARAVINDAKSHAN R. Splenectomy for people with thalassaemia major or intermedia (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016, Issue 6. Art. No.:CD010517.
8. GANZ T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood*, 2011, 117(17), pp.4425–4433.
9. **TANDARA L, SALAMUNIC I. Iron metabolism: current facts and future directions.** *Biochemia Medica*, 2012, 22(3), pp.311–328.
10. PIETRANGELO A. Hepcidin in human iron disorders: therapeutic implications. *Journal of Hepatology*, 2011, 54(1), pp.173–181.
11. NEMETH E. Hepcidin and β -thalassemia major. *Blood*, 2013, 122(1), pp.3–4.
12. TAHER AT, VIPRAKASIT V, MUSALLAM KM, CAPPELLINI MD. Treating iron overload in patients with non-transfusion-dependent thalassemia: Critical Review. *American Journal of Hematology*, 2013, 88(5), pp.409–415.
13. Hépatite chronique C. HAS. Juillet 2015.
14. ANSARI SH, SHAMSI TS, KHAN MT, PERVEEN K, FARZANA T, ERUM S, et al. Seropositivity of Hepatitis C, Hepatitis B and HIV in Chronically Transfused β -Thalassaemia Major Patients. *Journal of the College of Physicians Surgeons Pakistan*, 2012, 22(9), pp.610–611.

15. TAMADDONI A, MOHAMMADZADEH I, ZIAEI O. Seroprevalence of HCV antibody among patients with β -thalassemia major in Amirkola thalassemia center, Iran. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 2007, 6(1), pp.42-44.
16. MUSALLAM KM, RIVELLA S, VICHINSKY E, RACHMILEWITZ EA. Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica*, 2013, 98(6), pp.833-844.
17. INATI A, NOURELDINE MA, MANSOUR A, ABBAS HA. Endocrine and Bone Complications in β -Thalassemia Intermedia: Current Understanding and Treatment. *BioMed Research International*, 2015, pp.1-9.
18. GRADY RW, AKBAR AN, GIARDINA PJ, HILGARTNER MW, SOUSA M. Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassaemia major: the relative contributions of transfusion and splenectomy. *British Journal of Haematology*, 1985, 59(4), pp.713-724.
19. PARDALOS G, KANAKOUDI-TSAKALIDIS F, MALAKA-ZAFIRIU M, TSANTALI H, ATHANASIOU-METAXA M, KALLINIKOS G, et al. Iron-related disturbances of cell-mediated immunity in multitransfused children with thalassemia major. *Clinical and Experimental Immunology*, 1987, 68(1), pp.138-145.
20. HODGE G, LLOYD JV, HODGE S, STORY C, HAN P. Functional lymphocyte immunophenotypes observed in thalassaemia and haemophilia patients receiving current blood product preparations. *British Journal of Haematology*, 1999, 105(3), pp.817-825.
21. PATTANAPANYASAT K, THEPTHAI C, LAMCHIAGDHASE P, LERDWANA S, TACHAVANICH K, THANOMSUK P, et al. Lymphocyte subsets and specific T-cell immune response in thalassemia. *Cytometry*, 2000, 42(1), pp.11-17.
22. GHARAGOZLOO M, KARIMI M, AMIRGHOFRAN Z. Double-faced cell-mediated immunity in β -thalassemia major: stimulated phenotype versus suppressed activity. *Annals of Hematology*, 2009, 88(1), pp.21-27.
23. AL-AWADHI AM, ALFADHLI SM, AL-KHALDI D, BORHAMA M, BORUSLY M. Investigation of the distribution of lymphocyte subsets and zinc levels in **multitransfused** β -thalassemia major patients. *International Journal Of Laboratory Hematology*. 2010, 32(2), pp.191-196.
24. SARI TT, GATOT D, AKIB AA, BARDOSONO S, HADINEGORO SR, HARAHAH AR, et al. Immune Response of Thalassemia Major Patients in Indonesia with and without Splenectomy. *Acta Medica Indonesiana*, 2014, 46(3), pp.217-225.
25. **LOMBARDI G, MATERA R, MINERVINI MM, CASCAVILLA N, D'ARCANGELO P, CAROTENUTO M, et al.** Serum levels of cytokines and soluble antigens in polytransfused patients with beta-thalassemia major: relationship to immune status. *Haematologica*, 1994, 79(5), pp.406-412.


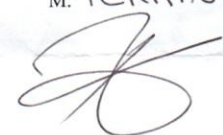




26. CONSTANTOULAKIS M, TRICHOPOULOS D, AVGOUSTAKI O, ECONOMIDOU J. Serum immunoglobulin concentrations before and after splenectomy in patients with homozygous β -thalassaemia. *Journal of Clinical Pathology*, 1978, 31(6), pp.546-550.
27. ATASEVER ARSLAN B, ERDEM-KURUCA S, KARAKAS Z, ERMAN B, ERGEN A. Effects of micro environmental factors on natural killer activity (NK) of Beta Thalassemia major patients. *Cellular Immunology*, 2013, 282(2), pp.93-99.
28. GANZ T, NEMETH E. Iron homeostasis in host defence in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(8), pp.500-510.
29. PORTO G, DE SOUSA M. Iron overload and immunity. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, 13(35), pp.4707-4715.
30. FABIO G, ZARANTONELLO M, MOCELLIN C, BONARA P, CORENGIA C, FARGION S, et al. Peripheral lymphocytes and intracellular cytokines in C282Y homozygous hemochromatosis patients. *Journal of Hepatology*, 2002, 37(6), pp.753-761.
31. TAYLOR C, NAVARRETE C, CONTRERAS M. Immunological complications of blood transfusion. *Transfusion Alternative in Transfusion Medicine*, 2008, 10(3), pp.112-126.
32. SINGER ST, WU V, MIGNACCA R, KUYPERS FA, MOREL P, VICHINSKY EP. Alloimmunization and erythrocyte autoimmunization in transfusion-dependent thalassemia patients of predominantly Asian descent. *Blood*, 2000, 96(10), pp.3369-3373.
33. DASARARAJU R, MARQUES MB. Adverse effects of transfusion. *Cancer Control*, 2015, 22(1), pp.16-25.
34. KIRKLEY SA. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1999, 6(5), pp.652-657.
35. GHIO M, CONTINI P, UBEZIO G, ANSALDI F, SETTI M, TRIPODI G. Blood transfusions with high levels of contaminating soluble HLA-I correlate with levels of soluble CD8 in recipients' plasma ; a new control factor in soluble HLA-I-mediated transfusion-modulated immunomodulation?. *Blood Transfusion Supplement*, 2014, 12(1), pp. 105-108.
36. MEBIUS RE, KRAAL G. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(8), pp.606-616.
37. BRONTE V, PITTET MJ. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*, 2013, 39(5), pp.806-818.
38. WANG WC, HERROD HG, VALENSKI WR, WATT RJ. Lymphocyte and complement abnormalities in splenectomized patients with hematologic disorders. *American Journal of Hematology*, 1988, 28(4), pp.239-245.

39. KELEMEN E, GERGELY P, LEHOCZKY D, TRISKA E, DEMETER J, VARGHA P. Permanent large granular lymphocytosis in the blood of splenectomized individuals without concomitant increase of in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Clinical and Experimental Immunology*, 1986, 63(3), pp.696-702.
40. GARCIA-SUAREZ J, PRIETO A, REYES E, ARRIBALZAGA K, PEREZ-MACHADO MA, LOPEZ-RUBIO M, et al. Persistent lymphocytosis of natural killer cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients after splenectomy. *British Journal of Haematology*, 1995, 89(3), pp.653-655.
41. WOLF HM, EIBL MM, GEORGI E, SAMSTAG A, SPATZ M, URANÜS S, et al. Long-term decrease of CD4+ CD45RA+ T cells and impaired primary immune response after post-traumatic splenectomy. *British Journal of Haematology*, 1999, 107(1), pp.55-68.
42. MACPARLAND SA, CHEN AY, CORKUM CP, PHAM TNQ, MICHALAK TI. Patient-derived hepatitis C virus inhibits CD4+ but not CD8+ T lymphocyte proliferation in primary T cells. *Virology Journal*, 2015, 19; 12: 93.
43. MACPARLAND SA, PHAM TNQ, GUJAR SA, MICHALAK TI. De novo infection and propagation of wild-type Hepatitis C virus in human T lymphocytes in vitro. *Journal of General Virology*, 2006, 87(12), pp.3577-3586.
44. HUANG Y, ZHENG MJ, XU YH. Analysis of the relationship between peripheral blood T lymphocyte subsets and HCV RNA levels in patients with chronic hepatitis C. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(3), pp.10057-10063.
45. EL MISSIRY M, HAMED HUSSEIN M, KHALID S, YAQUB N, KHAN S, ITRAT F, et al. Assessment of Serum Zinc Levels of Patients with Thalassemia Compared to Their Siblings. *Anemia*, Volume 2014, Article ID 125452.
46. PRASAD AS. Zinc in human health: effect of zinc on immune cells. *Molecular Medicine*, 2008, 14(5-6), pp.353-357.
47. MASHHADI MA, SEPEHRI Z, HEIDARI Z, SHIRZAEI E, KIANI Z. The Prevalence of Zinc Deficiency in Patients With Thalassemia in South East of Iran, Sistan and Baluchistan Province. *Iran Red Crescent Medical Journal*, 2014, 16(8):e6243.
48. SHAMSHIRSAZ AA, BEKHEIRNIA MR, KAMGAR M, POURZAHEDGILANI N, BOUZARI N, HABIBZADEH M, et al. Metabolic and endocrinologic complications in beta-thalassemia major: a multicenter study in Tehran. *BMC Endocrine Disorders*, 2003, 12; 3(1): 4.
49. MAHYAR A, AYAZI P, PAHLEVAN A-A, MOJABI H, SEHHAT M-R, JAVADI A. Zinc and copper status in children with Beta-thalassemia major. *Iranian Journal of Pediatrics*, 2010, 20(3), pp.297-302.
50. SULTAN S, IRFAN SM, KAKAR J, ZEESHAN R. Effect of iron chelator desferrioxamine on serum zinc levels in patients with beta thalassemia major. *The Malaysian Journal of Pathology*, 2015, 7(1), pp.35-38.

51. GIZE A, MATHEWOS B, MOGES B, WORKINEH M, GEDEFAW L. Establishment of Normal Reference Intervals for CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺ to CD8⁺ Ratio of T Lymphocytes in HIV Negative Adults from University of Gondar Hospital, North West Ethiopia. *AIDS Research and Treatment*, Volume 2014 (2014), Article ID 267450.
52. COMANS-BITTER WM, DE GROOT R, VAN DEN BEEMD R, NEIJENS HJ, HOP WC, GROENEVELD K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood Reference values for lymphocyte subpopulations. *Journal of Pediatrics*, 1997, 130(3), pp.388–393.
53. ZHANG R, SHAH MV, LOUGHRAN TP. The root of many evils: indolent large granular lymphocyte leukaemia and associated disorders. *Hematological Oncology*, 2010, 28(3), pp.105-117.
54. MARTI GE, RAWSTRON AC, GHIA P, HILLMEN P, HOULSTON RS, KAY N, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *British Journal of Haematology*, 2005, 130(3), pp. 325-332.
55. KIBAYA RS, BAUTISTA CT, SAWE FK, SHAFFER DN, SATEREN WB, SCOTT PT, et al. Reference Ranges for the Clinical Laboratory Derived from a Rural Population in Kericho, Kenya. *PLoS ONE*, 2008, 3; 3(10):e3327.
56. BAREAU B, REY J, HAMIDOU M, DONADIEU J, MORCET J, REMAN O, et al. Analysis of a French cohort of patients with large granular lymphocyte leukemia: a report on 229 cases. *Haematologica*, 2010, 95(9), pp.1534–41.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 26 septembre 2016

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Mme Hélène SCHWALLER</p> <p align="center"><u>Sujet</u> : BÊTA-THALASSEMIE MAJEURE ET LYMPHOCYTOSE Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patients suivis au CHRU de NANCY.</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Mme Béatrice FAIVRE, PU Directeur : M. Julien PERRIN, MCU-PH Juges : M. M. Dominique STESCHENKO, PH M. Pierre FEUGIER, PU-PH M. Julien BROSEUS, MCU-PH</p>	<p align="right">Vu, Nancy, le 9 Août 2016</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">M. B. FAIVRE M. PERRIN</p>  
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 30.08.2016</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p>   <p align="center">Francine PAULUS</p>	<p align="right">Vu, Nancy, le 12 SEP. 2016</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>   <p align="center">Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 9206.</p>

N° d'identification :

TITRE

BÊTA-THALASSEMIE MAJEURE ET LYMPHOCYTOSE
Etude rétrospective et prospective d'une cohorte de 16 patients
suis au CHRU de NANCY

Thèse soutenue le 26 septembre 2016

Par SCHWALLER Hélène

RESUME :

Objectif : Certains patients β -thalassémiques majeurs présentent des hyperlymphocytoses pouvant être importantes. Du fait de l'amélioration de la prise en charge de ces patients, certains atteignent des tranches d'âges où la question du développement d'une hémopathie maligne chronique peut se poser. Il semble donc important de caractériser qualitativement et quantitativement ces hyperlymphocytoses. **Matériels et Méthodes :** L'étude porte sur une cohorte de 16 patients β -thalassémiques majeurs, elle se décompose en deux phases. Une phase rétrospective sur 10 ans afin d'étudier l'évolution de la lymphocytose au cours du temps. Une phase prospective dont la finalité est l'étude précise de la composition lymphocytaire. Une analyse est alors réalisée par cytométrie en flux permettant de séparer les différentes sous populations : Lymphocytes TCD4, Lymphocytes TCD8, Lymphocytes B et Lymphocytes NK. Une recherche de la clonalité des lymphocytes B est effectuée en parallèle. **Résultats :** la lymphocytose peut être très fluctuante au cours du temps chez un même patient. On décrit aussi des périodes d'augmentations progressives sur plus de 3 mois. L'étude prospective montre quant à elle une lymphocytose augmentée par rapport à la population générale, cette augmentation est par ailleurs plus importante chez les patients splénectomisés. Une corrélation inversement proportionnelle entre le ratio LyTCD4/LyTCD8 et la ferritinémie est aussi objectivée. **Discussion-Conclusion :** Ces résultats confirment en partie ceux de la littérature. La splénectomie, les transfusions régulières, la surcharge martiale, la carence en zinc ou encore l'infection par le virus de l'hépatite C sont d'autant d'éléments pouvant concourir aux perturbations immunologiques décrites. Les périodes d'augmentations progressives sur 3 mois (suivies d'une période de décroissance) sont relativement fréquentes chez ces patients, ainsi il paraît raisonnable que la question du développement d'un syndrome lymphoprolifératif ne se pose que lorsque cette augmentation perdure sur 6 mois au moins. Pour aller plus loin, il pourrait être intéressant d'étudier les fonctions immunologiques plus en détail en évaluant la répartition des différentes formes mémoires et effectrices des lymphocytes B et T circulants. Par ailleurs, une étude comparative du répertoire V β du TCR serait également intéressante à réaliser.

MOTS CLES : LYMPHOCYTOSE, BETA-THALASSEMIE, SPLENECTOMIE, HEMOCHROMATOSE
CYTOMETRIE EN FLUX

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Julien Perrin	Service d'hématologie biologique - CHRU de Nancy	Expérimentale X
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème 5

Thèmes

- 1 – Sciences fondamentales
- 3 – Médicament
- 5** – Biologie

- 2 – Hygiène/Environnement
- 4 – Alimentation – Nutrition
- 6 – Pratique professionnelle