



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-theses-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>

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement
Le 17 novembre 2009



Par Mme Joanna SOKOLOWSKA-GILLOIS

LYMPHOCYTOSE POLYCLONALE A
LYMPHOCYTES BINUCLEES :
UNE SERIE MONOCENTRIQUE DE 33 PATIENT(E)S

Conformément aux dispositions du décret n°90-810
du 10 septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

THESE
POUR DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN MEDECINE

Examineurs de la thèse :

Monsieur T. LECOMPTE	Professeur	Président
Monsieur P. JONVEAUX	Professeur	Juge
Monsieur X. TROUSSARD	Professeur	Juge
Madame M-C. BENE	Professeur	Juge
Monsieur A. DALLOUL	Professeur	Juge
Monsieur H. MOSSAFA	Docteur en médecine	Juge
Monsieur J-F. LESESVE	Docteur en médecine	Directeur de Thèse

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Présenté et soutenu publiquement
Le 17 novembre 2009

Par Mme Joanna SOKOLOWSKA-GILLOIS

19 NOV. 2009



LYMPHOCYTOSE POLYCLONALE A
LYMPHOCYTES BINUCLEES :
UNE SERIE MONOCENTRIQUE DE 33 PATIENT(E)S

Conformément aux dispositions du décret n°90-810
du 10 septembre 1990, ce mémoire tient lieu de

THESE
POUR DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN MEDECINE

Examineurs de la thèse :

Monsieur T. LECOMPTE	Professeur	Président
Monsieur P. JONVEAUX	Professeur	Juge
Monsieur X. TROUSSARD	Professeur	Juge
Madame M-C. BENE	Professeur	Juge
Monsieur A. DALLOUL	Professeur	Juge
Monsieur H. MOSSAFA	Docteur en médecine	Juge
Monsieur J-F. LESESVE	Docteur en médecine	Directeur de Thèse

Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE

Vice Doyen Recherche : Professeur Jean-Louis GUEANT

Vice Doyen Pédagogie : Professeur Annick BARBAUD

Vice Doyen Campus : Professeur Marie-Christine BÉNÉ

Asseseurs :

du 1^{er} Cycle :

du 2^{ème} Cycle :

du 3^{ème} Cycle :

Filières professionnalisées :

Prospective :

FMC/EPP :

M. Christophe NEMOS

M. le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

M. le Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT

M. le Professeur Christophe CHOSEROT

M. le Professeur Laurent BRESLER

M. le Professeur Jean-Dominique DE KORWIN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Jean BEUREY
Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT
Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS
Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gabriel FAIVRE – Gérard FIEVE - Jean FLOQUET
Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ
Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET – Christian JANOT - Jacques LACOSTE
Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE
Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ - Pierre MATHIEU
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU – Jacques POUREL - Jean PREVOT
Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Paul SADOUL - Daniel SCHMITT
Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ
Gérard VAILLANT – Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LE FAOU – Professeur Alain LOZNIEWSKI

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU-NAVIER

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD – Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

**49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE,
HANDICAP et RÉÉDUCATION**

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI

Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE

Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD

Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL

Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT - Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACÉ

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

2^{ème} sous-section : (Chirurgie digestive)

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER
Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteur Béatrice MARIE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Nicole LEMAU de TALANCE

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ère} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Docteur Pierre GILLOIS – Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Docteur François SCHOONEMAN

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique)*)

Docteur Lina BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (*Immunologie*)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (*Génétique*)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

3^{ème} sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

4^{ème} sous-section : (*Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie*)

Docteur Patrick ROSSIGNOL

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Rhumatologie*)

Docteur Anne-Christine RAT

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

5^{ème} sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY
Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS
Madame Natalia DE ISLA – Monsieur Pierre TANKOSIC

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE
Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE
Madame Nadine MUSSE

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale
Professeur associé Alain AUBREGE
Docteur Francis RAPHAEL
Docteur Jean-Marc BOIVIN
Docteur Jean-Louis ADAM
Docteur Elisabeth STEYER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY - Professeur Michel BOULANGE
Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean FLOQUET - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ
Professeur Simone GILGENKRANTZ – Professeur Henri LAMBERT - Professeur Alain LARCAN
Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS – - Professeur Guy PETIET
Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL
Professeur Jacques ROLAND - - Professeur Michel STRICKER - Professeur Gilbert THIBAUT
Professeur Paul VERT - Professeur Michel VIDAILHET

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume Uni)

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)*

Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

REMERCIEMENTS

A notre maître et président de thèse,

Monsieur le Professeur T. Lecompte

Professeur d'hématologie

J'ai été honorée d'apprendre l'hématologie biologique à vos côtés et impressionnée par l'étendue de vos connaissances médicales et biologiques, ainsi que par la rigueur de votre réflexion intellectuelle et scientifique.

J'ai admiré votre esprit critique et votre pertinence.

Je vous remercie pour la qualité de votre enseignement et votre confiance en m'ayant accueillie dans votre service.

Que ce travail témoigne de mon profond respect.

A notre maître et juge,

Monsieur le Professeur P. Jonveaux,
Professeur de génétique

Vous m’avez fait l’honneur de juger cette thèse.

Vous avez accepté d’ouvrir les portes des connaissances en génétique à une « non-initiée » en décidant de me faire confiance.

C’est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges.

Soyez assuré de ma plus grande gratitude.

A notre maître et juge,

Monsieur le Professeur X. Troussard,
Professeur d'hématologie

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse.

Vous avez accepté de venir à ma soutenance malgré les nombreuses obligations, et de juger un travail portant sur le sujet dont vous êtes un des plus grands experts.

C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges.

Soyez assuré de ma plus grande gratitude.

A notre maître et juge,

Madame le Professeur M-C. Béné,
Professeur d'immunologie biologique

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse.

Je vous remercie de m'avoir facilité « la digestion » de certaines données qui pourraient sembler « indigestes » au simple commun des mortels.

J'ai été impressionnée par la rapidité et la pertinence de votre pensée.

..

Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A notre maître et juge,

Monsieur le Professeur A. Dalloul,
Professeur de biologie cellulaire (type mixte : biologique)

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse.

C'est pour moi un grand honneur de vous compter parmi mes juges.

Soyez assuré de ma plus grande gratitude.

A notre maître et juge,

Monsieur le Docteur H. Mossafa,
Docteur d'oncologie hématologique

Vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse.

Vous m'avez apporté votre aide, et grâce à vous les aspects complexes de la cytogénétique sont devenus bien plus clairs. J'ai été honorée de vous voir partager votre savoir avec moi, vous qui avez contribué à la découverte des anomalies génétiques du travail présenté.

Soyez assuré de ma plus grande gratitude.

A notre maître et directeur de thèse,

Monsieur le Docteur J-F. Lesesve
Docteur en hématologie biologique

Vous m'avez fait l'honneur de me confier ce travail et de me guider tout au long de sa réalisation.

Vous m'avez impressionné par vos connaissances et votre talent extraordinaire pour partager la cytologie hématologique.

Votre curiosité et votre intérêt scientifique pour les « mystères » des lymphocytes binucléés m'ont convaincue de participer à la découverte de cette entité et de tenter d'en comprendre les causes.

Recevez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A mes Maîtres d'Internat,

M. le Professeur A. LOZNIEWSKI

M. le Professeur J-L OLIVIER

M. le Professeur G. FAURE

Aux Praticiens Hospitaliers et aux assistants,

M. le Docteur M. DECARVAHLO : pour son aide et explications des analyses immunologiques

Mme le Docteur F. BRAUN qui a grandement participé au recrutement des patients et recueil des données

Mr le Docteur Jean DEVIGNES pour la partie expérimentale d'hémostase

Mme le Docteur MJ GREGOIRE

Mr le Professeur P. FEUGIER et l'équipe du CHU

L'ensemble des médecins référents pour nous avoir fourni les données des patients

Mme H. Jeulin, pour sa relecture de la partie « virologique »

Mme le Docteur I. AIMONE-GASTIN,

Mme le Docteur M. SANMARCO,

Mme le Docteur P. PERRIER, pour la relecture de la partie « HLA »

M. le Docteur Y. RIO,

Mme le Docteur J. DIDION pour cette bonne entente à la paillasse de bactériologie

Mme le Docteur V. LATGER-CANNARD,

Mme M-C. CONROY,

M. le Docteur S. SALIGNAC pour sa sympathie et sa proximité avec les internes

Mme le Docteur B. DOUSSET,

Mme le Docteur N. CONTET-AUDONNEAU,

M. le Docteur PUYHARDY pour son écoute, son humanité et sa bonté

M. le Docteur S. GIDENNE

Aux techniciens expérimentés qui « savent » ; et en particulier à Mme Chantal MAZZI, qui m'a grandement aidé pour des diverses analyses, et l'équipe de cytométrie en flux,

A ma Famille,

A mes parents sans qui rien ne serait possible, pour toute l'aide, soutien, amour et patience !

A mon frère qui m'a fait l'honneur de suivre mes traces dans les chemins tortueux de la médecine,

A ma petite sœur pour son esprit artistique, enfermé dans une tête de juriste,

A Babcia Jasia et Dziadek Zenek,

A Babcia Wanda, mes tantes Barbara et Wanda,

A Marek, Ewa et Jasio,

A ma tante Hania, et son époux,

Et à Alexandre...

A mes amis,

A Esther dite Microbe, qui se déplace avec son Macrobe, pour tout ce qu'on a vécu ensemble, et tout ce qu'on va encore vivre ! Rassure toi, ce n'est pas encore fini ; « on va y arriver » !

A Nico, à Jean-Do,

A Arnaud,

A Catherine et sa petite famille,

A Christophe et Ratka,

A Alice, à Matthieu et à tous mes co-internes,

A Mimi pour tout

A Vanina,

A Solenn et sa famille,

A Céline et Fabien,

A Joëlle,

A Pape Gillois,

A tous ceux que j'ai oublié !

A Maman, pour tout,

A Pierre pour Alexandre

SERMENT

"Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés. J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque".

<i>Liste des abréviations</i>	23
<i>Index des tableaux</i>	26
<i>Index des figures</i>	27
I. INTRODUCTION	28
I. Introduction.....	29
II. Rappels : lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPLB).....	29
II. ETUDE CLINIQUE	33
I.MATERIEL ET METHODE.....	34
1. Patients.....	34
2. Hémogramme.....	34
3. Immunophénotypage lymphocytaire.....	34
4. Evaluation de la prolifération des lymphocytes CD19+ après stimulation par les agonistes des TLR9.....	35
5. Hémostase.....	35
6. Etude génétique.....	36
a. Cytogénétique conventionnelle.....	36
b. Cytogénétique moléculaire (FISH).....	37
c. Biologie moléculaire.....	37
7. Phénotypage HLA (Human Leucocyte Antigen).....	37
II. RESULTATS.....	38
1. Patients.....	38
2. Antécédents Familiaux.....	38
a. Antécédents de maladies auto-immunes.....	38
b. Antécédents familiaux de maladies du sang.....	39
c. Antécédents familiaux d'autres maladies néoplasiques.....	39
3. Mode de vie et antécédents personnels.....	39
a. Tabac.....	39
b. Exposition aux toxiques.....	39
c. Alcool.....	39
d. Antécédents « psychiatriques ».....	39
e. Antécédents concernant des affections auto-immunes et rhumatologiques.....	40
f. Affections rhumatismales.....	40
g. Affections pneumologiques.....	41

h. Antécédents gynécologiques.....	41
4. Signes fonctionnels.....	41
5. Signes cliniques.....	42
6. Evolution.....	42
7. Explorations biologiques.....	42
a. Hémogramme.....	42
b. Cytométrie en flux	43
c. Myélogramme.....	48
d. Biopsie ostéo-médullaire.....	49
e. Examens d'hémostase.....	49
f. Analyses biochimiques.....	51
g. Explorations immunologiques.....	52
h. Sérologies virales.....	52
i. Etude cytogénétique.....	53
j. Cas particulier de la mère et de la fille.....	53
8. Groupe non-LPLB.....	54
a. Patients.....	54
b. Antécédents familiaux.....	54
c. Antécédents personnels.....	54
d. Explorations biologiques.....	55
III. DISCUSSION.....	59
1. Antécédents familiaux et personnels.....	60
a. Antécédents gynécologiques.....	60
b. Antécédents des problèmes auto-immuns.....	60
c. Diagnostic différentiel : la fibromyalgie.....	61
2. Contexte, épidémiologie.....	62
a. Ratio hommes/femmes.....	62
b. Evolution.....	63
c. Etiologie.....	63
3. Le tableau clinique.....	63
4. Les explorations biologiques.....	64
a. Lymphocytose et pourcentage de lymphocytes binucléés.....	64
b. Myélogramme et BOM.....	66

5. Fonction des lymphocytes B dans la LPLB.....	66
a. CMF.....	66
b. IgM.....	70
c. « Fonctions » des lymphocytes B mémoire.....	72
d. EBV.....	76
e. HLA-DR7.....	81
6. Examen cytogénétique.....	82
7. Cas familial.....	90
8. Comparaison avec le groupe où le diagnostic a été écarté.....	92
CONCLUSION.....	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	96
ANNEXES.....	107
1. Les antigènes de différenciation étudiés par cytométrie en flux.....	108
2. Répartition de différents profils CMF au sein de la cohorte.....	114
3. Les caryotypes des patients étudiés.....	116
4. Letter to the Editor : IgM interference in determination of antiphospholipid antibodies and erythrocyte sedimentation rate in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes.....	117

LISTE DES ABREVIATIONS

a β 2GPI : anticorps anti-bêta-2-glycoprotéine I
aCC : anticorps anticoagulants circulants
ACD : acide citrique, dextrose
aCL : anticorps anti-cardiolipide
ADN : acide desoxyribonucléique
AID : activation induced deaminase
ANA : anticorps anti-nucléaires
aPE : anticorps anti-phosphatidyléthanolamine
Bcl-2 : B-cell lymphoma protein 2
Bcr : B-cell receptor
BOM : biopsie ostéo-médulaire
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive
CD : classes/clusters/antigènes de différenciation
CFSE : carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMF : cytométrie en flux
CMN : cellules mononucléées
CMV: cytomégalo virus
DO : densité optique
EBNA : antigènes nucléaires d'EBV
EBV : virus d'Epstein Barr
EDTA : l'acide éthylènediamine tétraacétique
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EPS : électrophorèse des protéines sériques
ET : écart type
FCS : fausse couche spontanée
FICTION : fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics
FISH : hybridation *in situ* par fluorescence
FM : fibromyalgie
FR : facteur rhumatoïde
GFHC : Groupe Français d'Hématologie Cellulaire
Hb : hémoglobine
HIV : virus de l'immunodéficience humaine

HLA : human leucocyte antigen
HSV : herpès simplex virus
ICAM : intercellular adhesion molecule
Ig : immunoglobuline
IGH : gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines
JAK 2 : protéine Janus kinase 2
LDH : lactate-déshydrogénases
LF : lymphome folliculaire
LLC : leucémie lymphoïde chronique
LMH : lymphome malin non Hodgkinien
LMP : latent membrane protein
LPLB : lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés
LZM : lymphome de la zone marginale
MAI : maladies auto-immunes
MALT : lymphome T associé aux muqueuses
MBR : major breakpoint region
MFI : mean fluorescence intensity
MGUS : gammapathie monoclonale d'origine indéterminée
PA : nombre des paquets/années
PCC : condensation prématurée des chromosomes
PCR : polymerase chain reaction
PHA : phytohémagglutinine
PR : polyarthrite rhumatoïde
SAPL : syndrome des antiphospholipides
SEP : sclérose en plaques
SLP-B : syndrome lymphoprolifératif chronique de type B
SM : splénomégalie
SVNN : sérum du veau nouveau-né
TCA : temps de Céphaline + activateur
TE : thrombocytémie essentielle
TLR : toll-like receptor
TNF : tumor necrosis factor
TRAF : TNF receptor-associated factor
VHA : virus de l'hépatite A

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VR : valeurs de référence

VS : vitesse de sédimentation

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I. Étude des moyennes de l'expression des antigènes de différenciation des lymphocytes B de la population étudiée

Tableau II. L'analyse des intensités de fluorescence (mean fluorescence intensity, MFI) des IgM et D : la répartition dans la population LPLB

Tableau III : Valeurs de la DO pour les blancs patients LPLB comparées aux valeurs des DO

Tableau IV : Récapitulatif du bilan inflammatoire de la patiente avec la VS élevée

Tableau V : Récapitulatif des résultats dans le cas particulier de la mère et fille LPLB

Tableau VI : Les profils CMF des 10 patients avec le diagnostic de LPLB écarté

Tableau VII : Expression des immunoglobulines de surface IgM et IgD sur les lymphocytes CD 19+ de blancs patients pour tous les patients confondus dans la recherche des aCL

Tableau VIII : Comparaison de l'incidence des antigènes HLA les plus fréquents dans notre cohorte à leur incidence dans la région lorraine.

Tableau IX : Proportions des patients LPLB selon le sexe dans la littérature

Tableau X : Comparaison de l'incidence des phénotypes les plus fréquents dans notre cohorte à leur incidence dans la région lorraine

Tableau XI : Récapitulatif des différents phénotypes CMF observés dans notre cohorte

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Morphologie lymphocytaire dans la LPLB

Figure 2. Caryotype partiel montrant l'isochromosome 3

Figure 3. Répartition des cellules CD45/19+ : le nuage des points en bleu clair sur les « scattergrammes » représentant les cellules TLR9+

Figure 4. Résultats de la stimulation des lymphocytes B par les agonistes du TLR 9 (ODN) et un mitogène (PHA) chez le contrôle non LPLB

Figure 5. Résultats de la stimulation des lymphocytes B par les agonistes du TLR 9 (ODN) et un mitogène (PHA) chez un patient LPLB

Figure 6. Caryotype (patiente 21) montrant un isochromosome +i(3q)

Figure 7. Caryotype montrant le phénomène de condensation prématurée des chromosomes (PCC)

Figure 8. Immunohistochimie : marquage des chaînes kappa et lambda : pas de restriction des chaînes par rapport à la morphologie binucléée

Figure 9 : FISH : Immunohistochimie (chaînes kappa et lambda) avec FISH (sondes télomériques du chromosome 3)

Figure 10. Hybridation in situ (FISH) avec les sondes télomériques du chromosome 3

I. Introduction

La lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPBL) est une entité connue depuis plus de 20 ans. La bibliographie (environ 75 articles ou lettres) permet de recenser plus d'une centaine de malades, dont les descriptions clinico-biologiques sont assez proches. La LPLB est donc présentée comme une anomalie rare. Cependant cette notion est contredite par le nombre des patient(e)s* exploré(e)s en Lorraine. Nous avons donc souhaité décrire une cohorte de 33 patients et comparer nos données à celles mentionnées dans la littérature. Par ailleurs, nous avons également tenté de préciser le profil des lymphocytes impliqués dans la LPLB et approfondir des anomalies potentielles de l'hémostase. Ce travail est la synthèse d'une étude débutée depuis environ 6 ans. Pour information, la cohorte inclus actuellement 40 patients et une dizaine d'autres en cours d'exploration. Quelques remarques additionnelles ont d'ailleurs été ajoutées en police de taille minorée.

** dans un but de simplification, nous utiliserons désormais « patients » pour les hommes et les femmes*

II. Rappels : la lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés

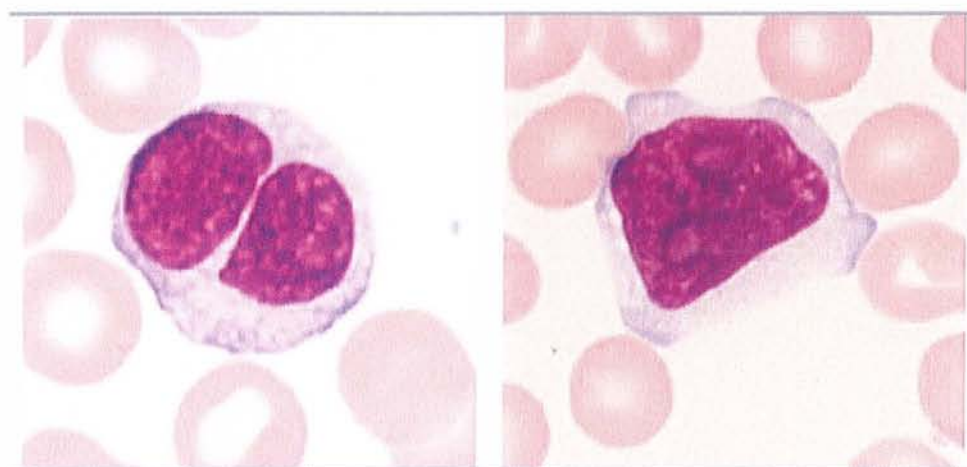
Une lymphocytose absolue ($\geq 4 \times 10^9/L$) et durable (≥ 3 mois) chez l'adulte impose des explorations dans le but d'identifier une lymphocytose monoclonale, en particulier un syndrome lymphoprolifératif chronique de type B (SLP-B). Le plus souvent, il s'agira d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC), ou d'une phase leucémique d'un lymphome malin non Hodgkinien (LNH) : folliculaire, du manteau, de la zone marginale... dont les prises en charge thérapeutiques sont spécifiques. L'analyse attentive de la morphologie des cellules lymphoïdes à partir du frottis sanguin permettra d'avoir une orientation, dès que possible confirmée par un phénotypage immunologique au moyen d'une technique de cytométrie en flux (CMF). En dehors des SLP, une lymphocytose peut être observée après un traumatisme, une intervention chirurgicale, ou toute autre source de stress. Cependant elle restera transitoire (quelques heures ou jours) et, surtout, polyclonale. Elle peut être également la conséquence d'une infection virale (cytomégalovirus, virus d'Epstein-Barr...) mais le contexte et l'aspect cytologique sont, en principe, évidents et la confusion n'est guère possible (« syndrome mononucléosique »). Dans ces derniers cas, l'augmentation de la population T est prédominante. Une lymphocytose durable, développée à partir de la sous-population B et polyclonale est plus rare. Elle a été décrite lors des hyposplénismes (Wilkinson et al,

1983[75]), de la maladie de Gaucher (Marti et al, 1988[47]), de la polyarthrite rhumatoïde (Berthelot et al, 1996[2]) et de la maladie de Hodgkin dans sa forme à prédominance lymphocytaire (Troussard et al, 2002)[69]). Nous avons également constaté cette anomalie dans une série de malades atteints de sclérose en plaque et traités par Natalizumab (Tysabri® ; un anticorps monoclonal humanisé qui vise à empêcher l'entrée de lymphocytes activés dans le SNC)(étude en cours JFL et M Debouverie).

La LPLB a été décrite pour la première fois en 1982 par Gordon et al[21]. Elle est rencontrée principalement chez les femmes, jeunes, fumeuses. La lymphocytose est considérée comme absolue ($\geq 4 \times 10^9/L$), durable (≥ 3 mois), et polyclonale (Gordon 1982[21], Carstairs 1985[6], Casassus 1987[7], premiers cas décrits, respectivement 3, 4 et 1 patientes). L'examen du frottis sanguin montre dans tous les cas la présence de lymphocytes binucléés en un pourcentage variable, mais minoritaires par rapport à celui des lymphocytes « non binucléés ». Le tableau clinique a été corroboré lors des publications ultérieures et semble sans particularités notables : une splénomégalie modérée serait présente dans environ la moitié des cas, il n'existe pas d'hépatomégalie, rarement on observe des adénopathies de taille inférieure à 2 centimètres. L'hémogramme indique une lymphocytose absolue, entre 4 et $10 \times 10^9/L$ le plus souvent. L'examen cytologique du frottis sanguin montre des cellules lymphoïdes dont les aspects morphologiques sont hétérogènes. Un pourcentage variable (1 à 10%) de lymphocytes à deux noyaux est détecté (Troussard et al, 2002[69]). Ces lymphocytes binucléés sont accompagnés par d'autres cellules lymphoïdes de taille variable présentant des noyaux à contours plus ou moins réguliers. La chromatine nucléaire est toujours condensée, avec un petit nucléole parfois visible. La présence de lymphocytes binucléés n'est pas observée chez les individus sains, et n'a été décrite qu'après une irradiation à basses doses (Roy-Taranger et al, 1965[59]). L'immunophénotypage montre que la lymphocytose est constituée de cellules B, exprimant les classes de différenciation (CD) CD19, CD20, et CD22. Le caractère polyclonal est affirmé par l'expression des chaînes légères kappa et lambda aussi bien dans les cellules binucléées que non binucléées (Troussard et al, 2009[66]). Elles co-expriment également les immunoglobulines de surface de type IgM et IgD, ainsi que le CD27 (Loembe et al, 2002[46]).

L'association de LPLB au phénotype HLA-DR7 semble forte. Si on ajoute à cela le fait que LPLB peut survenir chez des membres asymptomatiques d'une même famille, l'hypothèse d'une prédisposition pourrait être envisagée. La description de la LPLB chez des jumeaux identiques (Carr et al, 1997[5]) ainsi que sa présence chez un frère et une sœur (Himmelman

et al, 2001[29]) renforcent cette hypothèse, ainsi que la détection de multiples réarrangements BCL-2/IgH parmi les individus apparentés au premier degré avec les patients LPLB (Delage et al, 2001[12]). Par ailleurs des anomalies chromosomiques récurrentes ont été observées chez plus de 75% des patients : isochromosome +i(3)(q10) surnuméraire associé ou non à la présence d'un phénomène de condensation prématurée des chromosomes (PCC) et/ou une instabilité chromosomique (Mossafa 1996[49], Troussard 1997[68], Callet-Bauchu 1997[3]). La tétrasomie 3q est rarement rencontrée et a été décrite dans certains rhabdomyosarcomes, carcinomes pulmonaires ou prostatiques et lors du passage de l'hyperplasie au carcinome du col utérin. Elle a été également observée dans un cas de maladie de Waldenström et dans des rares cas de LLC (Amouroux et al 1997[1], Roussel et al, 2004[57], Wong et al, 2002[77]).



Cliché a

Cliché b

Figure 1. Morphologie lymphocytaire dans la LPLB : cliché a : lymphocyte binucléé ; cliché b : grande cellule lymphoïde à deux nucléoles



Figure 2. Caryotype partiel montrant l'isochromosome 3 (patiente 21)

La(les) cause(s) de la LPLB reste(nt) incertaine(s). Une association avec le tabagisme a été suggérée d'emblée par Carstairs et al, 1985[6], décrivant 4 patientes fumeuses, dont une a retrouvé une numération lymphocytaire normale après arrêt du tabac. Dans la série du GFHC, seulement une patiente n'a jamais fumé (Troussard et al, 2009[66]). Par contre, dans une série de 30 témoins fumeuses, il n'y a eu aucun cas de lymphocytes binucléés détecté (Troussard 2009[66]).

Le risque d'évolution de la LPLB vers une pathologie maligne est mal connu. Le suivi à long terme, rarement mentionné, montre que les patients restent stables cliniquement et biologiquement le plus souvent. (Cornet et al, 2008[9]). Parfois la lymphocytose et le pourcentage de +i(3)(q10) baissent progressivement suivant l'arrêt du tabac, mais ; là encore, le nombre des cas documentés est très faible. Certains patients développent une gammapathie monoclonale d'origine indéterminée (MGUS). L'émergence d'une subpopulation clonale reste possible, et, dans la série du GFHC (Cornet et al, 2008[9]) 3 patients sur 111 ont présenté une évolution vers un LNH : 2 lymphomes diffus à grandes cellules et 1 lymphome splénique de zone marginale.

I. MATERIEL ET METHODE

1. Patients

33 patients (29 femmes et 4 hommes) ont été étudiés entre les années 1994 et 2009. Le diagnostic de la LPLB a été posé devant une lymphocytose et/ou la présence de lymphocytes binucléés sur le frottis sanguin.

Les renseignements cliniques et les antécédents de chaque patient ont été obtenus soit par interrogatoire direct lors des consultations au CHU de Nancy, soit recherchés dans les dossiers médicaux (médecin référents, hôpitaux). Les analyses biologiques ont été principalement effectuées par les laboratoires du CHU de Nancy (sauf pour la cytogénétique envoyée au référent pour cette anomalie, le Dr Hossain Mossafa, laboratoire CERBA Pontoise).

2. L'hémogramme

L'hémogramme a été réalisé le plus souvent sur un appareil Bayer Siemens (Tarrytown, New York, NY, EU) (modèles Technicon H2, ADVIA 120 et 2120). La formule leucocytaire a été réalisée à partir d'un frottis sanguin pour chaque patient (coloration selon May-Grünwald-Giemsa). La présence de lymphocytes binucléés, le calcul de leur pourcentage, l'analyse des autres cellules lymphoïdes ont été précisés sur environ 500 lymphocytes le plus souvent.

3. Immunophénotypage lymphocytaire

Afin d'explorer la lymphocytose et confirmer le caractère polyclonal des lymphocytes, nos patients ont bénéficié d'un à plusieurs immunophénotypages lymphocytaires par CMF. Les différents antigènes de différenciation explorés sont décrits en «Annexe». La très grande majorité des analyses, et en tout cas toutes celles exploitées pour ce travail, ont été réalisées par un seul laboratoire avec les mêmes anticorps (hématologie biologique, CHU Nancy). Les cellules mononucléées du sang périphérique ont été séparées par centrifugation en gradient de densité, puis l'immunophénotypage a été réalisé par immunofluorescence directe et/ou indirecte suivant les anticorps et analysés sur appareils Facscalibur (Becton Dickinson, San Diego, EU).

Dans la mesure où certains patients ont bénéficié de plusieurs immunophénotypages (suivi), nous avons choisi de rapporter le plus complet puisque les profils sont stables.

4. Évaluation de la prolifération des lymphocytes CD19+ après stimulation par les agonistes des TLR9

Pour une partie de nos patients il a été réalisé un examen spécifique visant à étudier la prolifération des cellules CD45⁺/CD19⁺ en réponse à une stimulation par les agonistes du TLR9 (étude réalisée au laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, en particulier Professeur MC Béné et Docteur M Decarvahlo).

Le prélèvement a été réalisé à partir du sang veineux, dans un tube EDTA. La séparation des cellules mononucléées a été obtenue après la réalisation d'un gradient de densité de type « Ficoll ». Les cellules ont été mises dans un milieu de culture complet (RPMI : contenant du sérum de veau fœtal), et elles ont été incubées à 37°C dans une étuve humide avec 6% de CO₂, après marquage avec le fluorochrome carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Ce marqueur intracellulaire est utilisé pour étudier la prolifération cellulaire qui se caractérise par une diminution par deux de la fluorescence à chaque division cellulaire. Un témoin négatif était constitué par une incubation des cellules en milieu seul et un témoin positif était par une incubation des cellules en présence d'un mitogène (PHA : phytohémmagglutinine). Enfin, le puits faisant l'objet de l'étude contenait la même suspension cellulaire incubée en présence d'un agoniste de TLR9, le CpG ODN M362 (oligonucléotides contenant des séquences CpG de l'ADN bactérien, se fixant au TLR 9, InvivoGEN®, San Diego, California, EU). Les cellules mononucléées d'un témoin ont été étudiées dans les mêmes conditions. La mesure de l'intensité de fluorescence de la CFSE a été réalisée à J0, J1, J2, J4 afin d'observer la décroissance de la fluorescence intracellulaire, témoin de la prolifération parmi les cellules CD45⁺/CD19⁺. Pour ce faire, à chaque jour de lecture, un aliquote de chaque suspension cellulaire a été marqué à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents : CD45-APC, CD19-PC7 (Beckman Coulter, Miami, FL) et les cellules ont été étudiées en cytométrie de flux multiparamétrique.

5. Hémostase

Certains des examens suivants ont été réalisés :

- Temps de Céphaline + activateur (TCA)
- La recherche des anticorps aCL a été réalisée chez nos patients avec les techniques suivantes :
 - Recherche des anticoagulants circulants (aCC) : par test de coagulation TCA PTT-LA avec calcul d'indice de Rosner
 - Recherche des anticorps anti-cardiolipine (aCL) : (IgG et IgM) par ELISA

- Recherche des anticorps anti-bêta2GPI (aβ2GPI) : IgG et IgM par ELISA
- Recherche d'anticorps anti-phosphatidyléthanolamine (aPE) : IgG et IgM par ELISA (les deux derniers au laboratoire d'immunologie, hôpital de la Conception, Marseille)

Une dépolymérisation des IgM a été réalisée pour la recherche des anticorps anti-cardiolipine par ELISA, afin de vérifier l'hypothèse que l'interférence des IgM des patients LPLB lors des tests.

Les sérums congelés des patients ont été décongelés puis incubés pendant 24 heures à +4° avec du chlorhydrate de cystéine volume à volume.

Le surnageant a été prélevé et traité comme un sérum classique lors de la technique (dilution de 5μL du surnageant dans 500μL du PBS SVNN (sérum du veau nouveau-né dilué au 1/10^{ème}), incubation dans les plaques ELISA, incubation avec le conjugué d'anticorps de chèvre anti-IgM humaines/phosphatase alcaline (SIGMA A 3275), incubation avec le substrat de révélation (solution de p-nitrophénylphosphate disodique), lecture à l'aide du lecteur de plaque à 405 nm, comparaison avec les points de la gamme).

6. Etude génétique

a. Cytogénétique conventionnelle

- Le caryotype

L'étude des anomalies chromosomiques a été réalisée par un caryotype standard ainsi que par la technique d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH) métaphasique à la recherche d'un isochromosome surnuméraire +i(3)(q10) ou d'une trisomie 3.

Le caryotype conventionnel a été réalisé pour 29 patients sur 31 à partir d'un prélèvement sanguin. Deux cultures cellulaires (1.5-2x10⁶ cellules /ml) en co-stimulation des lymphocytes sanguins en présence de 2 mitogènes (LPS, Lipopolysaccharid from E.Coli 100mg/ml et TPA, Tétradecanoyl-o-phorbol 13 acetate 5ng/ml) ont été réalisées pour chaque patient. Après 72 et 96 heures de culture, les cellules ont été bloquées en métaphase par la colchicine, puis après un choc hypotonique elles ont été fixées par un mélange alcool-acide acétique. Le marquage chromosomique en bande RHG (heat-denatured Giemsa R-bands) a été réalisé.

50 à 100 mitoses ont été capturées par un logiciel analyseur d'images et toutes les mitoses anormales ont été caryotypées. Le degré de résolution d'un caryotype standard portant de 300

à 450 « bandes chromosomiques » par caryotype est de 5 à 10 millions de bases (Mb : mégabases).

b. Cytogénétique moléculaire (FISH)

Pour chaque patient 2 lames d'hybridation avec des sondes spécifiques du télomère du chromosome 3 et/ou locus Bcl-6 et alpha satellite du chromosome 3 ont été réalisées et pour chaque patient 100 mitoses et 200 cellules interphasiques ont été observées.

c. Biologie moléculaire

- Réarrangements Bcl-2

L'étude de l'expression des membres de la famille de Bcl-2 a été réalisée par PCR.

Le prélèvement a été réalisé à partir du sang périphérique, dans un tube EDTA ou hépariné. L'extraction d'ADN a été réalisée par un extracteur automatique (King FISHER). L'amplification de la région spécifique Bcl-2/IGH (produit de translocation t(14;18)) a été réalisée par le Thermocycleur 9600 (Applied BIOSYSTEMS). Le produit amplifié (si la translocation a bien eu lieu) a été déposé sur le gel avec BET (bromure d'éthidium) et soumis à migration.

- Réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines

L'identification d'une population clonale est importante pour le diagnostic de leucémies ou lymphomes à cellules B.

Les réarrangements des gènes des domaines variables des chaînes lourdes des Ig (VDJ) ont été étudiés par des techniques de biologie moléculaire. La méthode utilisée a été une amplification d'ADN par polymérase chain reaction (PCR), suivie d'une analyse de fragments. Le prélèvement a été effectué à partir du sang périphérique, dans le tube EDTA ou hépariné. La région VHJH a été amplifiée par PCR multiplex en utilisant les amorces FR3 et FR2 (Thermocycleur 9600, Applied BIOSYSTEMS) puis les fragments amplifiés ont été étudiés par l'analyse des fragments (séquenceur AVANT de Applied BIOSYSTEMS) (van Dongen et al, 2003).

7. Phénotypage HLA (Human Leucocyte Antigen)

Le but de ces explorations dans notre population était de rechercher un antigène HLA qui serait plus fréquent parmi les patients avec LPLB que dans la population générale (DR7), et de vérifier si les antigènes HLA déjà connus à risque des maladies auto-immunes étaient représentés dans la population étudiée.

Le prélèvement a été réalisé à partir de sang périphérique, dans un tube ACD (Acide Citrique, Dextrose), séparation par gradient de densité, préparation d'une suspension de cellules mononuclées (CMN) pour le typage HLA de classe I. d'une suspension de lymphocytes B pour la classe II. Le typage HLA a été effectué par la technique de lymphotoxicité dépendante du complément.

La séparation des lymphocytes B à partir des CMN a été réalisée par la technique des immunobilles (DYNAL), puis l'étude a été réalisée par dépôt dans les plaques multipuits et incubation avec des batteries d'anticorps monoclonaux (INGEN) et de complément. La lyse cellulaire (cytotoxicité) a été appréciée visuellement par un colorant (acridine orange / bromure d'éthidium).

II. RESULTATS

1. Patients

Nous avons étudié 33 patients présentant une LPLB. La découverte a été fortuite lors d'un bilan prescrit pour une affection concomitante bénigne, ou dans le cadre d'un examen de santé sans point d'appel. Nous avons également suivi un groupe de 10 patients chez qui le diagnostic de la LPLB avait été suspecté, mais finalement écarté.

Il s'agit d'une population presque exclusivement féminine, 29 femmes pour 4 hommes (soit 12% de l'effectif). La moyenne des âges de nos patients est de 45 ans (écart-type (ET) = 7 ans, valeurs extrêmes : 24 - 64 ans, médiane 45 ans). L'âge moyen au moment du diagnostic est de 39 ans (ET = 7 ans), et la durée moyenne de suivi de 6 ans (ET = 4 ans).

2. Antécédents Familiaux

a. Antécédents de maladies auto-immunes

Au moins 6 patients présentent des antécédents familiaux de maladies auto-immunes (MAI) (18%), et chez deux patients ces antécédents sont multiples (≥ 3) :

- 1 cas de psoriasis
- 2 cas de thyroïdite
- 2 cas de diabète
- 1 cas de polyarthrite rhumatoïde
- 1 cas de vascularite

- 1 cas de parathyroïdite
- 1 cas de lupus érythémateux disséminé

Chez 18% des patients, ces antécédents n'ont pas été (ou pu être) recherchés.

b. Antécédents familiaux de maladies du sang

En tout 4 patients (12%) :

- 2 cas de leucémie (absence de données précises)
- 1 cas de syndrome myélodysplasique (avec monosomie 7, chez le fils d'un patient, allogreffé à l'âge d'un an)
- 1 cas de thrombopénie néonatale (absence des données précises)
- 1 cas de LPLB

c. Antécédents familiaux d'autres maladies néoplasiques

4 patients sont concernés (12%) avec des cancers des os, du col utérin, du poumon, du testicule.

3. Mode de vie et antécédents personnels

a. Tabac

Tous les patients sont fumeurs. Presque tous (91%) sont à plus de 15 PA, avec la moyenne située à 23 PA (ET = 11 PA).

b. Exposition aux toxiques

Chez 2 patients, nous trouvons la notion d'exposition à des toxiques (6%). Il s'agit d'exposition professionnelle : solvants (Bugazid, Prodecap, Polyphen, Podecaplaste) et détergents industriels (DA 400B) pour un patient, trichloréthylène, acétone, plomb pour l'autre.

c. Alcool

27% de patients avouent une consommation « excessive » d'alcool, 45% n'en consomment pas ou peu.

d. Antécédents « psychiatriques »

Une partie de patients présente divers problèmes de nature « psychiatrique ». Ils vont de troubles de l'humeur jusqu'aux troubles de nature psychotique.

En tout 14 patients présentent des troubles psychiatriques documentés (soit 42%) :

- 10 patients se définissent comme dépressifs et/ou sont sous traitement par antidépresseurs (soit 30%)
- 5 patients présentent une anxiété excessive associée ou isolée (soit 15%)
- 1 patient souffre de la schizophrénie

e. Antécédents concernant des affections auto-immunes et rhumatologiques

15 patients (soit 45%) présentent un ou plusieurs problèmes de nature auto-immune.

Par ordre décroissant, nous trouvons :

- Problèmes thyroïdiens : 5 patients (15%) dont 3 thyroïdites auto-immunes et 3 goîtres thyroïdiens
- Psoriasis : 4 patients (12%)
- Syndrome de Raynaud : 4 patients (soit 12%)
- Lupus érythémateux disséminé : 1 patient
- Spondylarthrite ankylosante : 1 patient
- Uvéite : 1 patient
- Maladie de Behçet : 1 patient

f. Affections rhumatismales

Les patients se plaignent de douleurs musculaires ou articulaires diffuses, qui ont souvent été objet d'explorations rhumatologiques et radiologiques infructueuses (facteur rhumatoïde négatif, radiographies articulaires sans particularités).

23 patientes (soit 70%) rapportent souffrir de douleurs rhumatismales diverses :

- Arthralgies diffuses : 8 patients (24%)
- Cervicalgies : 6 patients (18%)
- Lombalgies : 3 patients (9%)
- Névralgie cervico-brachiale : 2 patients
- Sciatalgie : 1 patient
- Douleurs articulaires localisées (poignées, hanche, métacarpe, tarse...) : 2 patients
- Ostéomalacie : 1 patient
- Myalgies diffuses : 5 patients (15%)
- Crampes : 2 patients

8 patients associent au moins 3 des affections suscitées soit 24%, 4 patients ont 2 affections (12%), 11 patients une seule (33%).

g. Affections pneumologiques

Il agit d'une population fumeuse. Les anomalies sont donc attendues, même si une relation directe de cause à effet avec la LPLB reste à établir.

- BPCO : 9 patients (27%)
- Emphysème (centrolobulaire) : 3 patients (9%)
- Emphysème bulleux : 1 patiente
- Micronodules : 1 patiente
- Bronchectasies : 2 patients
- Asthme : 1 patiente
- Pneumothorax à répétition : 1 patiente
- Pachypleurite : 1 patiente

10 patients ne présentent aucune anomalie radiologique ou fonctionnelle (30%). 14 patients présentent au moins une des anomalies suscitées (42%). 2 patients présentent 3 des anomalies suscitées associées (6%), 1 patient présente 2 anomalies associées. Dans le cas de 8 patients, nous n'avons pas de données (24%).

h. Antécédents gynécologiques

Nous avons réussi à récolter ces informations pour 23 patientes sur 29.

- Parmi nos patientes il y a eu 16 fausses couches spontanées (FCS)
- 8 des patientes ont fait au moins une FCS (soit 27%) ; mais aucune trois ou plus. Ces FCS sont précoces.
- Nous notons 7 interruptions volontaires de grossesse, chez 4 patientes (14%)
- 21 patientes ont eu au moins un enfant
- 2 des nos patientes souffrent d'aménorrhée, une de dysménorrhée, une de fibromes utérins (hystérectomie), une d'un carcinome utérin, une des kystes ovariens

4. Signes fonctionnels

- Asthénie

C'est le signe fonctionnel le plus fréquent, perçu par les patients comme le plus invalidant dans la vie quotidienne. Elle est rapportée par 28 patients (85%), de manière spontanée.

Chez 4 patients, elle est associée à des sueurs nocturnes, chez une patiente à une altération progressive de l'état général. Chez 3 patients, la question n'a pas été explorée. Seulement 2 patients disent ne pas ressentir une fatigue excessive.

- Céphalées

10 patients (30%) en souffrent, éprouvant une gêne réelle dans leur vie quotidienne.

A noter, le tableau rencontré ressemble parfois à celui décrit au cours des fibromyalgie (FM) ou syndrome polyalgique idiopathique diffus. Ce point sera discuté ultérieurement.

5. Signes cliniques

- Splénomégalie : présentée par 5 patients d'emblée ou au cours du suivi (sur 30 chez qui les données cliniques étaient renseignées, soit 17%).
- Adénopathies : 1 patient a présenté un ganglion qui a disparu « spontanément » au cours de l'évolution.

6. Évolution

La lymphocytose de 24 patients reste stable au cours du suivi, 4 patients augmentent leur lymphocytose (modérée, jusqu'à $\times 2$). Pour 5 patients, le recul est insuffisant (≤ 3 ans).

Par ailleurs, 1 patiente n'a pas de lymphocytose absolue au cours du suivi, et 3 patients sont décédés (1 par cancer bronchique, 1 en post-opératoire d'une culotte aortique, 1 de cause inconnue).

7. Explorations biologiques

a. Hémogramme

- Leucocytes

(Valeurs de référence (VR) chez l'adulte : $4 \text{ à } 10 \times 10^9/\text{L}$).

La moyenne de numération leucocytaire chez nos patients est de $12,34 \times 10^9/\text{L}$ (ET = 2,73), avec valeurs extrêmes à 8,07 et $19,8 \times 10^9/\text{L}$. La numération leucocytaire de 29 patients (88%) est supérieure à $10 \times 10^9/\text{L}$.

- Lymphocytes

(VR : $1 \text{ à } 4 \times 10^9/\text{L}$).

Dans notre groupe, la moyenne de la numération lymphocytaire est $5,88 \times 10^9/L$ (ET = 1,45) avec les valeurs extrêmes de 2,47 et $9,36 \times 10^9/L$. 32 patients se situent au-dessus des VR (88%). 3 patients sur les 4 avec la numération leucocytaire dans les VR présentent néanmoins une lymphocytose absolue.

Le pourcentage de formes binucléées varie de 0,5 à 10%, avec une moyenne de 4% (ET = 2%)

- Hémoglobine (Hb)

(VR chez l'adulte : ≥ 13 g/dL pour les hommes et ≥ 12 g/dL pour les femmes).

La moyenne des valeurs de l'Hb est de 13,9 g/dL (ET = 1,11) avec des valeurs extrêmes de 12 à 17,8 g/dL.

Aucun patient ne présente d'anémie, un seul patient (de sexe masculin) présente une valeur supérieure aux valeurs usuelles : 17,8 g/dL. Son taux d'hémoglobine a été vérifié à plusieurs reprises et est resté > 15 g/dL durant son suivi.

- Plaquettes

(VR : 150 à $400 \times 10^9/L$).

La moyenne des numérations plaquettaires est $242,6 \times 10^9/L$ (ET = $85,6 \times 10^9/L$), les valeurs extrêmes sont 68 et $392 \times 10^9/L$. 31 patients se trouvent dans les VR (soit 94%). Deux patients présentent une thrombopénie respectivement à 68 et $86 \times 10^9/L$, les deux étant de sexe masculin.

b. Cytométrie en flux

31 (94%) patients ont bénéficié d'une à plusieurs explorations immunophénotypiques (pas de possibilité d'explorations des 2 personnes décédées).

Les résultats sont présentés dans le tableau récapitulatif. Il indique le pourcentage moyen d'expression de chaque antigène de différenciation, la médiane de ce pourcentage, l'écart-type, ainsi que le pourcentage le plus haut et le plus bas rencontré dans notre groupe, et son expression forte ou faible (si étudiée), et l'effectif chez qui cet antigène a été testé.

	CD19%	CD5%	CD10%	CD11c%	CD20%	CD21%	CD22%	CD23%	CD24%	CD25%	CD27%
%age moyen	50,4	9,2	0,1	17	47,4	65	49,5	15,9	47	0,1	44,2
Médiane	50	7	0	17,5	49	65	50,5	7	48	0	47
Ecart-type	16	10	0,4	15,8	14,9	35,3	16,6	19,1	18,7	0,4	19,5
Valeur supérieure	81	42	1	64	74	90	83	80	78	1	79
Valeur inférieure	14	0	0	0	13	40	12	0	14	0	13
Expression forte	-	-	-	-	28	-	0	-	-	-	-
Expression faible	-	-	-	-	0	-	30	-	-	-	-
Nombre patients	31	31	30	26	28	2	30	30	25	27	25

	CD38%	CD43%	CD79b%	FMC7%	CD95%	CD103%	kappa	lambda	CD30%	CD34%
%age moyen	2,3	0,6	49,2	46,5	0	2,9	25,1	20,6	0	0
Médiane	1,5	0	51	48	0	0	26,5	26,5	0	0
Ecart-type	2,9	0,8	16,9	17,4	0	10,7	9,9	11,4	0	0
Valeur supérieure	13	3	82	78	0	48	46	70	0	0
Valeur inférieure	0	0	17	15	0	0	6	5	0	0
Expression forte	-	-	27	25	-	-	-	-	-	-
Expression faible	-	-	3	5	-	-	-	-	-	-
Nombre patients	30	30	30	30	1	27	30	30	4	10

	CD40%	CD122%	CD138%	CD154%	CD19 CD21	Ig M (MFI)	IgD (MFI)
%age moyen	35,4	0	0	0	90	380	121
Médiane	37	0	0	0	90	317	54
Ecart-type	10,1	0	0	0	0	343	100
Valeur supérieure	54	0	0	0	90	1372	261
Valeur inférieure	22	0	0	0	90	36	47
Expression forte	-	-	-	-	-	-	-
Expression faible	-	-	-	-	-	-	-
Nombre patients	7	6	8	7	1	31	31

Tableau I. Etude des moyennes de l'expression des antigènes de différenciation des lymphocytes B de la population étudiée, leur expression faible ou forte, les valeurs extrêmes du pourcentage d'expression observées, ainsi que le nombre des patients chez qui le CD donné a été étudié.

- Le profil

Cette étude de la population lymphocytaire de nos patients montre, qu'il existe un profil particulier :

- Positivité : CD19+, CD20+ (expression forte), CD21+, CD22+/- (faible), CD24+, CD27+, CD79b+ (fort), FMC7+ (faible ou fort), CD40+, kappa+, lambda +, avec une expression augmentée des TLR 7, 9, 10.
- Négativité : CD5-, CD10-, CD11c-, CD23-, CD25-, CD30-, CD34-, CD38-, CD43-, CD95-, CD103-, CD122-, CD138-, CD154-.

Il agit donc de lymphocytes polyclonaux B matures, exprimant sur leur surface des antigènes pan-B, le CD27, correspondant probablement à des lymphocytes B mémoire.

4 patients ont exprimé le CD5+ de façon partielle, allant de 33 à 50% des cellules B anormales.

L'étude de l'incidence des profils rencontrés, chaque colonne correspondant à un profil avec l'effectif est présentée dans la partie « Annexe 1 »

- Ig M+D : intensité de fluorescence en Mean Fluorescence Intensity (MFI)

Les valeurs de MFI de l'intensité des IgM sont en moyenne 3,1 fois supérieure à celle des IgD et plutôt plus fortes que celles observées chez les témoins ou les malades atteints de LLC.

MFI	IgM	IgD
Moyenne	380	121
ET	317	54
Médiane	343	100
Max	1372	261
Min	36	47

Tableau II. L'analyse des intensités de fluorescence (mean fluorescence intensity, MFI) des IgM et D : la répartition dans la population LPLB.

- La recherche cytométrique des TLR 7, 9, 10

En étudiant les leucocytes (CD45) en fonction de leur granulation et structure en cytométrie en flux, nous nous sommes rendu compte, que chez nos patients LPLB le nuage des lymphocytes présentait une expansion vers le haut et la droite (lymphocytes de grandes tailles). Par ailleurs nous avons trouvé une correspondance entre le nombre de ces lymphocytes (par CMF) et le pourcentage de formes binucléées sur frottis par rapport à l'ensemble des lymphocytes. Il est donc possible que la population isolée par CMF corresponde aux lymphocytes binucléés. Enfin, sur l'histogramme de répartition des cellules

TLR+, il existe une sous-population de cellules avec expression des TLR renforcée, et cette population est la même que celle correspondant à l'expansion du nuage des lymphocytes. On peut supposer que les lymphocytes binucléés expriment les TLR (de manière renforcée).

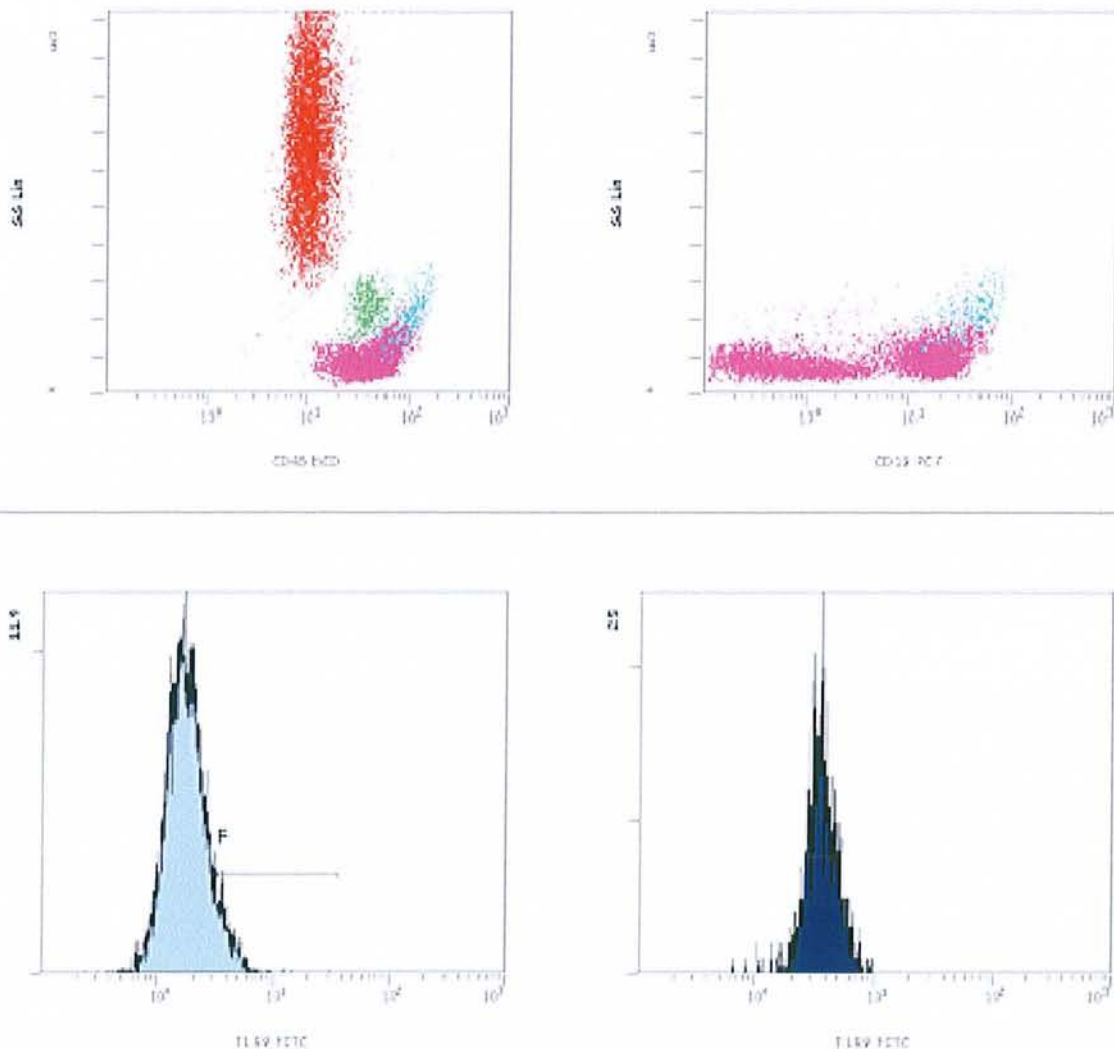


Figure 3. Répartition des cellules CD45/19+ : le nuage des points en bleu clair sur les « scattergrammes » représente les cellules TLR9+ (laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine).

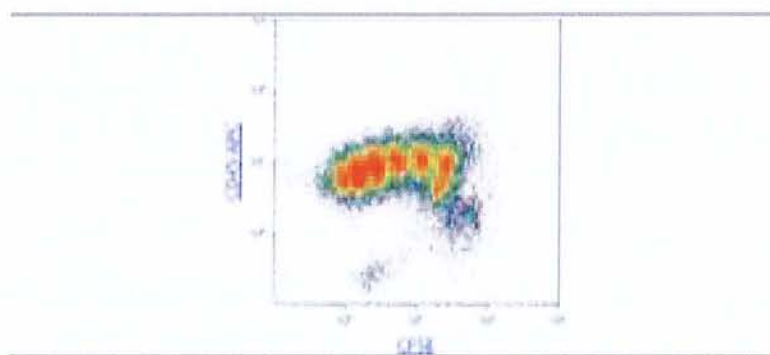
- Évaluation de la prolifération des lymphocytes CD19+ après stimulation par les agonistes des TLR9

L'ensemble des lymphocytes, CD19 ou non, des patients et du témoin a proliféré en présence de PHA, un peu mieux pour les cellules CD19 des patients.

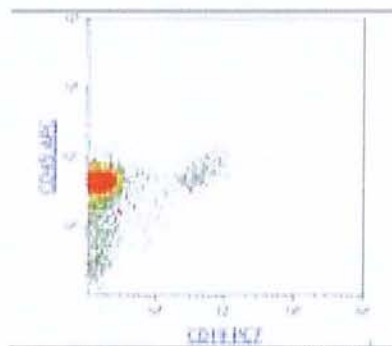
En présence d'ODN, les lymphocytes CD19+ du témoin n'ont pas montré de prolifération, alors que les lymphocytes CD19+ des patients LPLB présentaient une prolifération nette, de plus en plus marquée au cours de la durée de stimulation.

Une analyse plus fine des « scattergrammes » de CMF montre que la population de cellules B la plus proliférante présente la plus forte expression de CD45 et un signal de side scatter plus important, comme la population par ailleurs identifiée comme exprimant majoritairement TLR9 chez ces sujets.

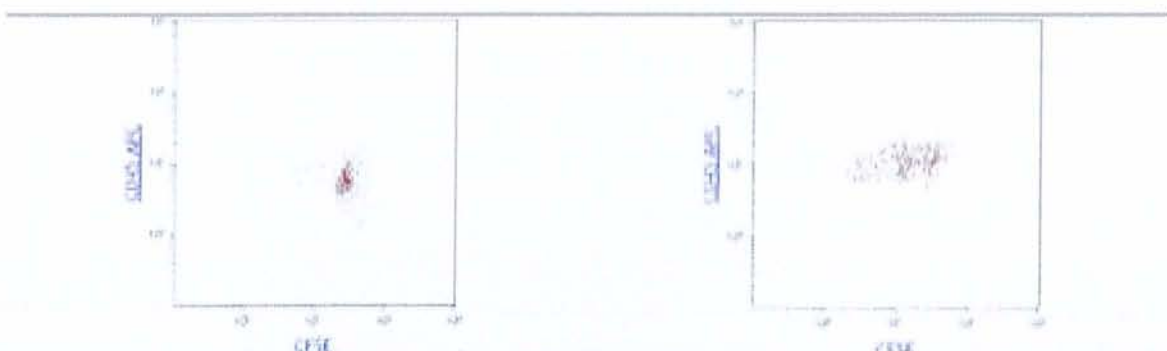
Résultats chez le contrôle :



CFSE : Prolifération de tous les lymphocytes avec la PHA



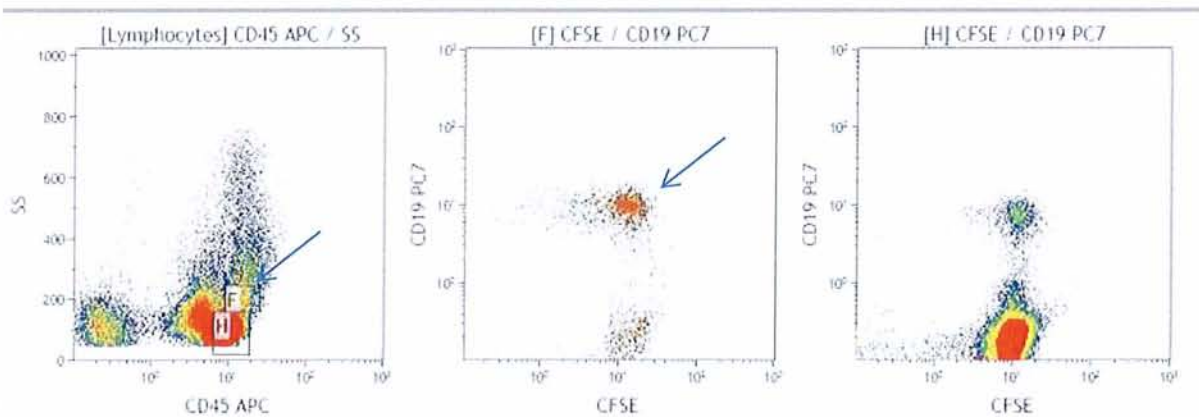
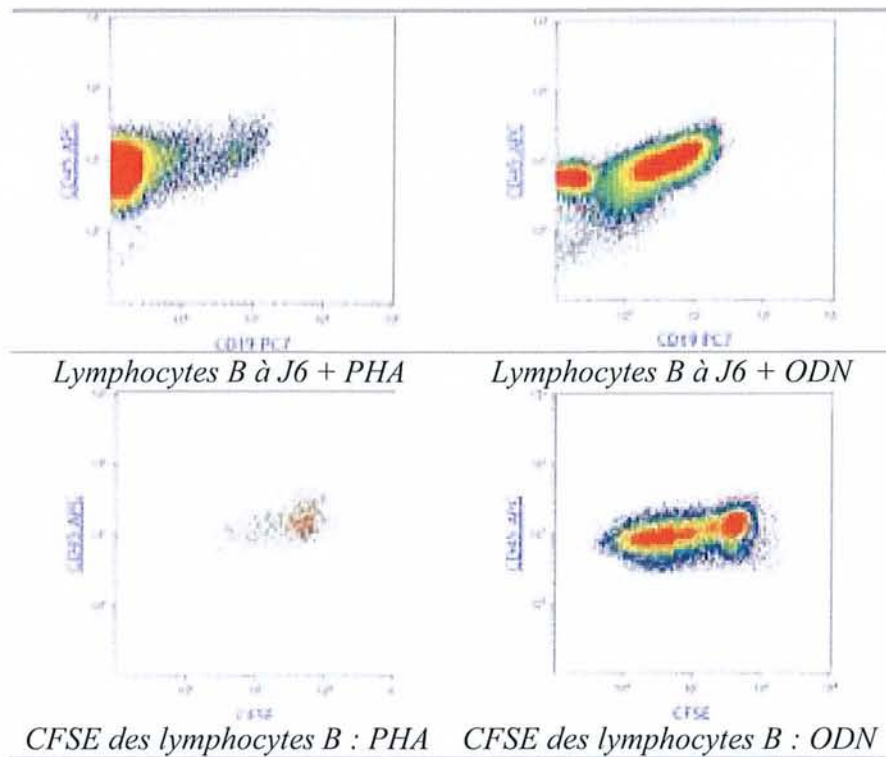
Lymphocytes B à J4 d'ODN



CFSE des lymphocytes B contrôle : PHA CFSE des lymphocytes B contrôle : ODN

Figure 4. Résultats de la stimulation des lymphocytes B par les agonistes du TLR 9 (ODN) et un mitogène (PHA) chez le contrôle non LPLB

Résultats chez le patient LPLB :



Les lymphocytes B qui prolifèrent le plus en réponse aux ODN sont ceux qui sont $CD45^{bright}/SSC^{high}$

Figure 5. Résultats de la stimulation des lymphocytes B par les agonistes du TLR 9 (ODN) et un mitogène (PHA) chez un patient LPLB (laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine).

c. Myélogramme

Cet examen a été réalisé chez 11 patients (33%), afin d'écarter une pathologie plus agressive. La moyenne de l'infiltration lymphocytaire était 25% des cellules médullaires, avec la

présence chez 10 patients de lymphocytes binucléés dont la quantification allait de rares (chez 6 patients) jusqu'à 6% des cellules lymphoïdes.

d. Biopsie ostéo-médullaire

Une BOM a été réalisée chez 7 patients parmi les 11 patients qui ont bénéficié d'un myélogramme. Une infiltration est observée dans les 7 cas. Le type est interstitiel (5 patients), et/ou intra-sinusoïdal (5 patients) avec dans 1 cas présence d'un nodule interstitiel.

e. Examens de l'hémostase

Résultats pour 24 patients :

- TCA: sans particularité chez 21 patients et augmenté chez 3 patients.
- aCC : test réalisé chez 17 patients, positif (avec l'indice de Rosner > 16) dans 2 cas, et négative (Rosner < 15) dans les 15 cas restants
- aCL : test réalisé chez 20 patients, négatif chez 7 patients, positif en IgM et IgG chez 1 patient (qui a eu le TCK allongé, mais les tests aCC et a β 2GPI négatifs), positif en IgM chez 12 patients.
- a β 2GPI : test réalisé chez 18 patients, négatif chez 15 patients, positif en IgM chez 3 patients (tous avec aCL IgM et aPE IgM positifs sans allongement de TCK, 2 avec aCC positifs et 1 avec aCC négatif)
- aPE : test réalisé chez 16 patients, positif en IgM chez 12 patients, douteux chez 1 patient et négatif chez 3 patients. Dans 2 cas de positivité seulement les aCC étaient positifs. Chez 9 patients, on retrouvait simultanément les aCL(IgM) et aPE(IgM).
- 1 seule patiente a présenté tous ces tests positifs (mais avec un TCA non allongé) et 1 patiente a présenté tous ces tests positifs excepté a β 2GPI et TCA qui étaient sans particularités.

Le profil le plus fréquent parmi les patients explorés était le suivant : TCA, aCC, a β 2GPI sans particularité, aCL et aPE positifs en IgM, et était présenté par 7 patients (41% des 17 patients qui ont bénéficié de l'ensemble des explorations suscitées) (cf manuscrit en annexe).

Chez aucun patient, nous avons retrouvé des critères nécessaires pour poser le diagnostic du syndrome des anti-phospholipides (SAPL) (critères de Sapporo) ; les manifestations restent uniquement biologiques.

- IgM augmentée dans la recherche des anticorps anti-cardiolipine

Les IgM pour les aCL sont positifs chez 12 sur 20 de nos patients. Lors de l'analyse des résultats certains faits ont attiré notre attention :

- la plupart des résultats des aCL positifs ne l'étaient que pour les IgM, les IgG également recherchées restant en dessous du seuil de positivité chez les patients LPLB ;
- aucun de patients LPLB ne présente de syndrome des anticorps anti-phospholipides clinique ;
- après l'observation des densités optiques de la plaque ELISA de cette analyse, nous avons remarqué, que les « blancs-patient » étaient plus élevés chez les patients porteurs de la LPLB que dans la population non-LPLB, peu importe le résultat final du test ;
- après le traitement des sérums de nos patients par le chlorhydrate de cystéine (réactif utilisé pour la dépolymérisation des IgM), et réalisation du même test ELISA à la recherche des aCL, tous les « blancs-patients » sont revenus comparables à ceux des patients non-LPLB en densité optique.

Voici les résultats après l'analyse de plusieurs tests ELISA aCL des patients avec LPLB comparés à tous les patients testés (toute pathologie confondue). Nous montrons les moyennes des densités optiques (DO) pour les puits témoins négatifs pour chaque patient, dont les antigènes cardiolipidiques étaient absents.

Ainsi nous pouvons constater, que dans la série des patients LPLB la moyenne des DO des puits témoins est multipliée par un facteur 1,55 par rapport à la moyenne de tous les blancs-patients confondus.

Ces calculs ont été effectués pour sur un groupe de 11 personnes.

	DO des « blancs-LPLB »	DO des « blancs-patients »
Moyenne	0,14	0,09
Écart-type	0,03	0,01
Médiane	0,14	0,09

Tableau III : valeurs de la DO pour les blancs patients LPLB comparées aux valeurs des DO de blancs patients pour tous les patients confondus dans la recherche des aCL

f. Analyses biochimiques

- Électrophorèse des protéines sériques

Cette analyse a été réalisée chez 32 patients. Chez 20 patients, la fraction des γ -globulines était répartie de manière polyclonale (69%), chez 10 patients nous observons une restriction d'homogénéité dont 8 en IgM et 2 en IgG.

- Dosage pondéral des IgM

Les VR varient en fonction du sexe et de l'âge : pour une femme, 20 à 44 ans : 0,71 à 2,09 g/L, 45 à 59 ans : 0,64 à 1,99 g/L ; et pour un homme, 20 à 44 ans : 0,54 à 1,60 g/L, 45 à 59 ans : 0,56 à 1,63 g/L

Le dosage a été effectué chez 31 patients. La moyenne est de 6,7 g/L avec ET = 3,6 g/L, la médiane de 6 g/L et les valeurs extrêmes 1,1 et 14,2 g/L. 29 patients étaient au-dessus des VR (93%).

Remarque :

9 patientes sur 18 ont présenté une vitesse de sédimentation (VS) à la première heure augmentée à plusieurs reprises (VR <15mm).

A titre d'exemple, une patiente avec VS comprise entre 71 et 98mm a bénéficié des explorations suivantes, ne montrant pas de syndrome inflammatoire :

	Valeur	Val. de référence
CRP	8.28mg/L	Inf à 5
Haptoglobine	1,39 g/L	0,3-2
Orosomucoïde	1,27 g/L	0,5-1,20
Fer	0,45 mg/L	0,5-1,70
Ferritine	23,5 μ g/L	11-306,8
Fibrinogène	4 g/L	2 à 4

Tableau IV : récapitulatif du bilan inflammatoire de la patiente avec la VS élevée.

Le dosage de la β 2 microglobuline a été également effectué : 1,42 mg/L (VR < 1.50)

Etant donné l'absence de perturbations des autres paramètres du bilan inflammatoire, l'hypothèse est la suivante : VS augmentée non inflammatoire, due à une interférence des Ig M plasmatiques qui accélèrent la sédimentation des érythrocytes.

- Dosage des lactate-déshydrogénases (LDH)

Les VR pour les LDH totales sont : 190-390 UI/L.

Les LDH ont été dosées chez 27 patients. La moyenne est 312 UI/L, ET = 132 UI/L, la médiane 321 UI/L, les valeurs extrêmes 99 et 545 UI/L. 8 patients ont présenté une valeur supérieure à 390 UI/L (30% de la population dosée).

g. Explorations immunologiques

- Réarrangement Bcl2

Cet examen a été réalisé chez 18 patients. Un réarrangement de Bcl-2 a été constaté chez 5 patients (28% des patients testés).

- Réarrangement des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGH).

La recherche de réarrangements IGH a été réalisée chez 9 patients, tous ont montré une polyclonalité sans restriction.

- Phénotypage HLA (Human Leucocyte Antigen)

Cette analyse a été réalisée chez 31 patients. L'antigène HLA le plus fréquemment observé dans cette population est HLA-DR7. Il est présent chez 17 patients : 55% des patients testés.

Il est connu pour être associé au psoriasis.

Par ailleurs nous avons observé les antigènes HLA suivants :

- Chez 2 patients HLA-B27 (associé risque de spondylarthrite ankylosante, du syndrome de Reiter et de l'uvéite antérieure)
- Chez 8 patients HLA-A1 (associé au risque du déficit en IgA)
- Chez 3 patients HLA-A3 (associé au risque d'hémochromatose idiopathique)
- Chez 3 patients HLA-DR3 (associé au risque du lupus systémique, du syndrome de Gougerot-Sjögren, de maladie coeliaque)

- Recherche d'auto-anticorps anti-nucléaires (ANA) et des facteurs rhumatoïdes (FR)

Les ANA ont été cherchés chez 14 patients, dont 8 ont été positifs (57%). Les FR ont été cherchés chez 6 patients dont 1 a été positif. Les anticorps antithyroïdiens dosés chez 3 patientes se sont avérés positifs dans les 3 cas.

h. Sérologies virales

Virus d'Epstein-Barr (EBV) : 29 patients positifs (97%) sur 30 testés. 1 patient présente des IgM persistantes.

(L'étude de l'expression du CD21, récepteur à EBV, effectuée postérieurement à ce travail indique des résultats constamment positifs)

Cytomégalo virus (CMV) : 11 patients positifs (38%) sur 29 testés.

Herpès simplex virus 1 et 2 (HSV) : 21 patients positifs (81%) sur 26 testés. Dans 3 cas, la sérologie s'est positivée durant le suivi.

Virus de l'hépatite A (VHA) : 8 patients positifs (32%) sur 25 testés. Dans 2 cas, la sérologie s'est positivée durant le suivi.

Virus de l'hépatite B (VHB) : 3 patients positifs (11%) sur 26 testés.

Virus de l'hépatite C (VHC) : 1 patient positif (3%) sur 29 testés.

Virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ½ : Les 27 patients testés sont séronégatifs.

Charge virale EBV : demandée chez un patient, elle était détectable, mais non augmentée (confirmé chez 3 autres patients –et une « négative »- non inclus dans ce travail).

i. Etude cytogénétique

Le caryotype conventionnel a été réalisé chez 29 patients et complété par une étude FISH chez 23.

Un caryotype anormal (présence d'anomalie clonale) est observé chez 17 patients / 29 (59%). L'isochromosome +i(3)(q10) surnuméraire est observée chez 14 patients / 23 analysés par caryotype et FISH et est noté sur 4% de mitoses en moyenne (ET 5%, médiane 2%, valeurs minimale-maximale 0-21%).

Une trisomie du chromosome 3 est observée chez 12 patients. Chez les patients concernés, cette anomalie est observée sur 4% des mitoses (ET 5%, médiane 3%, valeurs minimale-maximale 0-21%). Jamais la trisomie 3 n'est associée à la présence de +i(3)(q10) dans la même cellule. Les deux anomalies sont observées chez 11 patients.

Une instabilité chromosomique est observée pour 20 patients / 29 (69%).

Une PCC est observée chez 6 patients. Le pourcentage moyen de cellules où une PCC a été observée est de 3% (allant de 1 à 4%). Chez 6 patients (29%) aucune anomalie n'a été observée. 4 patients n'ont pas été explorés.

Des anomalies additionnelles ont été notées chez 18 patients. Les caryotypes complets figurent dans l'annexe 3, tableau XI.

j. Cas particulier de famille comprenant mère et fille atteintes (patientes 21 et 22)

Voici le tableau récapitulatif des paramètres clinico-biologiques des deux patientes.

	Age	PA	Hb	GB	Ly	% ly bi	IgM	LDH
mère	58	>20	12,9	19,8	9,3	5	9,6	538
filles	24	4	13,1	12,4	5,8	5	2,6	408
	%CD19	%CD27	Cytogénétique		Bcl2/IGH		Splénomégalie	
mère	66	62	Trisomie 3		oui		oui	
filles	63	63	i(3)q(10) : 2%		non		non	

Tableau V : Récapitulatif des résultats dans le cas particulier de la mère et fille LPLB

8. Groupe non-LPLB

a. Patients

Nous avons constaté la présence de lymphocytes binucléés, souvent en petit nombre, chez d'autres patients. Nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'une LPLB et les avons explorés comme tels. Le diagnostic ayant été finalement rejeté, ce groupe a été étudié afin d'identifier les particularités qui le différencient des patients « LPLB ».

Il s'agit d'un groupe de 10 personnes : 9 femmes, 1 homme.

Moyenne d'âges : 47 ans, avec âges extrêmes à 63 et 31 ans, médiane à 49,5 ans.

La durée du suivi est de 3,4 ans en moyenne.

b. Antécédents familiaux

1 patient avec drépanocytose chez le père, 1 patient avec PR chez un frère

c. Antécédents personnels

(recueillis chez 9 patients)

• Tabac

Tous les patients sont fumeurs : 2 patients sont à plus de 5 PA, 5 à plus de 20 PA, 2 à plus de 50 PA

• Alcool

1 patient sur 8 interrogés consomme de l'alcool de façon excessive

• Antécédents psychiatriques

1 patiente : troubles anxio-dépressifs (sous traitement antidépresseur)

1 patiente : troubles anxieux

- Auto-immunité

- 2 patients ont subi une thyroïdectomie (adénome pré-toxique, nodules)
- 1 patient : goitre thyroïdien
- 1 patient : sclérose en plaques (SEP) évolutive (DR3), il s'agit du seul homme du groupe

- Hématologie

- 1 patient : maladie de Willebrand
- 1 patient : diagnostic final = lymphome de la zone marginale

- Neurologie

- 1 patient : épilepsie

- Douleurs rhumatismales

2 patients : douleurs articulaires

1 patient : crampes

1 patient : lumbago

- Affections « pneumologiques »

3 patients : BPCO

1 patient : emphysème bilatéral

- Antécédents gynécologiques

1 patiente : cystadénome fibreux de l'ovaire

- Asthénie

6 patientes

- Céphalées

3 patients s'en plaignent :

1 dans le cadre de la SEP, 1 à type de migraines chez une patiente avec antécédent de la dengue

d. Explorations biologiques

- Hémogramme et numération plaquettaire

Hémoglobine, plaquettes : tous les patients sont dans les valeurs de référence, sauf une (patiente 5) qui avait 462 G/L de plaquettes.

Leucocytes : 6 patients ont une leucocytose allant de $10,21$ à $28,5 \times 10^9/L$.

Lymphocytes : 8 patients ont une lymphocytose absolue, les valeurs allant de $4,1$ à $20,52 \times 10^9/L$ (pour la patiente 1).

Chez tous les patients, des lymphocytes binucléés sont observés sur le frottis sanguin. Le pourcentage varie de <1% à 5% (chez la patiente 1, et ce chiffre reste une observation isolée).

- Hémostase

Chez 5 patients, une recherche des anticorps antiphospholipides a été réalisée :
aCC, aCL, aβ2GPI, aPE ont été négatives chez tous ces patients.

- La cytométrie en flux

Voici les profils phénotypiques des 10 patients.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Lympho (G/L)	20,52	5,46	5,34	3,53	6,28	4,9	6,49	3,92	4,36	4,1
CD19	+	18%	+	+	15%	+	+	14%	16%	12%
CD5	-	-	ND	-	-	-	-	-	ND	ND
CD10	-	-	ND	-	-	-	-	-	ND	ND
CD11c	-	-	ND	-	10%	ND	-	-	ND	ND
CD20	+	16%	ND	+	13,5%	+	+	12%	ND	ND
CD22	+	18%	ND	+	14%	+	+	14%	ND	ND
CD23	+	14%	ND	+	8%	+	-	-	ND	ND
CD24	+	17%	ND	+	14%	ND	+	10%	ND	ND
CD25	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	ND
CD27	+	-	ND	-	7%	ND	-	-	ND	ND
CD38	+ ?	13%	ND	+	13%	+	-	10%	ND	ND
CD43	-	-	ND	-	-	-	-	-	ND	ND
CD79b	+	13%	ND	+	13%	+	+	13%	ND	ND
FMC7	+	15%	ND	+	13%	-	+	14%	ND	ND
CD95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD103	-	-	ND	-	-	ND	-	-	ND	ND
kappa	53	8	15	16	8	15	19	8	10	6
lambda	2	7	8	12	4	9	19	3	6	4
CD30	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
CD34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD122	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
CD138	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD154	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TLR 7,9,10	ND	ND	ND	ND	4%	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau VI : Les profils CMF des 10 patients avec le diagnostic de LPLB écarté

- Ig M+D : intensité de fluorescence (mean fluorescence intensity, MFI) réalisée chez 6 patients

MFI	IgM	IgD
Moyenne	96	152
ET	77	57
Médiane	61	150
Max	214	236
Min	23	81

Tableau VII : expression des immunoglobulines de surface IgM et IgD sur les lymphocytes CD 19+

- Myélogramme et BOM

Réalisés chez 2 patientes

1 patiente : infiltration lymphocytaire 30%, LZM

1 patiente : les deux examens sans particularité (thrombocyémie essentielle TE)

- Cytogénétique conventionnelle et FISH

Les deux ont été réalisés chez 6 patients.

Caryotype uniquement : chez 2 patients.

Chez la patiente 1, le caryotype a montré une trisomie 3 (lymphome de la zone marginale).

Chez la patiente 5 la mutation JAK 2 a été trouvée et le diagnostic de TE porté (nous avons remarqué au cours de son suivi une augmentation des plaquettes qui a été explorée).

Chez tous les autres patients explorés on a pas retrouvé ni de trisomie 3 ni de i(3)q(10).

- Bcl-2 réarrangements

Absence chez 3 patients testés.

- IgH réarrangements

Absence chez 2 patients testés.

- Typage HLA

1 patiente : HLA-DR7, c'est la patiente 3, lymphocytose B et T chronique mal expliquée.

1 patient (4), (A1, A30; B18, B27; DR3; DQ2) souffrant de la SEP et ne présentant pas d'antigène HLA-DR15 connu pour être associé à la SEP.

- IgM pondérales

4 patients présentent les valeurs des IgM augmentées. Ces valeurs varient de 2,14 à 3,23 g/L chez la patiente avec LZM. Chez les 3 autres patientes l'augmentation reste minime.

Dans tous les cas sauf 2 (LZM et antécédents de la dengue) l'électrophorèse des protéines sériques a montré un aspect polyclonal des gammaglobulines. La patiente 1, avec LZM a

présenté une IgM lambda, et la patiente 2 (antécédents de dengue), une IgG kappa oligoclonale.

- Sérologies virales

Tous les patients sont EBV +, 3 CMV+, 6HSV+, 3VHA+, 1VHB+.

Tous les patients sont VHC et HIV négatifs.

- Auto-immunité

ANA sont positifs chez un patient : patient 4 (SEP) et douteux chez une patiente : patiente 5 (TE).

Nous venons de présenter les données clinico-biologiques d'une série de 33 patients atteints de LPBL. Il s'agit possiblement de la plus grande série connue de LPBL ayant été explorée de manière homogène (mêmes laboratoires, mêmes techniques).

Nous reprendrons nos données en les discutant point par point. Une discussion plus générale sur les fonctions des lymphocytes impliqués sera par ailleurs proposée.

1. Antécédents familiaux et personnels

a. Antécédents gynécologiques

Dans le but d'étudier un éventuel SAPL, nous avons porté une attention particulière aux grossesses et autres antécédents gynécologiques. Aucun élément concordant n'est apparu. L'association LPLB et présence d'anticorps $\alpha\beta 2\text{GPI}$ et aPE (Granel et al, 2002[23]) est discutée dans le manuscrit figurant en annexe 4.

b. Antécédents de problèmes auto-immuns

Dans notre cohorte de 33 personnes, nous avons observé la présence d'antécédents familiaux (18%) et personnels (45%) de maladies auto-immunes, de fatigue excessive (85%). 70% de patientes souffrent des douleurs musculaires et/ou articulaires diverses. 12% présentent le syndrome de Raynaud, alors que la prévalence dans l'ensemble de la population est estimée à 5 à 6 % (même si ce syndrome semble plus fréquent chez les femmes). 14% souffrent de psoriasis (tous avec l'antigène HLA-DR7). Ce dernier résultat concorde avec le fait, que l'antigène HLA-DR7 est connu pour être associé au psoriasis. Rodriguez et al, 1996[55], décrit un cas où la LPLB était associée au psoriasis. La patiente se plaignait également d'une asthénie marquée, mais cependant elle ne présentait pas d'antigène HLA-DR7 ! De Haan et al, 2006[10], rapportent un cas où la patiente associait les douleurs d'extrémités, asthénie, et douleurs lombaires en plus de la LPLB.

Granel et al, 2001[23], décrivent 3 cas de LPLB avec des IgM anti $\beta 2\text{GPI}$ dont deux sont associés à une fibromyalgie. Hafraoui et al, 2008[25] citent également une patiente LPBL avec clinique évocatrice de FM : antécédent d'angioedème héréditaire, plusieurs épisodes d'infiltration cutanée lymphocytaire (maladie de Jessner et Kanof : forme particulière de lupus érythémateux cutané) ainsi qu'une asthénie chronique et douleurs diffuses évoquant le diagnostic de FM.

Il semblerait donc, qu'à chaque cas décrit, on retrouve une notion de fatigue, douleurs articulaires, même jusqu'à évoquer le tableau de la FM et très souvent une notion de maladie

auto-immune (MAI) accompagnant. On pourrait tenter d'expliquer le bouquet de signes fonctionnels parmi nos patients de manière suivante : il s'agit souvent d'une population assez jeune, essentiellement féminine. La susceptibilité spécifiquement féminine à développer les MAI est connue. Donc les populations de la LPLB et des MAI pourraient correspondre. De plus, comme il s'agit d'une population jeune, la justification de l'hémogramme doit être établie (comme nous avons remarqué lors de l'observation de notre groupe, la lymphocytose était découverte de manière fortuite pour la plupart des cas, et cela, pour des affections qui n'avaient pas de lien direct avec la LPLB). Ces affections intercurrentes, le plus fréquemment rencontrées dans la population féminine, pourraient provoquer la découverte de la LPLB. Ainsi, des LPLB non associées à des problèmes plus « bruyants » resteraient asymptomatiques. Cette hypothèse laisse supposer, que la prévalence de la LPLB resterait sous-estimée.

c. Diagnostic différentiel : la fibromyalgie (Häuser et al, 2009[26], EL Maghraoui, 2003[14])

Les signes fonctionnels décrits par les patientes de notre cohorte constituent un tableau proche de celui décrit lors de FM. Dans notre série, 85% des patientes sont asthéniques, 70% présentent des algies diverses (céphalées, douleurs musculaires ou articulaires), 42% des troubles psychiques. La question de la FM comme diagnostic différentiel a été soulevée. La FM est un syndrome rhumatismal caractérisé par un état douloureux musculaire diffus, évoluant de façon chronique, associé à une fatigue, un dérouillage matinal, des troubles du sommeil et de l'humeur, la présence de points douloureux caractéristiques à la palpation et divers autres symptômes. Il s'agit d'une affection fréquente mais encore largement méconnue. On retrouve cette maladie partout dans le monde. La prévalence est autour de 2% de la population générale. Elle représente actuellement le 3^{ème} « rhumatisme » pris en charge par les rhumatologues. Elle touche la femme dans 80-90% des cas, le plus souvent entre 30 et 60 ans. Elle est plus fréquente dans les milieux défavorisés et de faible niveau d'instruction. Le tableau typique est représenté par une femme de la cinquantaine consultant pour des douleurs diffuses évoluant depuis des années. Le diagnostic est difficile et repose uniquement sur la clinique. Ce n'est pas un diagnostic d'élimination, la FM peut coexister avec d'autres pathologies. La fatigue est un élément majeur du diagnostic, il s'agit souvent d'un état de fatigabilité anormal, pour des tâches physiques et/ou mentales banales. Les troubles de l'humeur sont fréquents. On trouve des antécédents de dépression dans 50 % à 70 % des cas

de FM. En revanche, seulement de 18 % à 36 % des patients souffrent à la fois de FM et de dépression.

Nous pouvons donc observer certaines similitudes entre la FM et la LPLB, au niveau de signes fonctionnels tels que l'asthénie, les céphalées, les états dépressifs, les douleurs diffuses à type rhumatismal, sans arguments en faveur d'une pathologie destructive ou auto-immune documentée. Il serait peut-être utile de vérifier/réaliser l'hémogramme chez des patients chez qui le diagnostic de la FM ayant été évoqué, ne peut être retenu, afin de ne pas ignorer une LPLB. Il ne faut toutefois pas oublier, que la FM peut co-exister avec d'autres pathologies.

2. Contexte, épidémiologie

o. fréquence

Une évaluation (menée en dehors de ce travail) a permis de revoir près de 200 frottis provenant de femmes âgées de 20 à 50 ans avec lymphocytose isolée. Dans 17 cas, des lymphocytes binucléés ont été observés, 7 s'avérant être d'authentiques LPLB). Ceci laisse supposer que la fréquence de la LPLB est effectivement sous-estimée.

a. Ratio hommes/femmes

Notre série de 33 patients est composée de 29 femmes et 4 hommes. Les données de la littérature sont présentées dans le tableau VIII.

Série/ auteurs	Femmes	Hommes
« Nancy »	29	4
Giudice et al, 2009 ^[11]	4	1
Cornet et al, 2008 ^[9]	91	20
Himmelmman et al, 2001 ^[29]	4	1
Schmidt-Hieber et al, 2008 ^[61]	24	1
Callet-Bauchu et al, 1997 ^[4]	0	3

Tableau VIII : Proportions des patients LPLB selon le sexe dans la littérature (non exhaustive).

En résumé, le sexe ratio femme/homme est d'environ 4,7 femmes pour un homme, soit environ 10 à 20% d'hommes.

b. Évolution

Selon Roussel et al, 2004[57], avec un recul de plus de 20 ans, il semble que la pathologie soit bénigne et qu'il ne faille pas la traiter. Cependant elle doit être surveillée, puisqu'on observe de rares cas des patients développant des lymphomes ou des cancers autres, sans que l'association avec LPLB soit rigoureusement prouvée (même si suspectée pour les LNH).

Schmidt-Hieber et al, 2008[61] rapportent dans leur série de 25 patients, un cas de lymphome lymphoplasmocytaire. Callet-Bauchu et al, 1997[4] présentent trois cas, dont un souffrait de lymphome non Hodgkinien de type MALT gastrique.

Dans notre cohorte suivie en moyenne pendant 6 ans (ET=4 ans), une patiente a augmenté ses lymphocytes avec altérations morphologiques, mais tout est revenu à l'état préalable en 2 ans et sans traitement, et une a développé un cancer bronchique fatal.

c. Étiologie

Tabac ? Possible, tous nos patients fument, ce qui est le cas dans pratiquement toutes les séries décrites. Chez certains patients, la lymphocytose a tendance à régresser après l'arrêt du tabac (Carstairs et al, 1985[6], Rodriguez et al, 1996[55], confirmé chez 2 patientes série du GFHC), mais les anomalies chromosomiques persistent.

3. Le tableau clinique

Splénomégalie (SM)

Dans notre série, 17% des patients ont présenté une SM, au diagnostic ou au cours de l'évolution, ce qui est moindre qu'attendu d'après la littérature. Selon Roussel et al, 2004[57], la SM est présente dans environ la moitié des cas, toujours modérée et isolée. Schmidt-Hieber et al, 2008[61] ont 57% des patients avec SM. Feugier et al, 2004[18] rapportent 62% de SM. Cependant, Troussard et al, 2004[67], rapportent une fréquence de 16% de SM. Ces différences avec nos données pourraient correspondre à un biais de sélection ?

Dans la série de Giudice et al, 2009[11], 5 patients (4 femmes, 1 homme) ont présenté une SM soit au diagnostic, soit lors du suivi. 4 sur 4 testés étaient HLA-DR7. Devant une augmentation de la SM observée chez tous les patients, 3 patients ont subi une splénectomie. L'examen histologique ressemblait à celui du lymphome de la zone marginale avec une hyperplasie de la zone marginale d'origine folliculaire ; la taille des cellules variant de petite à moyenne, les mêmes éléments lymphoïdes étaient présents dans les sinus spléniques et la pulpe rouge. Cet infiltrat splénique était CD27, IgM, IgD, bcl-2 positif et CD3, CD10, CD31

négatif, même profil que les cellules retrouvées dans le sang et la moelle de nos patients. Chez deux sur trois patients splénectomisés, on a observé une régression de la lymphocytose grâce à la réduction des cellules B circulantes, 10 et 6 mois suivant la splénectomie, ce qui est en faveur de l'origine splénique de la population circulante dans la LPLB. Le troisième patient splénectomisé présentait une lymphocytose après 15 mois de suivi post-splénectomie.

Par ailleurs, les cellules CD27+, IgM+, IgD+ sont connues pour être d'origine extrafolliculaire, de la zone marginale de la rate (Jacquot et al, 2006[30]). Ainsi les lymphocytes provenant de la rate pourraient s'y accumuler d'autant plus facilement. Comme seulement une partie de patients présente une SM, les anomalies des molécules d'adhésion pourraient être un caractère acquis (explorations partielles réalisées, à reprendre), résultant d'une survie prolongée de ces cellules (défaut d'apoptose) et des problèmes dans la réparation d'ADN (des mécanismes induits par le génome viral ?) et qui surviendraient chez les patients présentant une SM. Dans cette hypothèse, la capacité d'acquisition de « défauts de fonctionnement » pourrait être un facteur prédisposant à l'évolution vers diverses pathologies malignes. La question est pourquoi le passage à la pathologie maligne est si rare parmi ces patients, alors que les diverses anomalies présentées, communes d'ailleurs à la LPLB et aux pathologies malignes (réarrangement bcl-2/IgH, trisomie 3...) sont si fréquentes. L'hypothèse serait qu'on pourrait supposer que les anomalies chromosomiques, ou des réarrangements génomiques sont dans la LPLB une conséquence d'un processus méconnu (EBV ?). D'autres arguments allant dans ce sens sont que tous les patients avec LPLB ne présentent pas les mêmes anomalies, exprimées au même degré. Ainsi la SM pourrait être une conséquence de défaut des molécules d'adhésion, et faire partie d'événements possibles au cours de la LPLB.

Par ailleurs, Tangye et al, 2009[65], rapportent que chez un individu normal, la proportion des cellules B dans le sang périphérique et la rate est respectivement de 25 et 50%. De plus, la proportion des cellules CD27+ (mémoire) dans le sang et dans la rate est respectivement de 25% (sang) et 50% (rate) de l'ensemble des cellules B. Comme ces proportions sont perturbées dans au cours des LPLB, on peut supposer que le tropisme des lymphocytes pour la rate est dérégulé, en faveur d'un problème d'expression des molécules d'adhésion.

4. Les explorations biologiques

a. Lymphocytose et pourcentage de lymphocytes binucléés

La moyenne de la numération lymphocytaire dans notre série est de $5,9 \times 10^9/L$. Parmi nos patients, 2 ont cependant les valeurs comprises dans les VR : 2,9 et $2,5 \times 10^9/L$.

Dans la littérature, le chiffre des lymphocytes anormalement élevé fait partie bien entendu des critères amenant à la reconnaissance des LPLB. Cependant, comme le rapportent Himmelmann et al, 2001[29], dans la famille d'une patiente avec LPLB, on a retrouvé un frère sans lymphocytose mais qui présentait une LPLB mal étiquetée, persistante durant 12 ans, puis disparue 3 ans après l'arrêt du tabac. Ce patient avait une SM, des IgM élevés, et des lymphocytes binucléés au frottis sanguin. Vignes et al, 2000[72], décrivent le cas d'une patiente qui présentait également une LPLB avec numération lymphocytaire dans les VR. De plus, il avait été constaté que la lymphocytose apparaissait et disparaissait en fonction de la diminution de la consommation tabagique.

Dans notre série, la patiente « 2 » avec $2,9 \times 10^9/L$ de lymphocytes dont 5% binucléés, est HLA-DR7, présente l'anomalie +i(3)(q10), ses IgM sont à 10,5g/L et son profil cytométrique indique la majorité de cellules B, CD27+, IgM+, IgD+ (60% des lymphocytes totaux). Elle a été suivie dans notre service depuis 6 ans et jamais elle n'a présenté de lymphocytose en valeur absolue. La patiente « 11 », avec $2,5 \times 10^9/L$ de lymphocytes, dont 1% de binucléés, ne présente pas de phénotype HLA-DR7, la seule anomalie cytologique est la trisomie 3, le taux d'IgM se trouve dans les VR et son profil cytométrique montre 14% de CD19+, 9%CD27+, IgM+, IgD+. Elle est suivie dans notre service depuis 2 ans. Son diagnostic pourrait être remis en question.

Ces deux cas de notre série montrent, de manière attendue, que le diagnostic de LPLB peut être porté chez des patients qui ne présentent pas de lymphocytose absolue.

Le pourcentage de formes binucléées varie de 1 à 10% chez nos patients, avec une moyenne de 4% (ET = 2%). Nous nous sommes posé la question d'un seuil permettant d'affirmer une LPLB. En effet, une des patientes présente moins de 1% de cellules binucléées, ce qui signifie, sur une formule faite « rapidement » il serait possible de passer à côté du diagnostic. C'est une forme morphologiquement discrète, mais qui présente par ailleurs toutes les autres caractéristiques orientant vers la LPBL, et donc qui au final nécessite une surveillance.

Nous serions donc tentés de dire qu'il suffit de se trouver en présence de cette morphologie particulière de lymphocyte pour déclencher les investigations afin d'affirmer ou d'infirmer la LPLB, sans attendre l'apparition d'une hyperlymphocytose. Cependant, les patients récusés ou restant « douteux » avaient aussi des lymphocytes binucléés, mais le plus souvent $\leq 1\%$. Pour ces formes peu évidentes cytologiquement, il semble donc prudent de compléter les explorations avant de porter le diagnostic de LPBL sur la simple cytologie. Dans notre série tous les diagnostics incontestables ont $\geq 2\%$ de formes binucléées parmi leurs lymphocytes. La révision des 200 frottis (17 observations de lymphocytes binucléés mais seulement 7 cas authentiques) confirme l'impression

que la LPLB se manifeste par un pourcentage substantiel de cellules binucléées, au moins 1 à 2 % des lymphocytes, souvent plus (3-5%).

b. Myélogramme et BOM

Une minorité de patients (les plus anciens) ont bénéficié d'une exploration médullaire. Celle-ci a indiqué une infiltration constante, bien visible en histologie, et retrouvée plus difficilement en cytologie (elle aurait possiblement été manquée en l'absence d'orientation diagnostique, car les cellules binucléées médullaires sont rares). L'étude des BOM montre une infiltration interstitielle et intra-sinusoïdale. Ces images évoquent les caractéristiques du lymphome de la zone marginale (Feugier et al, 2003[18]). Cette infiltration intravasculaire particulière peut suggérer une anomalie de la migration leucocytaire. Les molécules ICAM-1 (CD54) et LFA-1 régulent les interactions avec le stroma cellulaire et avec les autres cellules, importantes pour la migration leucocytaire et leur retour dans les ganglions (homing). Dans l'étude citée, les molécules d'adhésion comme CD62, CD11c, CD29, CD49d et CD31 (PECAM-1 : platelet endothelial cell adhesion molecule) présentent une expression altérée. Une migration altérée pourrait être responsable de l'accumulation lymphocytaire dans la moelle osseuse et le sang périphérique, avec une incapacité de retour dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces résultats mériteraient d'être complétés, et voir la corrélation éventuelle entre leur expression et la présence de la SM.

5. Fonction des lymphocytes B dans la LPLB

a. CMF

- Profil immunologique des lymphocytes B dans la LPLB

Les cellules ont un profil particulier et très reproductible pour l'ensemble des patients, et qui, de plus, est stable au cours du temps pour chaque individu, ce qui permet presque d'en faire une « signature diagnostique ». Typiquement :

- CD19+, CD20+ (expression forte), CD21+, CD22+/- (faible), CD24+, CD27+, CD79b fort+, FMC7+(forte ou faible), CD40+, kappa+, lambda +, avec une expression de TLR 7, 9, 10 augmentée ;
- CD5-, CD10-, CD11c-, CD23-, CD25-, CD30-, CD34-, CD38-, CD43-, CD95-, CD103, CD122-, CD138-, CD154-.

Cependant 4 patients présentent une expression partielle et faible de CD5 allant de 30 à 50% des cellules CD19+. Dans la littérature, le CD5 n'est pas retrouvé chez les patients LPLB,

excepté dans la série de Schmidt-Hieber et al, 2008[61]. Ces derniers résultats nous semblent néanmoins contestables.

- Ig M+D de surface : intensité de fluorescence MFI

Chez les patients non LPBL, l'intensité des IgM reste faible (4/5 <150), les IgD sont fortement exprimées (4/5 >150). L'expression des IgD est toujours plus forte que celle des IgM (5/5).

Chez les patients avec LPLB, l'intensité des IgM est souvent élevée (20/31 >150), les IgD sont souvent faiblement exprimées (22/29 <150). L'expression des IgD est souvent plus faible que celle des IgM (23/29).

Ainsi, la population LPBL est plutôt du type IgM^{high} IgD^{low}. Par ailleurs, l'intensité d'expression des IgM+D pourrait être un argument supplémentaire de diagnostic différentiel, même s'il reste mineur, partiel et non reproductible. En effet la répartition attendue des sous-populations B sanguines montre de lymphocytes B naïfs IgM^{low} IgD^{high} CD27-, des cellules B CD27+ IgM-IgD- (cellule B mémoire post centre germinatif ayant commuté leur classe d'Ig) et des cellules B CD27+ IgM^{high} IgD^{low} type zone marginale (Weller et al, 2004[74]) auxquelles correspondraient nos cellules.

- CD40

CD40 est le récepteur responsable de la stimulation des lymphocytes B mémoire.

Suivant la stimulation antigénique les lymphocytes B répondent par la prolifération et forment les centres germinatifs en interagissant avec les lymphocytes T activés, par le contact direct de cellule à cellule ou par des facteurs solubles (Fecteau et al, 2003[16]). Cette réponse nécessite une stimulation de CD40 exprimé par les lymphocytes B par son ligand, CD154, exprimé par les lymphocytes T activés. CD40 est un membre de la famille des tumour necrosis factor (TNF) qui inclut entre autres CD95 (Fas), CD30, CD27... Comme tel, il est impliqué dans le développement des lymphocytes et la régulation de la réponse immune. La liaison de CD40 au CD154 induit la trimérisation du CD40, déclenchant une cascade de signalisation qui mène à la maturation de lymphocyte B antigène dépendante. L'importance de la stimulation du CD40 est bien illustrée chez les patients souffrant du déficit immunitaire avec hyper IgM lié à l'X, dans lequel la mutation du CD154 bloque l'interaction CD40-CD154. Dans ce cas, l'activation des lymphocytes B et la production des Ig sont dissociés, et il en résulte une réponse immune non fonctionnelle aux antigènes T-dépendants.

Au cours de la LPLB, selon Roussel et al, 2004[57], une inhibition de la prolifération a été observée après stimulation par le CD40, sans impliquer son récepteur CD154. Ils ont aussi

montré que les cellules étaient résistantes à la stimulation de Fas en dépit d'une expression élevée de son ligand (Fas-L) et qu'une réponse apoptotique anormale était observée après le traitement par l'étoposide. En conséquence, il existe une anomalie de la voie CD40-CD40L malgré l'expression de CD40 par les lymphocytes binucléés, ce que confirment nos résultats. Cette anomalie reste à approfondir.

- CD27

Au cours de la LPLB, les cellules sont CD27+. Ce CD est retrouvé sur 90% des cellules B CD19+, alors que dans la population générale, 10% environ des lymphocytes B sont CD27+. Comme indiqué précédemment, le CD27 est le marqueur des cellules B « mémoire », alors que les lymphocytes CD27- sont dits « naïfs ». Dans le sang, les cellules B CD27+ mémoire sécrètent des IgG et IgA, alors que les cellules B CD27- sécrètent plutôt les IgM. Ceci contraste avec nos cellules qui sont clairement Ig M+D positives le plus souvent. Fecteau et al, 2003[16], rapportent une étude où les cellules CD27+ mémoire et les cellules CD27-naïves sont stimulées par la liaison CD40-CD154 *in vitro*, avec examen de la réponse des cellules B mémoire et cellules B naïves périphériques selon la durée de l'interaction. La prolifération et la différenciation de deux sous-ensembles stimulés par le CD154 et IL-4 durant une période courte (4-5 jours) et une période longue (>7jours) sont évaluées. Après une stimulation courte, les cellules B mémoire ne présentent pas d'expansion, mais sont les seules à se différencier en cellules IgG et M sécrétantes. Une stimulation prolongée de cette population mène à une mort cellulaire. Dans la population de cellules B naïves, la stimulation prolongée provoque leur prolifération, expansion et différenciation en cellules sécrétrices des IgM et IgG. Cette stimulation prolongée de CD40 déclenche également dans les cellules B naïves le switch en cellules IgG-sécrétantes et une expression de CD27 en absence d'hypermutations somatiques, ce qui suggérerait que ces deux événements pourraient être indépendants. Cette étude montre que les cellules B naïves et les cellules mémoire ont des exigences distinctes pour engager une réponse immunitaire, reflétant leurs différents rôles dans l'immunité humorale.

On peut les comparer avec les cellules LPBL qui sont CD27+, mais s'accumulent et sécrètent les IgM de manière démesurée. La stimulation prolongée attribuée à un virus (EBV ?) ou la consommation du tabac deviendrait alors responsable de l'émergence des clones CD27+ qui ne fabriqueraient que des Ig de faible affinité, et qui s'accumuleraient. Ce ne seraient alors ni des cellules naïves, ni des cellules B mémoire mais un stade intermédiaire ?

Le fait que les lymphocytes B soient capables d'exprimer CD27 sans avoir rencontré l'antigène est curieux mais admis. Si on supposait que les lymphocytes LPLB sont des

lymphocytes de l'immunité innée qui n'ont jamais rencontré d'antigène, mais qui ont subi les hypermutations somatiques « pré-programmées », et qu'ils circulent dans le sang directement en provenance de la moelle, l'acquisition de CD27, signe du contact avec antigène irait à l'encontre de cette hypothèse. Le fait que le CD27 puisse être acquis après une stimulation sans que l'antigène soit rencontré et que ces cellules ne soient pas des véritables « cellules mémoire » ouvre la voie à l'hypothèse, qu'une stimulation (tabac, EBV) sur un terrain prédisposé (HLA-DR7, cellules avec défaut d'apoptose) permettrait d'aboutir à une production et accumulation des cellules incompetentes, ne répondant pas à un besoin de l'organisme, mais productrices d'Ig. Ces cellules pourraient échapper au contrôle du système immunitaire sans pour autant constituer un compartiment dangereux à évolution maligne. Dans cette hypothèse, ce problème « initial » serait bénin, et l'évolution vers les pathologies malignes serait possiblement liée à l'instabilité génétique.

- TLR

Décrits chez la drosophile, les Toll Like Receptors font partie de l'immunité ancestrale responsable de la reconnaissance des antigènes bactériens. Leur rôle est de reconnaître les antigènes bactériens : les polysaccharides, les séquences de l'ADN spécifiques. Les cellules des patients LPBL surexpriment pour la plupart les TLR exprimés par les cellules B (TLR 7, 9, 10). Il semble qu'ils soient présents sur les lymphocytes B correspondant morphologiquement aux lymphocytes binucléés. Il est curieux de constater, que les lymphocytes B prédominants dans la LPLB sont pas seulement CD27+, IgM+, IgD+, profil suggérant une origine extrafolliculaire, et plutôt de la zone marginale de la rate, et sont aussi des lymphocytes B mémoire innée, mais aussi qu'ils expriment des TLR 7, 9 et 10. Cette surexpression inattendue des TLR pourrait constituer un argument supplémentaire pour le diagnostic positif de cette entité.

Chez les patients LPLB, après l'étude de l'expression du TLR9, nous avons constaté qu'une partie des cellules CD19+ surexprimait ce récepteur par rapport aux cellules CD19+ des sujets témoins. L'étude de la stimulation de cellules CD19+ des patients LPBL par les agonistes du TLR9 a montré une prolifération d'une partie de leurs lymphocytes B, cette prolifération n'étant pas observée chez les témoins. Les lymphocytes B des sujets sains ne sont pas sensibles à la stimulation par les agonistes du TLR9, contrairement aux lymphocytes LPLB.

Par ailleurs il serait intéressant d'observer « simplement » les frottis lymphocytaires, afin de déterminer si le pourcentage des lymphocytes binucléés a changé. Une éventuelle augmentation du pourcentage des lymphocytes binucléés pourrait suggérer que c'est cette fraction cellulaire qui serait soumise à la prolifération plus spécifiquement.

- CD21

Les cellules sont CD21+. Le CD 21 est le récepteur du complément 2, mais aussi du virus d'Epstein Barr (EBV-R), avec persistance après activation par l'EBV.

Chez nos patients, la persistance du CD 21 pourrait résulter d'une interaction erronée de ces cellules avec EBV, d'autant plus que le CD 21 participe à la régulation de l'activation et de la prolifération des lymphocytes B. Toutes nos patientes sauf 1 présentent une sérologie EBV+.

b. IgM

Les lymphocytes B sont un constituant majeur du système immunitaire puisque ce sont les cellules clefs de la réponse immunitaire humorale, à l'origine de la production des anticorps, immunoglobulines (Ig) réparties en cinq classes chez l'homme. Les immunoglobulines sont (après l'albumine) les protéines les plus abondantes dans le sérum. Un individu de 70 kg produit environ 8 g d'Ig par jour, dont 5g d'IgA, 2,5g d'IgG, 0,6 g d'IgM et des traces d'IgD et d'IgE. Quotidiennement, plus de 3g d'IgA et la moitié de la production des autres classes sont transportées (Ig polymériques) ou diffusent à la surface des muqueuses, principalement digestives et respiratoires. Les manifestations infectieuses respiratoires et digestives caractéristiques des déficits de l'immunité humorale attestent de l'importance de ce système et de son caractère non redondant (Jacquot et al, 2006[30]).

- Élévation des IgM et la LPLB

Dans la littérature, le taux élevé des IgM sériques fait partie des critères diagnostiques de la LPLB. Nous le confirmons.

Pourquoi seulement les IgM ? L'étude de Fecteau et al 2003[16], soutient que les cellules B naïves après une stimulation prolongée sont capables de sécréter des IgM mais aussi des IgG et IgA, alors que chez nos patients on n'observe que les IgM augmentés. Dans le cas du déficit immunitaire avec hyper IgM lié à l'X, dans lequel la mutation du CD154 bloque l'interaction CD40-CD154, l'activation des lymphocytes B et la production des Ig sont dissociées, et il en résulte une réponse immune non fonctionnelle aux antigènes T-dépendants. Ce trouble est caractérisé par un défaut de commutation isotypique des Ig, avec une sécrétion excessive des IgM et une production affaiblie des IgA et IgG. Une anomalie de la voie activée par CD40 peut ainsi selon Loembé et al, 2001[45] expliquer l'absence de commutation en isotype IgG dans la LPLB, et cette anomalie expliquerait l'absence de prolifération et l'absence de la commutation des cellules B CD27+. Cependant selon Fecteau et al, 2003[16], la stimulation des cellules CD27+ est inefficace pour la prolifération, et même nocive à plus

long terme pour ces cellules. Chez les patients sains, une stimulation des CD27⁺ permet tout de même la commutation et ces cellules commencent à produire des IgG. Dans l'expérience de Fecteau et al, 2003[16], les cellules B mémoire stimulées ne proliféraient pas de manière excessive, mais commutaient, puis, si la stimulation se prolongeait, mourraient ; alors que les cellules B naïves CD27⁻ lors d'une stimulation prolongée se multipliaient de manière exponentielle et se différenciaient. Effectivement, nos cellules B 27⁺ LPLB semblent avoir un problème de commutation et d'échappement à la mort cellulaire par rapport aux cellules B normales, étudiées par Fecteau et al, 2003[16] mais l'absence de prolifération excessive est en accord avec le caractère B mémoire.

Par ailleurs Wong et al, 2002[77] ont discuté une association éventuelle entre la présence d'un chromosome 3 ou un isochromosome 3 surnuméraires et une hyperproduction des IgM dans les SLP-B chroniques comme la LLC, ou la maladie de Waldenström en suggérant qu'il pourraient avoir une influence dans la différenciation plasmocytaire des cellules B.

Comme on a vu, le taux des IgM élevé est typique de la physiopathologie de la LPLB. Cependant dans notre série, deux patientes gardent leurs IgM dans les VR (patients 11 et 29). Curieusement ces deux patientes ne présentent pas d'isochromosome 3 (seulement une trisomie 3) dans leurs lymphocytes stimulés. Leurs pourcentages CD19 restent faibles (18 et 22%) CD 20 et CD79b également, CD 24 faible. Le taux de lymphocytes : 2,47 et 8,15 ×10⁹/L respectivement. Leur diagnostic pourrait être remis en doute, particulièrement la première, chez qui il n'y avait ni IgM en excès, ni lymphocytose absolue, ni isochromosome 3, ni finalement HLA-DR7 (patiente 11)? Chez l'autre la lymphocytose et l'antigène HLA-DR7 étaient présents (patiente 29). Dans les cas où la LPLB est incontestable, le taux des IgM est cependant très augmenté, et il fait ainsi partie des critères diagnostiques.

Par ailleurs la présence de l'élévation des IgM peut avoir des conséquences dans les analyses des autres paramètres biologiques. Nous avons vu que la VS augmentée n'était pas accompagnée par d'autres arguments allant en faveur d'un syndrome inflammatoire. L'analyse des DO des « blancs » dans l'ELISA pour les anticorps anti-cardiolipides suggère une perturbation des résultats à l'origine de laquelle se trouveraient les IgM polyclonales présentes en excès chez nos patients. Lorsqu'elles sont présentes en concentration sanguine importante, les immunoglobulines monoclonales sont connues pour interférer avec de nombreux dosages en immuno-analyse. Une interférence dans les tests ELISA causée par des IgM a déjà été rapportée chez les patients positifs pour le facteur rhumatoïde (Lim et al,

1996[42]). Toutefois cette interférence était expliquée par un mécanisme spécifique. Une autre publication (Roszyk et al, 2007[60]) rapporte le cas d'un patient atteint de la maladie de Waldenström, pour lequel la détermination de certains paramètres du bilan martial (détermination immunoturbidimétrique de la ferritine et de la transferrine) a été impossible du fait de la présence d'une IgM monoclonale. Dans la LPLB nous sommes en présence des IgM polyclonales, sécrétées par des lymphocytes B de type mémoire, probablement non commutés, donc produisant des anticorps dirigés contre les antigènes aléatoires. Par quel mécanisme pourraient-ils interférer avec notre ELISA aCL? S'agit-il d'une réaction non spécifique des anticorps avec les parois des puits de la plaque? D'une réaction plus spécifique des IgM polyclonales contre les composants du test (sérum de veau nouveau-né)? Nous ne pouvons toutefois pas affirmer qu'il s'agit systématiquement de faux-positifs. En effet, les IgM augmentées perturbant les résultats de ce test peuvent très bien masquer la présence des vrais anticorps anti-cardiolipide de type IgM. L'ELISA aCL ne présente donc pas de spécificité satisfaisante dans le cas des patients LPLB. (Cf. discussion du manuscrit en annexe 4).

c. « Fonctions » des lymphocytes B mémoire (d'après Jacquot et al, 2006[30])

De manière générale, la réponse des lymphocytes B aux antigènes protéiques, implique (de manière non exclusive) une coopération avec des lymphocytes T. Dans cette coopération, le lymphocyte B joue le rôle de cellule présentatrice d'antigène (face au lymphocyte T). À côté d'une première vague de différenciation de cellules B en plasmocytes à IgM (producteurs d'anticorps de faible affinité), cette interaction T-B aboutit à une réaction folliculaire, déclenchée par la migration de quelques cellules B fondatrices depuis la zone T d'un organe lymphoïde secondaire (où a débuté l'activation B) vers un follicule lymphoïde, pour conduire à la formation d'un centre germinatif. Le passage du lymphocyte B dans un centre germinatif entraîne la survenue d'altérations génétiques supplémentaires au niveau des *loci* réarrangés des chaînes lourdes ou légères des gènes d'Ig. Il s'agit, d'une part, des hypermutations somatiques des segments codant pour les domaines variables et, d'autre part, de la commutation isotypique, qui permet la production des différentes classes d'Ig. La survenue des mutations somatiques est théoriquement contemporaine de l'acquisition, par les cellules B naïves, du CD27, impliqué dans la différenciation ultérieure des cellules B en plasmocytes. Ces hypermutations sont un processus stochastique, qui entraîne une maturation de l'affinité des anticorps grâce à la sélection, par l'antigène présenté par des cellules spécialisées des

follicules, les cellules folliculaires dendritiques, des clones B exprimant un BcR de forte affinité. L'aide apportée aux lymphocytes B par les cellules T auxiliaires folliculaires est un point de contrôle majeur de la réponse immunitaire humorale T-dépendante. La stimulation du récepteur CD40 est nécessaire pour la différenciation terminale T-dépendante des lymphocytes B activés. La liaison avec son ligand (CD40L ou CD154) induit CD40 à bloquer l'apoptose des lymphocytes B activés, leur permettant d'évoluer vers les stades de différenciation ultérieurs de plasmocyte ou de lymphocyte mémoire. La liaison CD40-CD154 apparaît aussi nécessaire pour l'induction du switch des lymphocytes B et leur réponse à l'IL-10, lorsque la liaison CD40/CD154 intervient entre lymphocyte B et une cellule dendritique folliculaire. Poursuivie jusqu'à son terme, la réaction folliculaire aboutit à la différenciation terminale des lymphocytes B folliculaires en lymphocytes B mémoire ou en plasmocytes. Les plasmocytes ainsi produits migrent vers la moelle osseuse ou vers des territoires muqueux, selon le site initial de l'activation B, et produisent des anticorps de forte affinité appartenant aux différentes classes d'Ig. La population B mémoire circule et peut être aisément identifiée dans le sang : ces cellules (qui ont subi les processus d'hypermutation somatique et, éventuellement, de commutation isotypique) sont CD27⁺ et expriment des Ig membranaires de classe IgM seule, ou IgG, IgA ou IgE.

Les cellules de nos patients sont caractérisées par un phénotype Ig M⁺D⁺ CD27⁺. On considère que les lymphocytes B IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ sont une population issue d'une voie de différenciation extrafolliculaire. En effet, l'analyse des lymphocytes B du sang par un double marquage avec des anticorps anti-IgD et anti-IgM permet de mettre en évidence plusieurs sous-populations comme indiqué précédemment :

- des cellules B IgM^{low} IgD^{high} sont des cellules B naïves CD27⁻, dont les gènes d'Ig sont réarrangés, mais n'ont pas subi le processus d'hypermutation ;
- des cellules B IgM⁺ seule (IgD⁻), ainsi que les cellules B IgM⁻ IgD⁻ (correspondant en fait aux cellules B IgG⁺ ou IgA⁺), sont des cellules B mémoire CD27⁺ post-centre germinatif ;
- des cellules B IgM^{high} IgD^{low} sont également des cellules CD27⁺, avec des gènes d'Ig ayant subi le processus d'hypermutation somatique, mais leur présence chez les patients atteints de déficit immunitaire avec hyper IgM lié à l'X suggère que leur origine est extrafolliculaire. Dans le déficit immunitaire avec hyper IgM lié à l'X, la mutation du CD154 bloque l'interaction CD40-CD154. Dans ce cas, l'activation des lymphocytes B et la production des Ig sont dissociées, et il en résulte une réponse

immune non fonctionnelle aux antigènes T-dépendants. Ce trouble est caractérisé par un défaut de commutation isotypique des Ig, avec une sécrétion excessive des IgM et une production affaiblie des IgA et IgG. La population en cause dans les LPBL est proche de cette dernière (IgM^{high} IgD^{low} CD27+).

Les cellules B IgM+ IgD+ CD27+ du sang forment la contrepartie circulante des cellules B de la zone marginale de la rate ; ces cellules de la zone marginale appartiennent à une sous-population B particulière, localisée à la périphérie de la pulpe blanche splénique et impliquée dans la réponse T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques. Chez l'homme, les cellules B IgM+ IgD+ CD27+ sont effectivement impliquées dans la protection contre les infections par des germes encapsulés comme *Streptococcus pneumoniae*. Elles pourraient donc représenter un compartiment lymphocytaire B spécialisé dans la réponse T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques, tels que les polysaccharides des capsules bactériennes. La présence des cellules B IgM+ IgD+ CD27+ chez l'enfant avant l'âge de 2 ans, alors que la réponse immunitaire contre les bactéries encapsulées est encore déficiente, suggère que l'acquisition des hypermutations somatiques représente dans leur cas un mécanisme programmé de développement plutôt que la conséquence d'une activation immunitaire, comme celle subie par les cellules B de centre germinatif. Le site d'acquisition des hypermutations somatiques par les cellules B IgM+ IgD+ CD27+ reste incertain, d'autant que l'activation induced deaminase (AID), enzyme essentielle au processus d'hypermutation somatique, n'est que faiblement détectée parmi les cellules B de la zone marginale de la rate chez l'homme. Quoiqu'il en soit, la population B IgM+ IgD+ CD27+ semble être le résultat d'une voie de différenciation extrafolliculaire, permettant, grâce à une diversification du répertoire pré-immun par hypermutations somatiques préalables au contact avec l'antigène, de disposer d'une population B spécialisée dans la réponse T-indépendante aux antigènes polysaccharidiques des bactéries encapsulées.

Le rôle final des lymphocytes B IgM+ IgD+ CD27+ serait donc de sécréter les anticorps de forte affinité contre les antigènes polysaccharidiques dans la phase précoce de l'infection. Les IgM produites jouent ainsi un rôle important dans les infections pneumococciques, et leur diminution lors du vieillissement, ou des situations pathologiques comme l'infection par le VIH est associée au risque accru des infections graves au pneumocoque (Hafraoui et al, 2009[25]). La réponse des cellules B IgM+ IgD+ CD27+ aux antigènes polysaccharidiques, n'est pas limitée à la sécrétion des IgM de forte affinité. Elles peuvent sécréter également les IgG après une stimulation lymphocyte T-indépendante, et sont ainsi le principal outil responsable de la fabrication des IgM et IgG dirigés contre le pneumocoque lors de la

vaccination anti-pneumococcique. La fraction des cellules B IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ représente chez un individu normal que 11% des lymphocytes B. Dans la LPLB, elle représente entre 60 et 88% des lymphocytes B. (Himmelman et al, 2001[28]), et ces chiffres augmentés sont en accord avec ceux trouvés chez la plupart de nos patients.

Les cellules B IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ dans la LPLB ont initié les mutations somatiques des IgV, mais ne présentent pas de traces de sélection positive par les antigènes qui suit les hypermutations somatiques. Cela suggère un défaut d'élimination de cellules B IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ de faible affinité antigénique. Par ailleurs Himmelman et al, 2001[28] ont montré que la stimulation *in vitro* par l'IL-2 et *Staphylococcus aureus* Cowan I (protéine-A) des lymphocytes de patients atteints d'une LPLB, a permis d'obtenir la synthèse des IgM.

Au cours des LPLB, ces cellules pourraient être considérées comme cellules B mémoire innée, c'est à dire non T dépendante, qui est dirigée contre les antigènes jamais rencontrés mais pré-programmés dans notre espèce. Il s'agirait des cellules B produisant les anticorps contre les polysaccharides bactériens, qui seraient présents même chez les enfants de moins de 2 ans, qui n'ont pas eu de contact avec ces antigènes justifiant l'immunisation (Jacquot et al, 2006[30]). Cette population lymphocytaire s'accumulerait dans LPLB, sans raison justifiée par leur fonction. Ces cellules restent dans la circulation, sans pouvoir disparaître par apoptose, en s'accumulant et produisant les anticorps de faible affinité, ce qui est montré par le taux élevé des IgM chez tous les patients LPLB.

Un des arguments qui va dans le sens de cette hypothèse est rapporté par Hafraoui et al, 2009[25], qui décrivent le cas d'une patiente LPLB présentant une anergie face au vaccin anti-pneumococcique. Cette patiente, ayant par ailleurs tous les signes de LPLB habituels, se plaignait des infections des hautes voies respiratoires à répétition. 70% de ses cellules B étaient CD27⁺, IgM⁺, IgD⁺. Six semaines après la vaccination par un vaccin anti-pneumococcique contre 23 sérotypes, cette patiente présentait une absence d'immunisation avec des titres des IgG spécifiques indétectables. La réponse humorale aux antigènes pneumococciques est dépendante de l'interaction CD40-154 et les cellules B des patients LPLB montrent un défaut de prolifération suite à la stimulation CD40 (Loembé et al, 2001[45]). Ainsi la commutation en cellules sécrétantes les IgG est compromise. Ces auteurs postulent que les anomalies cytogénétiques résultant de défaut de réparation de l'ADN dans ces cellules les empêchent de produire des IgG dirigés contre les antigènes pneumococciques chez cette patiente. La patiente LPLB présente un défaut de production d'IgG spécifiques.

Cela suggère que les mécanismes de commutation d'isotype IgG pourraient être partiellement compromis chez les patients LPLB (à cause d'anomalies chromosomiques associées ?)

Autre exemple est décrit par Granados et al, 1998[22], leur patiente, âgée alors de 24 ans présentait une anergie pour la vaccination contre l'hépatite B. Il serait intéressant d'évaluer cette capacité d'immunisation et de production des IgG chez les patients LPLB.

Cependant, les deux patientes présentaient un phénotype HLA-DR7, qui en plus d'être associé à la LPLB et aux cancers de la thyroïde, est également décrit comme associé à un défaut de réponse à l'infection virale, comme une incapacité de développer les anticorps protecteurs contre l'antigène HBs (Ag HBs) de l'hépatite B, ou comme une susceptibilité à l'infection chronique par l'HBV (Granados et al, 1998[22]).

d. EBV

La quasi-totalité de notre population a la sérologie positive pour EBV. Plusieurs auteurs rapprochent infection par EBV et la LPLB. Mais seulement certaines études trouvent le génome d'EBV dans les lymphocytes de LPLB (Larcher et al, 1995[35], Mitterer et al, 1995[48]).

EBV est un γ -herpesvirus infectant plus de 90% de la population adulte. Il est connu pour être un virus oncogène, induisant notamment lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin, le carcinome naso-pharyngien, etc. (Oyama et al, 2007[53]). Après une primo-infection, les lymphocytes B restent infectés de façon latente. Ces cellules expriment seulement un ensemble limité de gènes viraux codant pour les protéines nucléaires (EBNA), les protéines membranaires (LMP) ainsi que les petits ARNs EBER d'Epstein Barr associés à la latence virale (Mitterer et al, 1995[48]). La présence de « gène très précoce » BZLF1 est l'indicateur de l'infection sécrétante, active.

La morphologie des lymphocytes binucléés pourrait suggérer un lien avec une infection virale persistante par EBV (Mitterer et al, 1995[48]) mais aucune preuve n'a été apportée. EBV est connu pour être responsable d'induction des processus lymphoprolifératifs chez les patients immunodéprimés. Chow et al, 1992[8] ont montré par hybridation in situ et PCR la présence d'EBV dans les lymphocytes du sang périphérique (mais pas dans les lymphocytes binucléés) d'un patient.

- EBV et la voie CD40

Loembé et al, 2001[45], suggèrent que l'anomalie de la voie CD40 se situerait en aval du CD40. Les molécules TRAFs (TNF receptor-associated factor) transmettent le signal de

CD40 au niveau cytoplasmique. L'interaction entre CD40 et ces molécules aboutit à la formation du complexe de signalisation membranaire qui permet un recrutement des autres protéines enzymatiques et culmine par l'activation de facteurs de transcription cellulaires tels que c-jun et NF- κ B. Ce dernier facteur est responsable de la sécrétion des anticorps induite par CD40 et contrôle positivement les marqueurs d'adhésion ICAM-1 et LFA-1, ainsi que marqueurs d'activation CD95, CD23 et CD80. C'est surtout la molécule TRAF2 qui médie l'activation de NF- κ B. De plus, les signaux qui altèrent la concentration cytoplasmique du TRAF2 par rapport au TRAF3 peuvent modifier les résultats de l'activation de NF- κ B. Loembé et al, 2001[45] suggèrent qu'un des facteurs qui pourraient être tenus pour responsables de la modification de la cascade de signalisation du CD40 chez les patients LPLB est la LMP-1, la protéine membranaire latente d'EBV. Ainsi ces auteurs ont recherché la LMP-1 par PCR chez leurs patients LPLB et rapportent que la recherche était positive dans tous les cas. Cette protéine a une capacité de lier les protéines TRAF, et induit les effets similaires aux effets induits par CD40, en modifiant les diverses concentrations et empêchant leur liaison au CD40 en interférant ainsi dans la voie de la signalisation CD40.

Autre hypothèse possible serait que les protéines d'EBV responsables du détournement de la cellule de sa fonction permettraient une accumulation des anomalies cytogénétiques qui empêchent la commutation, et comme la voie CD40 continue à être efficace, la cellule sécrète des IgM de façon aberrante.

- EBV et l'asthénie : syndrome de réactivation ?

Par ailleurs, EBV semble être parfois responsable du syndrome de fatigue chronique associant fatigue, myalgies, arthralgies, céphalées et pharyngite chronique (Mitterer et al, 1995[48]). Ces auteurs décrivent un cas de LPLB, où la patiente souffrait d'asthénie prononcée, d'érythème noueux, de sueurs nocturnes, du prurit et des arthralgies diffuses. Comme les sérologies de la patiente ont fait penser les auteurs à la réactivation d'EBV (avec hybridation *in situ* indiquant la présence de l'ARN viral) et l'infection par EBV est connue pour laisser derrière elle une fatigue durable (syndrome de fatigue post-virale), les auteurs assimilent cet ensemble de signes à un syndrome de réactivation virale. Cependant les signes fonctionnels rapportés, ainsi que l'absence d'anomalies à l'examen clinique, ressemblent fortement aux signes retrouvés dans notre population de patients ainsi qu'aux autres cas décrits, sans que la réactivation virale soit évoquée.

- EBV et l'inhibition de l'apoptose

Il a été démontré que plusieurs protéines EBV exprimées pendant la phase de latence sont impliquées dans l'activation et transformation ultérieure des cellules B infectées (Larcher et al, 1995[35]). Selon Larcher et al, 1995[35], EBNA2 (protéines nucléaires) et LMP1 (latent membrane protein) pourraient être responsables de l'activation dans les cellules infectées du proto-oncogène bcl-2, ce qui inhiberait l'apoptose. De plus, ces deux protéines mènent à une expression altérée d'une série de protéines comme CD23 et CD21. Ces protéines de surface, qui existent aussi sous forme soluble, sont impliquées dans l'activation, la signalisation intracellulaire et la régulation de la production des immunoglobulines E. Ces auteurs ont observé une augmentation de CD21 soluble dans les sérums des patients souffrant de l'infection aiguë à EBV, de rubéole et aussi de cancers induits par EBV. En testant des sérums des patients avec des troubles lymphoprolifératifs variés, Mitterer et al, 1995[48] ont trouvé des taux élevés de CD21 chez un patient présentant une prolifération chronique de cellules B d'origine indéterminée. Sur les cellules du patient, ils ont trouvé le CD30 (souvent exprimé par les cellules Reed-Sternberg dans lymphome de Hodgkin). Les patients de notre série ne l'expriment pas. Le cas décrit par Mitterer et al, 1995[48] est DR7, DR8, ne présente pas de réarrangement Bcl-2/IGH par PCR, mais la protéine bcl-2 est présente. Le CD21 a été également exprimé, comme dans notre série.

Mais cette survie des cellules contenant le génome d'EBV peut être également associée à un défaut viral (absence de possibilité de passage à la latence ?). Le rôle du tabac pourrait ainsi être ramené à la stimulation chronique de la réplication virale.

- EBV et la sécrétion des IgM

Les patients avec LPLB montrent des signes du dérèglement immunologique : augmentation des IgM et aussi du CD21 soluble. Larcher et al, 1995[35] expliquent que ce sont les cellules B spécifiques de la LPLB (CD19+, CD20+, IgM+, IgD+ et CD27+) qui les sécrètent. Par ailleurs il a été démontré, qu'EBNA2 et LMP1 induisent la production de plusieurs antigènes de surface cellulaire dont le CD21. La fonction du CD21 n'est pas claire : une interaction entre CD21 et CD23 pourrait jouer un rôle dans la commutation des lymphocytes B avant qu'ils ne produisent les IgE. Les anticorps dirigés contre CD23 semblent bloquer les lymphocytes B qui ne commutent pas et continuent de produire des IgM. Ainsi des taux importants de CD21 dans les centres germinatifs pourraient être responsables par ce biais, des IgM augmentés. Autre mécanisme possible : le CD21 semble lier CD23 médiant ainsi l'activation de la cellule B.

Mitterer et al, 1995[48] rapportent que les cellules B des patients infectés par EBV restent atteintes de façon latente après une infection initialement productive. Ces cellules infectées de manière latente, expriment seulement une série limitée des gènes du virus codant pour les protéines nucléaires (EBNA), protéines membranaires (LMP) et également les « petits ARNs EBER » associés à la latence virale peuvent être détectés en grand nombre de copies.

Expérimentalement, les cellules transfectées avec EBNA2 et LMP1 induisent une stimulation de bcl-2 proto-oncogène ; ce qui pourrait protéger les cellules B de l'apoptose et apporter un avantage aux cellules infectées par EBV. Ainsi on suppose que les cellules pourraient porter seulement une partie du génome viral dans leur génome, des fragments qui leur procurent des avantages, vivre et en se divisant offrir leur génome avec les fragments du génome viral aux cellules filles. Ainsi on peut supposer que selon le fragment porté par une cellule donnée, le génome viral est plus ou moins détectable par la recherche d'EBV par la PCR classique ; quand on ne sait pas ce que l'on cherche en particulier, les sondes et/ou les amorces peuvent tout simplement ne pas correspondre au fragment présent.

- EBV et la condensation prématurée de la chromatine

La condensation prématurée de la chromatine est une anomalie rencontrée également dans les cellules infectées par EBV. Elle concerne selon Roussel et al, 2004[57], Lancry et al, 2001[33] : 50% de patients des cas de la LPLB. Dans notre série, 6 sur 7 patients testés soit 86%. Tous ces patients ont une sérologie EBV positive.

Lee et al, 2007[37] rapportent plusieurs anomalies cytogénétiques ayant lieu dans les cellules infectées par EBV. Ils décrivent une EBV kinase qui a probablement une contribution en induisant des événements « mitosis-like » à la réplication du virus. EBV BGLF4 kinase est la seule sérine/thyrosine kinase identifiée dans EBV, et est conservée dans tous les herpesvirus.

On sait peu de choses sur comment EBV réorganise l'architecture du noyau et les territoires de la chromatine. Les auteurs démontrent, que durant la réactivation du virus, lors de la réplication d'EBV, la chromatine est condensée et que la kinase BGLF4 seule peut induire la condensation du DNA cellulaire via la phosphorylation de la condensine cellulaire et de la Topoisomérase II, couplée avec des multiples événements de type « mitosis-like », ce qui doit probablement faciliter la réplication virale.

Ainsi la BGLF4 induit la condensation chromosomique de la cellule, le désassemblage et la redistribution de la membrane nucléaire (mais pas sa dégradation), et également les modifications du cytosquelette. On peut émettre l'hypothèse que cette enzyme agit pour transformer la cellule en usine à EBV sans avoir le moindre intérêt pour aboutir ni à sa

division, ni à sa mort (dont la mort programmée). De plus, la BGLF4 induit la condensation prématurée de la chromatine indépendamment de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve et de la signalisation propre de la cellule. Curieusement, les changements chromatinien induits par les cellules transfectées avec le gène du BGLF4, diffèrent quelque peu de ceux qui sont visibles dans les cellules infectées par EBV. La BGLF4 seule induit la condensation chromatinienne typique de la prophase, alors que les cellules infectées répliquantes, BGLF4 positives présentaient un ADN spongieux, qui apparaît avec des motifs mouchetés au marquage immunohistochimique. Dans les cellules de nos patients présentant la condensation prématurée de la chromatine (prématurée puisque indépendante de la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve), on observe les images semblables à la situation, où la cellule est transfectée, et ne possède du génome viral que le fragment contenant la BGLF4.

L'hypothèse, que la cellule, ne possédant qu'un fragment du génome viral correspondant à la BGLF4, pourrait être vérifiée par la recherche spécifique de la partie du génome correspondant à la BGLF4.

La BGLF4 fonctionne en mimant l'enzyme Cdc2, la kinase cellulaire induisant le cycle et la mitose. Elle utilise les cibles de la Cdc2, et donc reste indépendante de la Cdc2.

Cependant, les mécanismes normaux, permettant le passage de la cellule en mitose, incluent la vérification et la réparation de l'ADN cellulaire. Cette étape étant nuisible au virus, semble être évitée grâce à la BGLF4. Par ailleurs, la condensation de la chromatine rend difficile la réplication de l'ADN de la cellule hôte ; bloquant ainsi le métabolisme cellulaire et le détournant au bénéfice de la réplication virale. Ainsi la réduction de l'espace occupée par la chromatine libère de l'espace interchromosomique pour la réplication virale. La majorité des cellules transfectées avec BGLF4 ne montre pas de progression vers la division. Cependant, parmi les cellules transfectées par le génome de la BGLF4, certaines échappent à cette tendance et se divisent. Il serait intéressant d'étudier la stabilité de leur génome, puisque la BGLF4 permet de contourner les étapes de contrôle et de la réparation de l'ADN. Par comparaison, nous constatons dans les lymphocytes B de nos patients, une grande instabilité chromosomique. L'anomalie associée, l'isochromosome 3, et toutes les autres anomalies caryotypiques suggèrent, que les étapes de contrôle et de la réparation de l'ADN dans ces cellules ont plus ou moins échoué. Il pourrait s'agir effectivement d'une interférence avec les mécanismes classiques de réparation par une enzyme détournant la cellule de son rôle premier, par le biais de la BGLF4 ou d'un mécanisme semblable, préparant le terrain pour la réplication virale.

e. HLA-DR7

Dans notre série, le phénotype HLA-DR7 est rencontré chez 55% de patients. Ce pourcentage est effectivement plus élevé que dans la population caucasienne, qui présente ce phénotype dans 25 à 30%.

Dans la littérature, la fréquence du HLA-DR7 dans la LPLB diffère un peu, bien que l'association soit toujours signalée : 62% chez Lancry et al, 2001[33] (8 patients), 64% pour Schmidt-Hieber et al, 2008[61] (25 patients), 90% pour Himmelmann et al, 2001[29] (5 patients). D'autres y ajoutent l'antigène HLA-B44 comme également associé de manière significative (dans notre série : B44 : 35,5%).

Les fréquences des divers antigènes dans la population Lorraine (Laboratoire HLA, Brabois) sont les suivantes :

	A2 (%)	A24 (%)	B44 (%)	DR2 (%)	DR7 (%)	DQ2 (%)
LPLB	26	32,2	38,7	9,8	55	58
Lorraine	49	19,5	19,5	29	22,6	34

Tableau IX : Comparaison de l'incidence des antigènes HLA les plus fréquents dans notre cohorte à leur incidence dans la région lorraine.

La fréquence accrue de DQ2 est expliquée par un déséquilibre de liaison, en effet, l'antigène DR7 est associé à DQ2, et si un individu présente l'antigène DR7, il a 2 chances sur 3 de présenter l'antigène DQ2.

Par ailleurs, l'antigène DR7 est associé de manière significative au psoriasis. Ce fait pourrait expliquer la fréquence accrue du psoriasis dans notre cohorte.

L'association avec HLA-DR7 n'est pas absolue, même au sein d'une même famille.

Dans notre série, nous avons un cas familial, une mère et une fille présentant la LPLB. La mère présente l'antigène HLA-DR7, alors que la fille n'en est pas porteuse. Ce cas particulier, qui peut suggérer une prédisposition familiale, confirme aussi que la prédisposition génétique à la LPLB n'est pas liée uniquement au phénotype HLA. Dans une famille décrite par Delage et al, 2001[12], outre le *propositus* (femme avec LPLB), deux de ses sœurs ont été diagnostiquées LPBL. Le réarrangement Bcl-2/IGH est trouvé chez 5/7 des frères et sœurs, et 8/10 des membres de la famille apparentés de premier et de second degré. Bien qu'aucune des 3 patientes avec LPLB ne présentait de phénotype HLA-DR7, le réarrangement bcl-2/IgH a

été significativement associé à l'haplotype HLA A9, B14, DR5 : le phénotype présent dans cette famille, et trouvé chez les trois personnes atteintes.

On pourrait supposer que certaines combinaisons des phénotypes HLA sont plus à risque de développer la LPLB, mais d'autres facteurs étant également nécessaires pour avoir une expansion lymphocytaire. Notre cas familial peut suggérer aussi une exposition aux mêmes facteurs favorisants environnementaux. Cependant on ne trouve pas d'exposition à des toxiques, ni de style de vie particulier. Le seul facteur associé est le tabagisme (confirmation).

- HLA-DR7 et EBV

La sérologie EBV positive est presque constante chez des patients avec LPLB, il se peut qu'un défaut de présentation d'antigène associé à l'antigène DR7 soit à l'origine d'une réponse altérée à certains antigènes viraux chez les patients par ailleurs tout à fait immunocompétents. Les cellules comprenant le génome viral restent vivantes, épargnées par le système immunitaire.

- HLA-DR7 et les autres pathologies

En plus d'être connu pour son association avec l'anergie à l'antigène HBs et le psoriasis, l'antigène HLA-DR7 est associé au cancer de la thyroïde. Dans notre série, tous les patients présentant les problèmes thyroïdiens bénins (5 patients : 3 goitres et 3 thyroïdites) font partie de 45% qui ne présentent pas d'antigène HLA-DR7.

6. Examen cytogénétique

- Présence d'isochromosome 3 surnuméraire

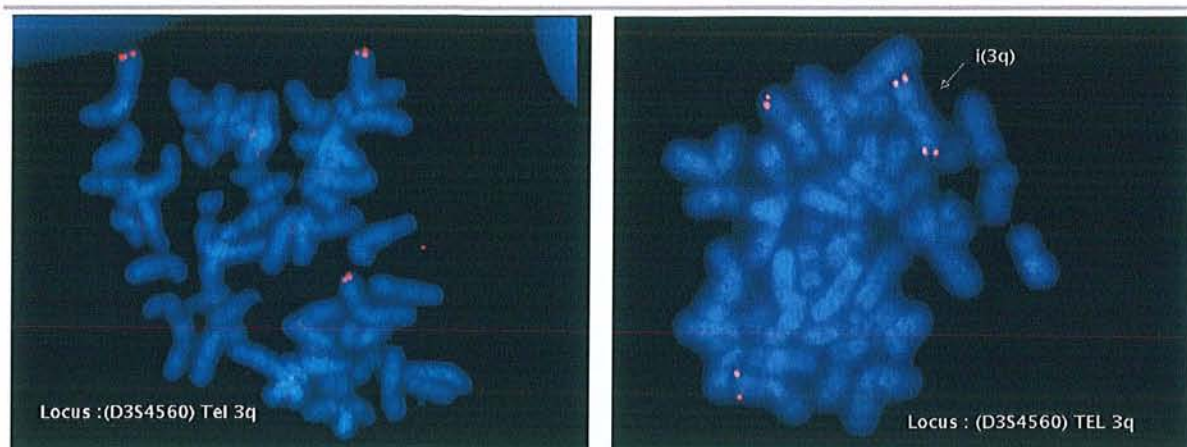


47,XX,+i(3q)

Figure 6. Caryotype (patiente 21) montrant un isochromosome +i(3q)

La présence d'un isochromosome surnuméraire a été décrite pour la première fois en 1989 dans 3/26 métaphases d'un patient ayant une LPLB Perrault et al, 1989[54]. L'analyse cytogénétique conventionnelle (mise en culture et la co-stimulation des lymphocytes sanguins en présence simultanée de deux mitogènes Tetradecanoyl-Phorbol-Acétate (TPA) et le Lipopolysaccharide E-coli (LPS)) d'un grand nombre de métaphases pour chaque patient a permis de montrer que l'isochromosome i(3q) était une anomalie chromosomique récurrente dans la LPLB.

L'utilisation de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur des cellules en métaphase (après l'hybridation des chromosomes avec une sonde spécifique de centromère du chromosome 3) a permis d'observer un plus grand nombre de mitoses et de détecter la présence de la trisomie 3 ou d'un dérivé du chromosome 3 surnuméraire +i(3q) là, où la technique de cytogénétique conventionnelle ne les a pas décelés. L'utilisation d'une sonde télomérique du bras long du chromosome 3 a confirmé d'autre part, la présence de l'isochromosome +i(3q) observée par la technique de cytogénétique conventionnelle.



Trisomie 3

Isochromosome +i(3)(q10)

Figure 7. Hybridation in situ (FISH) avec les sondes télomériques du chromosome 3 chez la patiente 21

Le rôle du chromosome 3 dans la pathologie de la LPLB est incertain. La présence d'un +i(3q) a été décrite dans certaines tumeurs comme rhabdomyosarcomes, carcinomes pulmonaires ou prostatiques et le gain du chromosome 3 a été démontré comme étant une aberration génétique pivot dans la transition de plusieurs états précancéreux, tels que la dysplasie/carcinome in situ au cancer invasif du col utérin (Heselmeyer K 1996)[27]. Smith et al, 1998[63], ont montré que le +(i)(3q) introduit dans les myoblastes empêchait la différenciation musculaire. Les cellules avaient souvent plus de 156 chromosomes et une amplification anormale du centrosome était observée. Enfin, après irradiation des cellules, le nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire était réduit (Smith et al, 1998[63]). Cette anomalie pourrait avoir un rôle dans l'émergence d'une subpopulation clonale et/ou maligne.

Selon Roussel et al, 2004[57], Callet-Bauchu et al, 1999[3], l'i(3)(q10) est observé dans 77% des cas de LPLB. Lancry et al, 2001[33], trouvent également i(3)q(10) avec une fréquence de 60%, chez leur 8 patients étudiés. La trisomie 3 présente chez tous leurs patients testés (4/8). Dans notre série de 33 patients, nous avons mis en évidence une anomalie chromosomique clonale chez 17 patients / 29 étudiés, la présence d'un isochromosome i(3q) surnuméraire chez 14 patients / 23 (59%), et dans 12 cas une trisomie du chromosome 3 indépendamment de l' i(3q) et les deux anomalies associées chez 11 (52%) patients. Chez 6 patients, aucune des deux anomalies n'était retrouvée. Nos résultats montrent donc, que c'est une anomalie associée, mais pas toujours présente chez les patients LPLB.

Le fait que les autres lignées des globules blancs ne soient point concernées par cette anomalie indique selon les auteurs, qu'elle est apparue dans une cellule précurseur après

qu'elle se soit engagée dans la lignée B, mais dans un stade précoce de la différenciation du lymphocyte B, avant le réarrangement des gènes des Ig.

Les travaux de l'équipe lyonnaise ont montré par la technique FICTION (associant une étude immunologique puis une hybridation in situ) que le +i(3)(q10) était restreint aux cellules B chez trois patients, mais que l'anomalie pouvait être détectée dans les cellules binucléées ou non binucléées et dans les cellules lymphoïdes exprimant les chaînes légères kappa et lambda (Callet-Bauchu et al, 1997[3]). En revanche, Mossafa et al, ont montré que chez deux patients l'anomalie était restreinte aux cellules non binucléées, quel que soit le type de chaîne légère (Mossafa et al, 1999[50]).

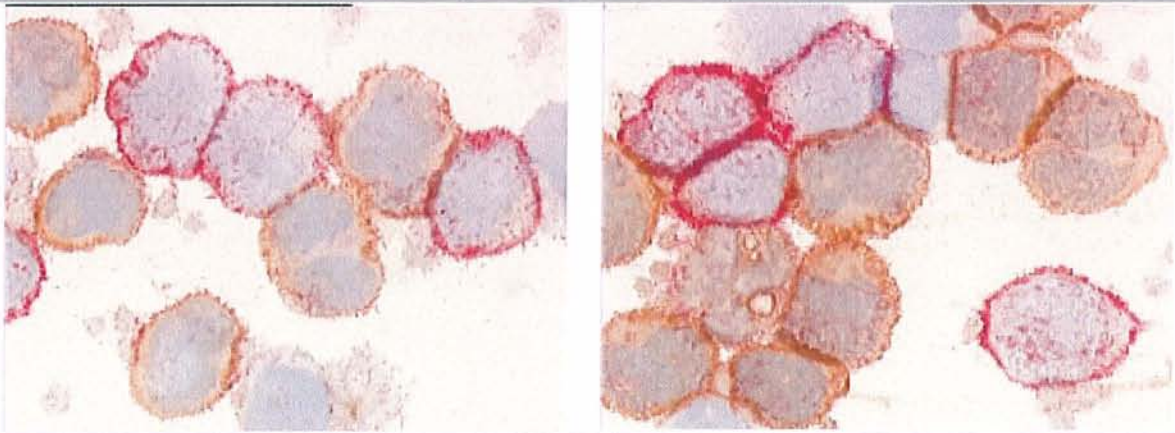


Figure 8. Immunohistochimie : marquage des chaînes kappa (rouge) et lambda (orange) : pas de restriction des chaînes par rapport à la morphologie binuclée

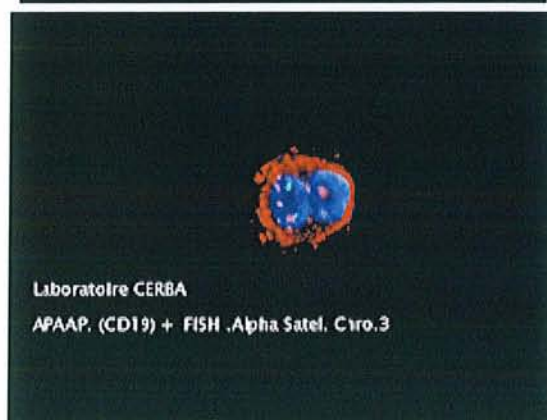
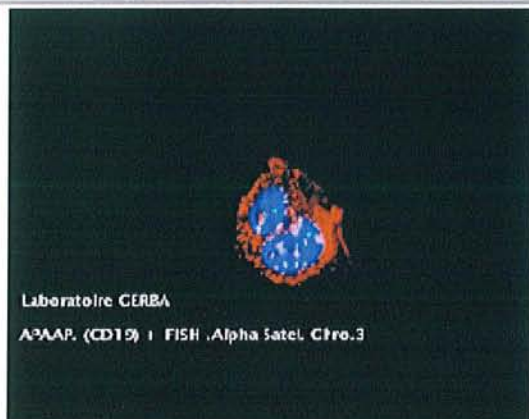
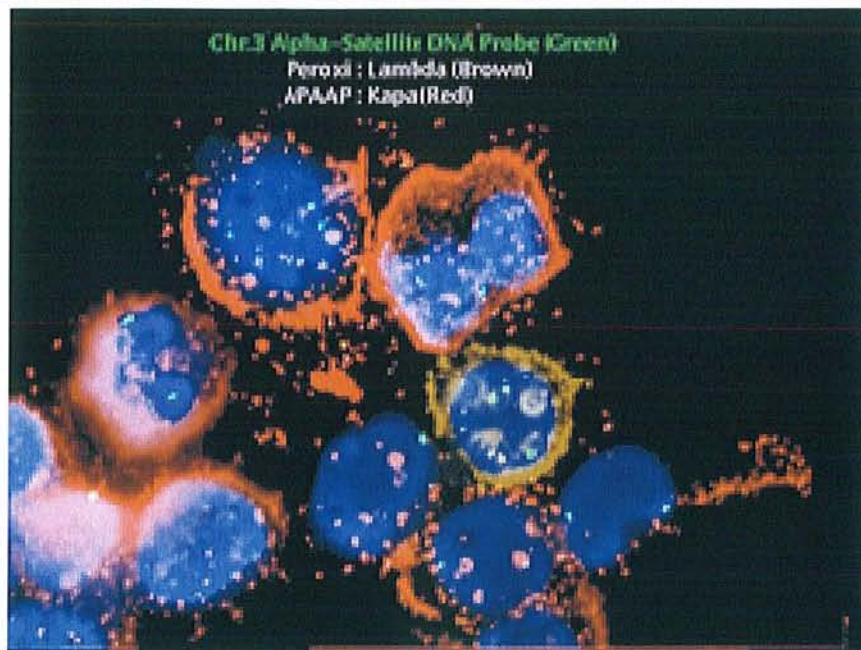


Figure 9. FICTION : Immunohistochimie (chaînes kappa et lambda) avec FISH (sondes télomériques du chromosome 3) : les anomalies du nombre du chromosome 3 et la morphologie : absence de restriction

- Condensation prématurée des chromosomes (PCC)

Selon Roussel et al, 2004[57], Callet-Bauchu et al, 1999[3], la PCC est associée à l'i(3)(q10) dans 41% des cas.

Lancry et al, 2001[33], trouvent la PCC dans 20% des cas (sur 8 patients étudiés).

Nous avons observé une condensation prématurée des chromosomes (PCC) chez 6 patients de notre série.

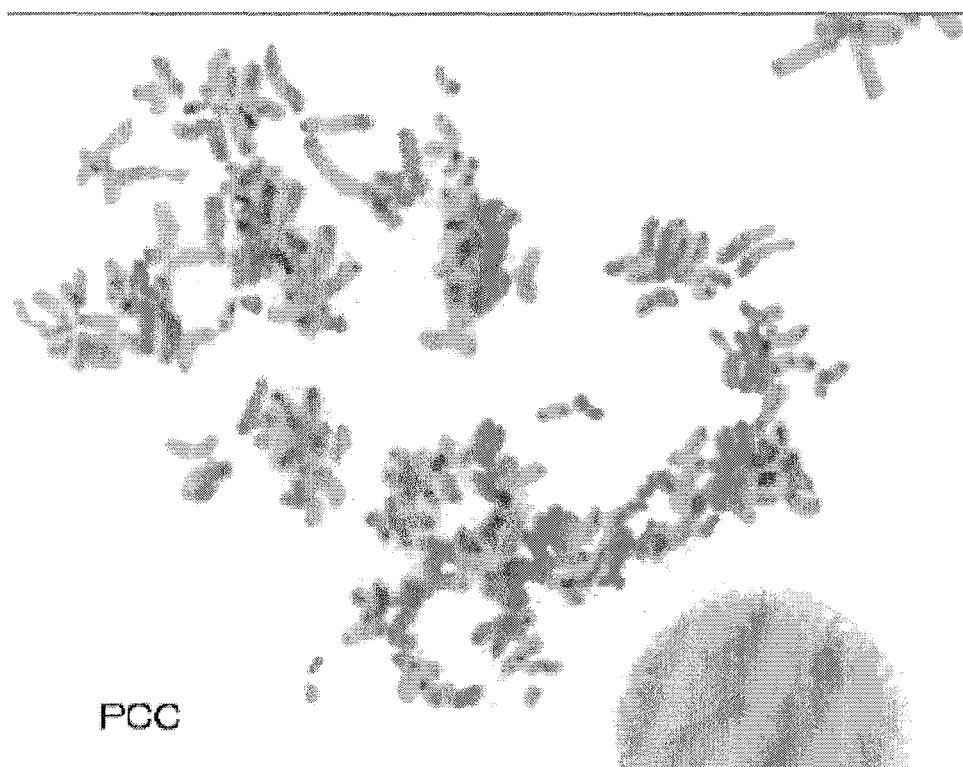


Figure 10. Caryotype montrant le phénomène de condensation prématurée des chromosomes (PCC)

Durant un cycle cellulaire normal, la condensation chromosomique assure une ségrégation appropriée de l'information génétique pendant la mitose. Les enzymes mises en jeu sont entre autres les condensines, participant à l'activation des topoisomérases II qui catalysent la séparation du double brin d'ADN et sont essentielles pour la condensation mitotique (Lee et al, 2007[37]). Comme nous l'avons décrit dans le chapitre « EBV et la condensation prématurée de la chromatine », la PCC a été d'abord décrite dans les cellules infectées par les virus de la famille *herpesviridae* et surtout étudiée dans le cas du virus d'Epstein-Barr. Pour se répliquer dans la cellule infectée, ce virus utilise une kinase spécifique : EBV BGLF4 kinase (conservée dans tous les herpesvirus) pour induire les événements « mitose-like » (Lee

et al, 2007[37]). Lors d'un cycle cellulaire normal, la condensation de la chromatine a lieu pendant la phase S de l'interphase, au cours de laquelle le matériel chromosomique (pour l'instant sous forme de chromatine) est doublé par réplication. La PCC est observée, quand les changements nucléaires de la cellule ne sont pas adaptés à la phase cellulaire morphologique dans laquelle elle se trouve, ce qui indiquerait une induction exogène de la réplication du matériel génétique ou une mitose provoquée. . La PCC peut être observée suite à une irradiation, ou en fin de vie (pré-mortem) ce qui suggère qu'elle a lieu dans les cellules en détresse, condamnées à mourir. Au cours de la LPLB, il a été observé que la condensation de la chromatine a lieu dans les cellules en phase G1 (et parfois G2) mais pas du tout en phase S (Mossafa et al, 1996[49]). La PCC est souvent associée à la présence du bras long du chromosome 3 supplémentaire +i(3)(q10), et/ou à une trisomie 3 complète (Mossafa et al 1996[49], 1999[50] et 2004[51]).

○ Instabilité chromosomique

Les cellules B des patients LPLB montrent une grande instabilité chromosomique 20 patients (74% des patients testés). C'est une instabilité assez polymorphe (plusieurs anomalies chromosomiques sont trouvées). Ce type d'instabilité est également observé chez les patients infectés par le HIV. Dans notre série elle a été observée pour 20 patients / 29.

• Gènes des chaînes lourdes des Ig

Pour déterminer si les lymphocytes observés dans LPLB représentent une expansion cellulaire monoclonale, biclonale, ou polyclonale, l'étude du réarrangement des gènes des Ig est indispensable. Durant la maturation des lymphocytes B, les gènes des Ig subissent un processus complexe de réarrangement afin de diversifier les séquences codant pour les anticorps. Ainsi les lymphocytes polyclonaux affichent un réarrangement polyclonal des chaînes lourdes des Ig (IgH), alors que les cellules B néoplasiques dérivent d'un seul clone. Toutes les LPLB sont polyclonales (Troussard et al, 2009[66]) avec présence de réarrangements des gènes des Ig. Selon Roussel et al, 2004[57], les études des séquences des gènes des chaînes lourdes des Ig montrent la présence de mutations sans évidence de sélection antigénique.

Normalement les cellules B mémoire possèdent des récepteurs antigéniques de forte affinité, résultat de nombreuses mutations somatiques du gène IgV entre autres. Chez les patients avec LPLB, ces mutations sont présentes, mais leur nombre est bien plus bas qu'attendu, donc il n'est pas évident que ces lymphocytes aient subi une stimulation antigénique (Troussard et al, 2009[66]).

- Réarrangements de BCL-2/ IGH

Selon Roussel et al, 2004[57] les réarrangements BCL-2/IGH sont multiples, intéressant les point de cassure MBR et mcr, s'associant à une expression normale de la protéine bcl-2 (anti-apoptotique) mais aussi à une expression élevée de bcl-X_L (protéine pro-apoptotique).

En ce qui concerne les réarrangements BCL-2/IGH, ils sont plus nombreux que dans la population saine, mais l'accumulation de lymphocytes B ne semble pas être liée à une surexpression de la protéine bcl-2 puisque son taux est normal comparé à la population témoin (Lancry et al, 2001[33]). Ces réarrangements sont présents dans la population saine, chez environ 50% personnes testées, et le nombre de translocations semble augmenter avec l'âge et une consommation intensive du tabac (Troussard et al, 2009[66]).

L'étude de Feugier et al, 2003[18], a montré, que les lymphocytes B ne montraient pas de tendance à proliférer (peu de cellules en phase S ou G2), de plus les réarrangements Bcl-2/IGH et une hyper expression de protéine bcl-X (Bcl-2-associated X protein, ou Bax est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2) (Lancry et al, 2001[33]) peuvent suggérer un défaut de l'apoptose. L'accumulation des lymphocytes B pourrait alors être expliquée par défaut de migration et un défaut d'apoptose, et la splénomégalie pourrait être expliquée par l'origine splénique des ces cellules. Cependant, dans certaines études, il n'a pas été observé de surexpression de protéine Bcl-2 dans la LPLB. Dans d'autres pathologies malignes sa surexpression est associée à une progression agressive de la pathologie, une résistance à la chimiothérapie, et une moindre survie. Les cellules B polyclonales sont résistantes à la signalisation Fas (pro-apoptotique) alors qu'elles expriment fortement les récepteurs Fas. Contrairement aux cellules B normales, dans les cellules de LPLB on observe les défauts de la voie de survie CD40 dépendante. Leur accumulation pourrait être le résultat des signaux conflictuels entre CD40 et Fas. Au cours des LPLB, il existe un conflit entre les signaux de CD40 et Fas (mort cellulaire programmée) entraînant un défaut fonctionnel.

Les cellules B chez nos patients semblent s'accumuler plutôt que proliférer de façon excessive. L'accumulation des lymphocytes B binucléés dans le sang périphérique pourrait être la conséquence d'un défaut d'apoptose et/ou d'une croissance cellulaire incontrôlée.

Notons que cette accumulation qui peut résulter de la survie prolongée de la population cellulaire concernée, augmente à son tour le risque de mutations cumulées (Lancry et al, 2001[33]). L'accumulation résulte également du caractère même de ces cellules B mémoire. Le but des cellules B mémoire est de procurer à l'individu une protection de longue durée

contre l'antigène que leur est spécifique (Tangye et al, 2009[65]). Si elles expriment la protéine bcl-2, qui leur permet d'échapper à l'apoptose, elles protègent leur rôle qui consiste à véhiculer une information délivrée au moment de la rencontre avec l'antigène concerné. Le pic de fréquence de ces cellules est ainsi situé à 4 semaines après l'immunisation. Après, leur taux décroît rapidement, mais elles peuvent persister à des taux indétectables durant la vie de leur hôte. Et selon les études récentes une exposition répétée à l'antigène n'est pas nécessaire à cette survie prolongée. Il existe donc les mécanismes qui permettent à certaines cellules d'échapper à l'apoptose de façon naturelle (Tangye et al, 2009[65]). Les cellules dans la LPLB pourraient utiliser ce mécanisme et ainsi persister en grand nombre.

7. Cas familial

Dans le cas particulier de la mère et fille présentant la LPLB

On peut constater que :

- l'hémoglobine, le pourcentage des lymphocytes binucléés, de CD19+ et CD27+ sont très semblables, témoignant de la même population lymphocytaire B, avec les mêmes proportions dans les deux cas
- Le nombre absolu des leucocytes, lymphocytes, les valeurs des IgM sériques sont plus élevés chez la mère, qui présente également une splénomégalie. La raison de ces différences est peut être expliquée par l'âge (chez pratiquement tous les patients de notre série, la valeur des IgM augmente en fonction du temps), soit/et dans le nombre de paquets/années, la mère en a cumulé plus de 20, alors que la fille n'en est qu'à 4.

Il semble curieux pourquoi que chez la fille on n'observe pas des réarrangements bcl-2/IgH, alors qu'ils sont typiques de la LPLB, et sa mère les présente.

Ces réarrangements, qui dans le cas du lymphome folliculaire (LF) ont pour l'effet de mettre le gène promoteur des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines devant le gène codant pour la protéine bcl-2 (à fonction anti-apoptotique) et ainsi augmentant son expression, ne semblent pas avoir les mêmes effets dans la LPLB.

L'expression de la protéine bcl-2 n'est pas augmentée dans les cellules LPLB : selon Lancry et al, 2001[33], Roussel et al, 2004[57], même si dans LPLB les réarrangements bcl-2/IGH sont multiples, intéressant les point de cassure MBR et mcr, ils ne s'associent pas à une expression augmentée de la protéine bcl-2 (alors que dans les cas de LLC, ou de LF, cette protéine est surexprimée).

Selon les mêmes auteurs, la fréquence des réarrangements des patients LPLB est intermédiaire entre celles de la population saine, et des patients souffrant de LF.

Lancry et al, 2001[33], rapportent par ailleurs, que dans l'ensemble de la population, les réarrangements bcl-2/IGH sont 13 fois plus fréquents chez les gens âgés de 60-80 ans que chez les jeunes de 0-20 ans. Donc les résultats chez nos deux patientes corroborent l'augmentation de la fréquence de ces réarrangements avec l'âge. Par contre, Summers et al, 2001[64], en étudiant une population saine de 481 personnes, rapportent 23% de réarrangements, mais que leur incidence est indépendante de l'âge.

Par ailleurs, selon Lancry et al, 2001[33], la fréquence des réarrangements Bcl-2/IGH est 4 fois plus élevée chez les fumeurs que chez les non fumeurs. Ainsi, la fille a une consommation du tabac cumulée bien moins importante que la mère et ce fait pourrait expliquer la différence entre les deux patientes.

Un autre cas familial est décrit par Himmelmann et al, 2001[29], une patiente LPLB, avec antigène HLA-DR7 et une splénomégalie, faisant partie d'une fratrie de 4. Ils étaient tous fumeurs, porteurs d'antigène HLA-DR7. Après l'étude de la fratrie, il s'est avéré qu'un frère a présenté une lymphocytose polyclonale B pendant 12 ans, qui s'est estompée spontanément deux ans après l'arrêt du tabac. Son compte lymphocytaire était donc normal, cependant il y avait des lymphocytes binucléés au frottis sanguin, une splénomégalie et des IgM augmentées.

Les deux autres frères ne présentaient aucune anomalie semblable, malgré une forte consommation du tabac et l'antigène HLA-DR7. Toute la fratrie présentait le même profil sérotypique pour EBV, à savoir une infection ancienne.

Ce cas confirme la prédisposition familiale, mais montre que le tabac, EBV et HLA-DR7 ne sont que les facteurs prédisposant qui même mis ensemble dans une même famille ne sont pas suffisants pour développer une LPLB.

Il montre également le caractère révélateur du tabac, qui dans le cas du frère atteint stimulait une lymphocytose. Cependant 3 ans après l'arrêt, les symptômes autres que le compte lymphocytaire élevé, ont persisté et suggérant, que le tabac n'était pas une cause, mais facteur exacerbant.

La fille de la patiente dans notre série a une histoire du tabac récente, et pourtant la LPLB est déjà bien présente. Elle fume moins que sa mère, ou du moins depuis moins longtemps, et sa lymphocytose bien que gardant les mêmes proportions que chez la mère est inférieure en valeur absolue.

Cytogénétique

Au niveau de la cytogénétique, on retrouve chez la fille l'isochromosome 3 « +i(3)(q10) », et chez la mère des cellules avec « +i(3)(q10) » et des cellules avec trisomie 3. Les deux anomalies sont typiques de la LPLB, mais dans le cas familial, on pourrait s'attendre à ce que les anomalies génétiques, bien qu'acquises soient les mêmes. Cette différence suggère encore une fois, que l'anomalie étudiée, à savoir, présence du matériel supplémentaire venant du chromosome 3 est une conséquence et non pas la cause de la LPLB, développée au cours de l'évolution de la LPLB.

8. Comparaison avec le groupe où le diagnostic de la LPLB a été écarté

Le groupe non LPLB résulte d'un recrutement où la LPLB a été fortement suspectée d'une part par la présence des lymphocytes binucléés au frottis sanguin, et d'autre part par la présence d'un tableau clinique particulier (âge typique, sexe préférentiellement féminin, forte intoxication tabagique, terrain personnel et familial avec des affections auto-immunes, problèmes de nature psychologique...)

Le diagnostic a été écarté car le tableau ne comportait pas l'ensemble des caractéristiques prédéfinies. Les arguments qui ont permis d'écarter la LPLB sont :

- Présence des lymphocytes binucléés

Dans la cohorte des patients avec la LPLB avérée, le pourcentage moyen des lymphocytes binucléés est de 4%. Rares sont les patients qui présentent un pourcentage inférieur à 2% (4 patients), et 17 patients présentent un pourcentage supérieur ou égal à 5%. Parmi les patients sans LPBL, tous les patients sauf une (patiente avec LZM) présentent un pourcentage des lymphocytes binucléés inférieur ou égal à 1%. Dans la LPBL, les cellules binucléées sont probablement assez facilement observables.

- Les IgM

L'augmentation des IgM dans la LPLB est quasi constante, et elle est marquée. En effet, la moyenne est de 6,7g/L et la médiane est de 6g/L. 27 patients sur 30 testés présentent une valeur supérieure à 3g/L.

Dans la série où le diagnostic a été infirmé, une seule patiente (LZM) présente des IgM à 3,23g/L, et il s'agit d'une Ig monoclonale. Le reste de patients présente des résultats dans les VR : 7 patients sur 9 restants, soit présentent une augmentation très discrète, restant toujours inférieure à 3g/L pour les deux autres patients.

L'absence de l'augmentation ou une augmentation discrète des IgM est ainsi un fort argument infirmant le diagnostic de la LPLB.

- Polyclonalité des lymphocytes B

Tous les patients LPLB présentent une polyclonalité des lymphocytes B, avec une répartition des chaînes légères semblable à la population générale (κ 2/3, λ 1/3).

Dans le groupe des patients non LPLB, la patiente avec le LZM présentait une monoclonalité typique pour cette affection. Pour le diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs malins, c'est un bon argument discriminant.

Pour le reste des patients, la polyclonalité était de règle.

- Profil CMF

Le profil rencontré dans la LPLB n'est reproduit chez aucun des patients du groupe non LPLB. Les CD discordants, qui sont donc discriminatifs - dans notre série - de la LPLB sont les suivants : CD23-, CD27+, CD38-. Avec cette combinaison, nous arrivons à trancher dans tous les 10 cas des patients non LPLB. Ce groupe présente CD23+(3/5 patients testés), CD27-(5/6 patients testés), CD38+(3/6 patients testés).

La CMF est donc une technique discriminante pour la reconnaissance ou l'élimination d'une LPLB.

La LPLB reste une anomalie encore mal comprise. Notre série est une des plus grandes explorée de façon homogène. Nos données confrontées à celles de la littérature ont permis de progresser dans la compréhension de cette entité. Les lymphocytes B de la LPLB, probablement originaires de la zone marginale de la rate, semblent aboutir à une lymphocytose par accumulation. Notre étude semble indiquer que la LPLB présente un tableau biologique, mais également un tableau clinique particulier se rapprochant de celui observé lors de la fibromyalgie. Nous confirmons en les précisant les critères précédemment observés : majorité féminine, tabagisme important (≥ 15 PA), peut-être en rapport avec un âge stéréotypé de diagnostic (40^{aine}), anomalie morphologique facilement détectable sur le frottis sanguin, hyper IgM, profil immunophénotypique particulier B polyclonal CD5-, CD10-, CD23-, CD27+, IgM^{high} IgD^{low} avec surexpression des TLR 7, 9, 10, anomalie cytogénétique (iso3q) bien visible par FISH. Il pourrait s'agir de la première anomalie caractérisée survenant à partir du compartiment récemment individualisé des cellules B de la zone marginale de la rate. Nous avons également remarqué des points méritant l'attention lors de l'interprétation de certaines analyses biologiques comme la vitesse de sédimentation augmentée, ou la recherche des anticorps anti-cardiolipide (aCL), en rapport avec une interférence de l'IgM polyclonale. L'évolution des patients est bénigne, le traitement inutile voire nocif, cependant un suivi semble nécessaire dans la mesure où la prévalence des pathologies lymphomateuses reste supérieure à celle qui est rencontrée dans la population générale.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Amouroux I, Mossafa H, Gentilhomme O, Girot R, Flandrin G, Troussard X. Chronic lymphocytic leukaemia with binucleated lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 1997;27(5-6):533-7.
2. Berthelot JM, Bataille R, Maugars Y, Prost A. Rheumatoid arthritis as a bone marrow disorder. *Semin Arthritis Rheum*. 1996; 26(2):505-14.
3. Callet-Bauchu E, Gazzo S, Poncet C, Pagès J, Morel D, Alliot C, Coiffier B, Coeur P, Salles G, Felman P. Distinct chromosome 3 abnormalities in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;26(3):221-8
4. Callet-Bauchu E, Renard N, Gazzo S, Poncet C, Morel D, Pagès J, Salles G, Coeur P, Felman P. Distribution of the cytogenetic abnormality +i(3)(q10) in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: a FICTION study in three cases. *Br J Haematol*. 1997;99(3):531-6.
5. Carr R, Fishlock K, Matutes E. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis in identical twins. *Br J Haematol*. 1997;96(2):272-4.
6. Carstairs KC, Francombe WH, Scott JG, Gelfand EW. Persistent polyclonal lymphocytosis of B lymphocytes, induced by cigarette smoking? *Lancet*. 1985;1(8437):1094.
7. Casassus P, Lortholary P, Komarover H, Lejeune F, Hors J. Cigarette smoking-related persistent polyclonal B lymphocytosis. A premalignant state. *Arch Pathol Lab Med*. 1987;111(11):1081.
8. Chow KC, Nacilla JQ, Witzig TE, Li CY. Is persistent polyclonal B lymphocytosis caused by Epstein-Barr virus? A study with polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Am J Hematol*. 1992; 41(4):270-5.

9. Cornet E, Lesesve JF, Mossafa H, Sébahoun G, Levy V, Davi F, Troussard X; Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Long-term follow-up of 111 patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Leukemia*. 2009;23(2):419-22.
10. de Haan LD, Pouwels JG. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: a case report. *Ann Hematol*. 2006 ; 85(12):893-6.
11. Del Giudice H, Pileri S, Rossi M, Sabattini E, Campidelli C, Della Starza I, De Propriis M, Mancini F, Perrone M, Gesuiti P, Armiento D, Quattrocchi L, Tafuri A, Amendola A, Mauro F, Guarini A, Foà R. Histopathological and molecular features of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPLB) with progressive splenomegaly. *Br J Haematol*. 2009 ; 144 : 726-731
12. Delage R, Jacques L, Massinga-Loembe M, Poulin J, Bilodeau D, Mignault C, Leblond PF, Darveau A. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis: further evidence for a genetic disorder associated with B-cell abnormalities. *Br J Haematol*. 2001;114(3):666-70. "
13. Delage R, Roy J, Jacques L, Bernier V, Delâge JM, Darveau A. Multiple bcl-2/Ig gene rearrangements in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 1997 Jun;97(3):589-95.
14. El Maghraoui A. La fibromyalgie. http://www.rhumato.info/la_fibromyalgie.htm, 2003
15. Espinet B, Florensa L, Solé F, Lloveras E, Abella E, Besses C, Sans-Sabrafen J, Woessner S. Isochromosome +i(3)(q10) in a new case of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) *Eur J Haematol*. 2000 May;64(5):344-6
16. Fecteau JF, Néron S. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol*. 2003;171(9):4621-9.

17. Fecteau JF, Roy A, Néron S. Peripheral blood CD27(+) IgG(+) B cells rapidly proliferate and differentiate into immunoglobulin-secreting cells after exposure to low CD154 interaction. *Immunology*. 2008; 128(1): e353 - e365
18. Feugier P, De March AK, Lesesve JF, Monhoven N, Dorvaux V, Braun F, Grégoire MJ, Jonveaux P, Lederlin P, Béné MC, Labouyrie E. Intravascular bone marrow accumulation in persistent polyclonal lymphocytosis: a misleading feature for B-cell neoplasm. *Mod Pathol*. 2004 Sep;17(9):1087-96.
19. Fujiwara M, Shimozone H, Ono H, Fujita N, Nishimura S, Ueda K, Kaneko M. Polyclonal proliferation of lymphocytes containing the epstein-barr virus genome in a patient dying of myocarditis in chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 ; 25(5):428.
20. Gomez P, Matutes E, Sánchez J, Garcia JM, Román J, Gruszka-Westwood A, Torres A. An unusual form of persistent polyclonal B lymphocytosis in an infant. *Br J Haematol*. 2000 ;110(2):430-3.
21. Gordon DS, Jones BM, Browning SW, Spira TJ, Lawrence DN. Persistent polyclonal lymphocytosis of B lymphocytes. *N Engl J Med*. 1982; 307(4):232-6.
22. Granados E, Llamas P, Pinilla I, Tomás JF, Font P, Cámara R, Olmeda F, Arranz R, Fernández-Rañada JM. Persistent polyclonal B lymphocytosis with multiple bcl-2/IgH rearrangements: a benign disorder. *Haematologica*. 1998 ; 83(4):369-75.
23. Granel B, Disdier P, Serratrice J, Hubert A.M, Alessi M.C, Cannoni H, Mazodier K, de Roux-Serratrice C, Genty I, Pache X, Camoin L, Bouabdallah R, Sanmarco M, Weiller P.J. Hyperlymphocytose B polyclonale des tabagiques et anticorps antiphospholipides : à propos de trois cas. *Rev. Méd. Interne*. 2001 ; 21 : 483
24. Greifenegger N, Jäger M, Kunz-Schughart LA, Wolf H, Schwarzmann F. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J Virol*. 1998 ; 72(11):9323-8.

25. Hafraoui K, Moutschen M, Smet J, Mascart F, Schaaf-Lafontaine N, Fillet G. Selective defect of anti-pneumococcal IgG in a patient with persistent polyclonal B cell lymphocytosis. *Eur J Intern Med.* 2009 ; 20(3):e62-5.
26. Häuser W, Eich W, Herrmann M, Nutzinger DO, Schiltenswolf M, Henningsen P. Fibromyalgia syndrome: classification, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2009 ;106(23):383-91
27. Heselmeyer K, Schröck E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 ; 93(1):479-84.
28. Himmelmann A, Gautschi O, Nawrath M, Bolliger U, Fehr J, Stahel RA. Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis is an expansion of functional IgD(+)CD27(+) memory B cells. *Br J Haematol.* 2001;114:400-405
29. Himmelmann A, Rüegg R, Fehr J. Familial persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Leuk Lymphoma.* 2001;41(1-2):157-60.
30. Jacquot S, Boyer O Hétérogénéité et fonctions des lymphocytes B chez l'homme. Heterogeneity and function of human B lymphocytes. *Med Sci.* 2006 ; 22(12):1075-80
31. Jäger M, Prang N, Mitterer M, Larcher C, Huemer HP, Reischl U, Wolf H, Schwarzmann F. Pathogenesis of chronic Epstein-Barr virus infection: detection of a virus strain with a high rate of lytic replication. *Br J Haematol.* 1996 ; 95(4):626-36.
32. Jaubert D, de Jaureguiberry JP, Marlier S. Role of Epstein-Barr virus infection in polyclonal binucleated B-cell lymphocytosis *Presse Med.* 1997 ; 26(32):1531.

33. Lancry L, Roulland S, Roué G, Mossafa H, Salaün V, Chèze S, Gauduchon P, Hardouin A, Sola B, Troussard X No BCL-2 protein over expression but BCL-2/IgH rearrangements in B cells of patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Hematol J.* 2001; 2(4):228-33.
34. Larcher C, Bernhard D, Schaadt E, Adler B, Ausserlechner MJ, Mitterer M, Huemer HP. Functional analysis of the mutated Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1(69del): implications for a new role of naturally occurring LMP1 variants. *Haematologica.* 2003 ; 88(12):1324-35.
35. Larcher C, Fend F, Mitterer M, Prang N, Schwarzmair F, Huemer HP. Role of Epstein-Barr virus and soluble CD21 in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 1995 ; 90(3):532-40.
36. Lawrie CH, Shilling R, Troussard X, Cattani H, Mossafa H, Pezzella F, Boulton J, Wainscoat JS, Hatton CS. Expression profiling of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis suggests constitutive expression of the AP-1 transcription complex and downregulation of Fas-apoptotic and TGFbeta signalling pathways. *Leukemia.* 2009 ; 23(3):581-3.
37. Lee CP, Chen JY, Wang JT, Kimura K, Takemoto A, Lu CC, Chen MR. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II. *J Virol.* 2007 ; 81(10):5166-80.
38. Lees O, Béné MC, et le GEIL. Immunophénotypage des leucocytes. Biotem éditions 1998
39. Lévesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK, Haylock DN, Simmons PJ. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 2001 ; 98(5):1289-97.

40. Levinson AI, Tar L, Carafa C, Haidar M. *Staphylococcus aureus* Cowan I. Potent stimulus of immunoglobulin M rheumatoid factor production. *J Clin Invest.* 1986; 78(3):612-7.
41. Lesesve JF, Cornet E, Mossafa H, Troussard X. Lymphocytose B polyclonale à lymphocytes binucléés. *Rev Prat.* 2009; 59(1):32.
42. Lim KK, Sharif M. Interference by IgM rheumatoid factor on ELISA for antibodies to mycobacterial 65 kDa heat shock protein in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 1996; 35(3):300-1.
43. Lima FP, Bousquet M, Gomez-Bouchet A, de Paiva GR, Amstalden EM, Soares FA, Dastugue N, Vassallo J, Brousset P. Primary diffuse large B-cell lymphoma of bone displays preferential rearrangements of the c-MYC or BCL2 gene. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(5):723-6.
44. Lin RY. Persistent polyclonal B lymphocytosis with low IgM. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2004; 3(1)
45. Loembé MM, Lamoureux J, Deslauriers N, Darveau A, Delage R. Lack of CD40-dependent B-cell proliferation in B lymphocytes isolated from patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 2001; 113(3):699-705.
46. Loembé MM, Néron S, Delage R, Darveau A. Analysis of expressed V(H) genes in persistent polyclonal B cell lymphocytosis reveals absence of selection in CD27+IgM+IgD+ memory B cells. *Eur J Immunol.* 2002; 32(12):3678-88.
47. Marti GE, Ryan ET, Papadopoulos NM, Filling-Katz M, Barton N, Fleischer TA, Rick M, Gralnick HR. Polyclonal B-cell lymphocytosis and hypergammaglobulinemia in patients with Gaucher disease. *Am J Hematol.* 1988; 29(4):189-94.

48. Mitterer M, Pescosta N, Fend F, Larcher C, Prang N, Schwarzmann F, Coser P, Huemer HP. Chronic active Epstein-Barr virus disease in a case of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol.* 1995; 90(3):526-31.
49. Mossafa H, Troussard X, Valensi F, Schillinger F, Maynadie M, Bulliard G, MacIntyre E, Flandrin G. Isochromosome i(3q) and premature chromosome condensation are recurrent findings in chronic B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes. *Leukemia Lymphoma.* 1996; 20: 267-273.
50. Mossafa H, Malaure H, Maynadie M, et al, et le groupe français d'hématologie cellulaire (GFHC). Persistent polyclonal B lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a study of 25 cases. *Br J Haematol* 1999; 104 : 486-93.
51. Mossafa H, Tapia S, Flandrin G, Troussard X, et le Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Chromosomal instability and ATR amplification gene in patients with persistent and polyclonal B-Cell lymphocytoseis (PPBL). *Leuk. Lymphoma* 2004; 45/7 : 1401-1406
52. Nikiforova MN, Hsi ED, Braziel RM, Gulley ML. Detection of Clonal IGH Gene Rearrangements: Summary of Molecular Oncology Surveys of the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131:185-189
53. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, Oshiro A, Suzuki R, Kagami Y, Morishima Y, Takeuchi K, Izumo T, Mori S, Ohshima K, Suzumiya J, Nakamura N, Abe M, Ichimura K, Sato Y, Yoshino T, Naoe T, Shimoyama Y, Kamiya Y, Kinoshita T, Nakamura S. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res.* 2007;13(17):5124-32.
54. Perrault C, Boileau J, Gyger M, De Bellefeuille C, D'angelo G, Belanger R, Lacombe M, Lavalee R, Bonny Y, Paquin M, Brochu S. Chronic B-cell lymphocytosis. *European Journal of Haematology* 1989 ; 2 : 361-367.

55. Rodríguez JN, Diéguez JC, Martino ML, Prados D. Persistent polyclonal B lymphocytosis. *Am J Hematol*. 1996;51(3):246-7.
56. Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Boutonnat J. *La cytométrie en flux*. Lavoisier 2004
57. Roussel M, Mossafa H, Troussard X., GFHC. Lymphocytose polyclonale avec lymphocytes sanguins binucléés. *Hématol*. 2004;10:169-72
58. Roussel M, Roué G, Sola B, Mossafa H, Troussard X. Dysfunction of the Fas apoptotic signaling pathway in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Haematologica*. 2003; 88(2):239-40.
59. Roy-Taranger M, Mayaud G, Davydoff-Alibert S. Binuclear lymphocytes in the blood of individuals irradiated by a low dose. *Rev Fr Etud Clin Biol*. 1965;10(9):958-65.
60. Roszyk L, Faye B, Tournilhac O, Fogli A, Sapin V. Perturbation de la détermination immunoturbidimétrique de la ferritine et de la transferrine due à la présence d'une IgM monoclonale. *Ann Biol Clin*. 2007; 65 :659-62.
61. Schmidt-Hieber M, Burmeister T, Weinmann A, Nagorsen D, Hofmann WK, Thiel E, Schwartz S. Combined automated cell and flow cytometric analysis enables recognition of persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL), a study of 25 patients. *Ann Hematol* 2008; 87:829-836.
62. Shim YK, Vogt RF, Middleton D, Abbasi F, Slade B, Lee KY, Marti GE. Prevalence and natural history of monoclonal and polyclonal B-cell lymphocytosis in a residential adult population. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007; 72(5):344-53.
63. Smith L, Liu SJ, Goodrich L, Jacobson D, Degnin C, Bentley N, Carr A, Flaggs G, Keegan K, Hoekstra M, Thayer MJ. Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest. *Nat Genet*. 1998;19(1):39-46.

64. Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon J. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):420-4.
65. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol*. 2009;39(8):2065-75.
66. Troussard X, Cornet E, Lesesve JF, Kourel C, Mossafa H. Polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (PPBL). *Rev Prat*. 2009; 59(1):32
67. Troussard X, Mossafa H. Polyclonal B Lymphocytosis with Binucleated Lymphocytes (PPBL). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2004
68. Troussard X, Mossafa H, Flandrin G. Identity between hairy B-cell lymphoproliferative disorder and persistent polyclonal B lymphocytosis? *Blood*. 1997; 90(5):2110-3.
69. Troussard X, Mossafa H, Flandrin G Lymphocytose polyclonale avec lymphocytes sanguins binucléés Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Ann Biol Clin*. 2002;60(3):273-8
70. Troussard X, Mossafa H, Valensi F, Maynadie M, Schillinger F, Bulliard G, Malaure H, Flandrin G. Polyclonal lymphocytosis with binucleated lymphocytes. Morphological, immunological, cytogenetic and molecular analysis in 15 cases. *Presse Med*. 1997; 26(19):895-9.
71. van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuuring E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317

72. Vignes S, Oksenhendler E, Quint L, Daniel MT, Mariette X, Clauvel JP. Polyclonal B lymphocytosis and hyper-IgM: immunodeficiency and/or benign lymphoid proliferation associated with tobacco? *Rev Med Interne*. 2000; 21(3):236-41.
73. Vincenot-Blouin A, Timbely O, Abarah-Atassi W, Mossafa H, Allard C, Michel F, André-Kerneis E. Binucleated lymphocyte lymphocytosis. *Ann Biol Clin*. 2003; 61(4):454-7.
74. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004 ;104(12):3647-54.
75. Wilkinson LS, Tang A, Gjedsted A. Marked lymphocytosis suggesting chronic lymphocytic leukemia in three patients with hyposplenism. *Am J Med*. 1983; 75(6):1053-6.
76. Wolowiec D, Nowak J, Majewski M, Haus O, Duszenko E, Stella-Holowiecka B, Mika-Witkowska R, Makuch-Lasica H, Nowak G, Krawcewicz A, Kuliczkowski K, Warzocha K. High incidence of ancestral HLA haplotype 8.1 and monoclonal incomplete DH–JH immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis. *Ann Hematol*. 2008; 87:597-8.
77. Wong KF, So CC, Chan JCW, Kho BCS, Chan JKC. Gain of chromosome 3/3q in B-cell chronic lymphoproliferative disorder is associated with plasmacytoid differentiation with or without IgM overproduction. *Canc Genet Cytogenet* 2002 ; 136 : 82-5

Annexe 1. Les antigènes de différenciation étudiés par cytométrie en flux [38]

- CD 19 (Clone : J3-119 ; Distribution : Beckman ; Fluorochrome : FITC)

Glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines, exprimée précocement sur les cellules progénitrices hématopoïétiques humaines, persistant à la surface des lymphocytes B (jusqu'au stade plasmocytaire où il disparaît). On pense qu'il joue un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B indépendante de l'antigène.

- CD 5 (Clone : BL1a ; Distribution : Beckman; Fluorochrome : PE)

Il est exprimé par les cellules T (apparaissant précocement à la surface des précurseurs des lymphocytes T dans la moelle osseuse et persistant tout au long de leur maturation et activation) et par une sous-population de cellules B. Il est fortement exprimé par la plupart des cellules B des leucémies lymphoïdes chroniques. Une fraction de lymphocytes B issue du péritoine (appelés cellules B1) sont lymphocytes B CD 5+. Lymphocytes B CD 5+ semblent être mis en jeu dans la physiopathologie de certaines maladies auto-immunes. Ces cellules produisent des anticorps polyréactifs (IgM).

- CD 10 (Clone : ALB1; Distribution : Beckman; Fluorochrome : PE)

Endopeptidase neutre ou cALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen).

CD 10 est exprimé sur les précurseurs hématopoïétiques précoces, et persiste sur les cellules de la lignée B jusqu'à ce que les réarrangements des gènes d'immunoglobulines soient productifs. Il réapparaît sur les LB des centres germinatifs (également exprimé par les polynucléaires et certains tissus : tubules rénaux et entérocytes). Il est largement utilisé dans l'immunophénotypage des cellules leucémiques. Il semble participer dans la régulation de la maturation des lymphocytes B.

- CD 11c (Clone : BU15; Distribution : Beckman; Fluorochrome : PE)

Intégrin α^x , forme avec CD 18 la molécule p150/95. Exprimé par granulocytes, monocytes, macrophages, cellules dendritiques.

Présent lors de la leucémie à tricholeucocytes, LLC. Son expression est augmentée à la surface des lymphocytes activés. Intervient dans la mobilité cellulaire et dans la régulation des réactions inflammatoires.

- CD 20 (Clone : B-Ly1; Distribution : Dako; Fluorochrome : PE)

Protéine transmembranaire. CD 20 apparaît sur les cellules B à un stade intermédiaire de maturation dans la moelle osseuse et persiste jusqu'au stade plasmocytaire où il disparaît.

- CD 21

Glycoprotéine transmembranaire. Récepteur du complément 2, récepteur du virus d'Epstein Barr : EBV-R, contrôlant l'activation du complément, exprimé sur les lymphocytes B à un stade intermédiaire de maturation médullaire, persistant sur les lymphocytes B jusqu'à un stade immunoblastique, où il disparaît, sauf après activation par le virus d'Epstein Barr. Il participe à la régulation de l'activation et de la prolifération des lymphocytes B, il médie probablement l'adsorption d'EBV sur les cellules épithéliales l'exprimant.

- CD 22 (Clone : S-HCL-1; Distribution : Becton-Dickinson; Fluorochrome : FITC)

Glycoprotéine de la superfamille des immunoglobulines. Il apparaît précocement dans le cytoplasme des cellules B dans la moelle osseuse et est ensuite exprimé à leur surface le long de leurs stades de différenciation et de maturation. Son expression est perdue après activation des lymphocytes B. CD 22 paraît être un véritable antigène de différenciation B-restreint.

Il pourrait s'agir d'une molécule d'adhésion. Les lymphocytes CD22⁺ lient les cellules présentatrices d'antigène. CD22 pourrait ainsi être mis en jeu dans les interactions B-T.

- CD 23 (Clone : MHM6; Distribution : Becton-Dickinson; Fluorochrome : FITC)

Glycoprotéine transmembranaire. CD 23A et B sont exprimés sur les lymphocytes B. CD 23B est exprimé également par d'autres cellules. Sur les lymphocytes B, CD 23 apparaît à un stade tardif de maturation et disparaît sur les plasmocytes. Il semble jouer un rôle important de régulation dans la production des IgE, capte efficacement les complexes immuns contenant des IgE et intervient dans la présentation des antigènes par les lymphocytes B aux lymphocytes T.

- CD 24 (Clone : ALB9; Distribution : Beckman; Fluorochrome : PE)

Petite glycoprotéine de surface. CD 24 est exprimé précocement à un stade intermédiaire de maturation des lymphocytes B, et sur les cellules myéloïdes. Il persiste à la surface des lymphocytes B matures et des granulocytes, et peut être présent en petites quantités sur une sous-population de cellules T. Il est absent des plasmocytes. Aucune fonction n'est clairement

définie, mais il semblerait que le CD 24 pourrait être mis en jeu dans la prolifération des lymphocytes B et la production de peroxyde d'hydrogène par les polynucléaires.

- CD 25

Glycoprotéine transmembranaire. Chaîne alpha du récepteur à l'Il-2. CD 25 est exprimé sur des nombreuses cellules activées, incluant des lymphocytes T, lymphocytes B et les monocytes. Egalement rencontré sur des cellules T et B transformées, des sous-populations de lymphocytes B au repos, des thymocytes, des cellules myéloïdes...

- CD 27 (Clone : M-T271; Distribution : Dako; Fluorochrome : PE)

Membre de la famille du récepteur *Nerve growth factor*. Exprimé par les thymocytes médullaires, les lymphocytes T matures et activés, les cellules NK, une sous-population de lymphocytes B activés et des macrophages.

- CD 38 (Clone : LS198-4-3; Distribution : Dako; Fluorochrome : PE)

Glycoprotéine transmembranaire de type II. Fortement exprimé sur les thymocytes. Présent sur les lymphocytes T et B jeunes, les cellules NK, les lymphocytes T activés, les plasmocytes et les globules rouges. Absent des lymphocytes au repos.

- CD 43 (Clone : DF-T1; Distribution : Dako; Fluorochrome : FITC)

Glycoprotéine transmembranaire de type mucine. CD 43 est exprimé sur tous les leucocytes sanguins sauf les lymphocytes B au repos. Il pourrait agir comme une molécule anti-adhésion.

- CD 79b (Clone : CB3-1; Distribution : Beckman; Fluorochrome : PE)

CD 79 a été subdivisé en CD 79a et CD 79b, qui désignent les deux chaînes associées au BCR. Glycoprotéine transmembranaire, membre de la superfamille des immunoglobulines.

CD 79b est exprimé dans le cytoplasme des lymphocytes B à un stade très précoce de différenciation. Dans le cytoplasme le CD 79b semble être le marqueur de lignée B le plus précoce. Le complexe CD 79a-b apparaît à la surface des lymphocytes B dès que des immunoglobulines entières peuvent être synthétisées. Le complexe CD 79 est indispensable à l'expression membranaire des immunoglobulines de surface. Il persiste sur les lymphocytes B lors de leurs stades de maturation et de différenciation ultérieurs mais disparaît des plasmocytes. Le complexe CD 79 médie l'expression des IgM et IgD à la surface des lymphocytes B, et fait partie intégrante du complexe *B-cell receptor* (BcR). Pour être lié par

les anticorps, lymphocyte B doit être à des stades tardifs de la différenciation, quand il exprime le BcR à la membrane.

- FMC7 (Clone : FMC7; Distribution : Dako; Fluorochrome : FITC)

Situé sur le CD 20, sur les lymphocytes B matures.

- CD 95

Glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille du *Nerve Growth Factor*.

CD 95 est exprimé par une minorité de lymphocytes B et T et des cellules NK. Il est exprimé préférentiellement par les lymphocytes T mémoire CD 45 RO. La liaison de CD 95 à son ligand (*fas* ligand) entraîne l'induction de l'apoptose dans la cellule qui le porte. C'est un des mécanismes majeurs de régulation pour limiter les réactions inflammatoires et la prolifération lymphocytaire.

- CD 103

Intégrin α^E , c'est la chaîne alpha d'une intégrine, glycoprotéine transmembranaire.

Human mucosal lymphocyte antigen-1 : HML-1. Exprimé sur > 95% des lymphocytes intra-épithéliaux et sur environ 40% des lymphocytes T de la lamina propria de l'intestin, et d'autres sites muqueux.

- Chaînes légères kappa et lambda

Normalement chaque clone plasmocytaire synthétise une seule espèce de molécule d'immunoglobuline ayant soit des chaînes légères de type kappa, soit des chaînes légères de type lambda. Le rapport kappa/lambda dans le sérum est normalement situé autour de 2.

La prolifération pathologique d'un clone cellulaire conduit à l'augmentation de la synthèse de l'immunoglobuline sécrétée par ce clone (immunoglobuline monoclonale) ou de fragments d'immunoglobulines (chaînes légères libres) qui conduit à une modification du rapport kappa/lambda. Un rapport kappa/lambda situé en dehors du domaine de la normale indique l'existence d'une gammapathie monoclonale.

- IgD, IgG, IgM (Clones : Rabbit F(ab')₂; Distribution : Dako; Fluorochrome : FITC)

Immunoglobulines de surface.

- CD 30

Glycoprotéine transmembranaire de la famille du récepteur du TNF (TGF-R).

Il est présent physiologiquement sur les lymphocytes B, T et NK activés, et sur les sous-populations de monocytes et cellules dendritiques. Présent sur les cellules de Reed-Sternberg, dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules, les lymphomes T périphériques ainsi que sur les cellules infectées par des virus tels qu'HIV, HTLV-1 ou EBV. Physiologiquement il semble être impliqué dans la sélection thymique négative et dans la mort cellulaire programmée consécutive à l'activation du TCR.

- CD 34

Glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des sialomucines (mucine riche en acide sialique). CD 34 est exprimé sur les progéniteurs hématopoïétiques médullaires indifférenciés, analogues aux cellules souches. Il est aussi présent sur les cellules endothéliales et les fibroblastes. Les anticorps CD 34 sont utilisés pour isoler des progéniteurs du sang périphérique ou du sang du cordon.

- CD 40

Glycoprotéine de surface, de la famille de récepteur du *Nerve Growth Factor*. Il est présent sur les lymphocytes B, les macrophages, et certaines cellules épithéliales, endothéliales de dendritiques. Il est exprimé précocement au cours de la différenciation des lymphocytes B et persiste jusqu'au stade plasmocytaire où il disparaît. Il permet de bloquer l'apoptose des lymphocytes B activés leur permettant d'évoluer vers les stades de différenciation ultérieurs de plasmocyte ou de lymphocyte B mémoire. Il apparaît important également pour la commutation des lymphocytes B lors de la liaison avec une cellule dendritique folliculaire.

- CD 122

Glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs de cytokines hématopoïétiques (à l'interleukine 2). Il est exprimé sur les cellules activées, comprenant les lymphocytes T, B et les monocytes. Il est présent sur les cellules NK et des sous-populations de lymphocytes T et de monocytes au repos. Rôle dans la transduction du signal.

- CD 138

Protéoglycane. Il est exprimé par les cellules B immatures, les plasmocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales des bourgeons capillaires. Il se fixe à la matrice extracellulaire et retient les facteurs de croissance. Il est impliqué dans l'activité des facteurs de croissance, la mobilité cellulaire et le contrôle de la morphologie des cellules.

- CD 154

Glycoprotéine de la Superfamille du TNF. Il lie le CD 40. Il est exprimé sur les lymphocytes T activés surtout CD 4+, les mastocytes, et les basophiles. Il est indispensable à la formation de centres germinatifs et à la commutation de classe des immunoglobulines, par l'intermédiaire de sa liaison à CD 4 exprimé sur les lymphocytes T.

- TLR

Protéines transmembranaires de type I. Récepteurs d'antigènes faisant partie de l'immunité innée. Voie d'activation de la réponse immunologique innée, impliqués également dans certaines maladies auto-immunes (maladie de Crohn...).

Annexe 2. Répartition de différents profils CMF au sein de la cohorte :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CD19	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	<u>14</u>	+	+	+	+
CD5	+	+	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
CD10	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
CD11c	ND	-	ND	-	+	ND	+	-	+	ND	-	-	ND	ND	+
CD20	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	<u>13</u>	+	+	+	+
CD22	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	<u>12</u>	+	+	+	+
CD23	-	-	ND	-	+	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
CD24	ND	+	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	12	+	ND	ND	+
CD25	ND	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	ND	ND	-
CD27	ND	+	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	9	+	ND	ND	+
CD38	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	13	-	-	-	-
CD43	-	-	ND	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
CD79b	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	11	+	+	+	+
FMC7	+	+	ND	+	+	ND	+	+	+	ND	9	+	+	+	+
CD95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
CD103	ND	-	ND	ND	+	ND	-	-	-	ND	-	-	ND	ND	-
CD30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
CD34	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
CD40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
CD122	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
CD138	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
CD154	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND
TLR 7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	ND	ND	ND	0,6	ND	ND	ND
TLR 9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,6	ND	ND	ND	0,8	ND	ND	ND
TLR 10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,2	ND	ND	ND	0,6	ND	ND	ND

	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD11c	+	ND	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
CD20	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD23	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
CD24	+	+	ND	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD27	+	+	ND	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD79b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FMC7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CD103	-	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
CD34	ND	-	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-
CD40	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND
CD122	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-
CD138	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND
CD154	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	-	ND
TLR 7	ND	1,46	ND	ND	ND	9,7	1,98	ND	1,3	ND	2,3	2,4	ND	12	ND	ND	3,06	1,39
TLR 9	ND	1,6	ND	ND	ND	GS	GS	ND	2,12	ND	1,7	1,94	ND	6	ND	ND	SG	SG
TLR 10	ND	0	ND	ND	ND	8,8	2,34	ND	2,1	ND	2,04	0,84	ND	6	ND	ND	3,37	4,01

Tableau X: Récapitulatif des différents phénotypes CMF observés dans notre cohorte.

Annexe 3. Les caryotypes des patients étudiés

N°	Caryotype	N°	Caryotype	N°	Caryotype
1	46,XX	12	47,XX,+i(3)(q10)[7]/ 46,XX,add(3)(p24)[2]/ 46,XX,...[cp4]/ 46,XX[22]	23	46-48,XX,der(3)t(3:?) (q29:?) [cp3]/ 46,XX,...[cp8]/46,XX[20]
2	46,XX[52]/ 46,XX,inv(6)(p24q15)[1]	13	ND	24	47,XY,i(3)(q10)[cp3]/ 49,XY,+Y,+i(3)(q10),+18[1]/ 47,XY,+Y[2]/ 46,XY[34]
3	46,XX [28]	14	46,XX, der (3)t(3:?) (q29:?) plus autres anomalies (instabilité chromosomique)	25	46,XX[50]
4	47,XX,+i(3q)(q10)[8]/ 46,XX,add(20)(p13)[2]/ 46,XX[10]	15	46,XX[48]/ 46,XX,dup(3)(q12q29)[1]/ 46,XX,add(3)(p23)[1]	26	46,XX[49]/ 46,XX,del(13)(q31)[1]
5	ND	16	47,XY,+i(3)(q10)[4]/ 46,XY[29]	27	46,XX,-21[5]/ 46,XX,+6,-21[1]/ 47,XX,i(3)(q10)[3]/ 46,XX[21]
6	ND	17	46,XX [50]	28	46,XX[50]
7	46,XX [31]	18	46,XX[22]/ 46,XX,del(6)?(q16q24)[3]	29	46,XY[49]/ 48,XY,+3,+18[1]
8	46,XX,der(3)t(3:?) (p21:?) [cp4]/ 46,XX[52]	19	46,XX[46]/ 44-47,XX[3]/ 46,XX,del(6)(q14)[1]	30	46,XX[50]
9	46,XX[23]/ 46,XX,del(6)(q12q16)[1]/ 48,XX,+X,+X[1]/ 47,XX,+mar[cp2]/ 46,XX,add(14)(q32),18,+mar[1]/ 45,X,-X,-13,-16,+2mar[1]/ 50,XX,+3,+4,+8,+8[1]	20	46,XX,+i(3)(q10)[7]/ 46,XX[12]/ 46,Xxder(1)t(1:?) (q44:?), der(5)t(5:?) (p12:?) [1]	31	47,XY,+i(3)(q10)[2]/ 46,X,-Y,+del(3)(p10)[3]/ 46,XY,add(13)(p11)[2]/ 46,XY,der(6)(q13q16),der(8)t(8:?) (p11:?) [2]/ 46,XY,add(15)(q26)[1]/ 46,XY,add(17)(q25)[1]/ 46,XY,add(9)(q34)[1]/ 46,XY[3]
10	46,XX	21	46,XX, inv(9)(p11q12)[18]/id, +3 [5]	32	46,XX[50]
11	46,XX [59], instabilité chromosomique	22	46,XX,der(1)t(1:?) (q31:?) [cp2]/ 46,XX[50]	33	46,XX[41]/ 45-46,XX[cp9]

Tableau XI. Récapitulatif des caryotypes illustrant une instabilité chromosomique

Annexe 4. Letter to the Editor

IgM interference in determination of antiphospholipid antibodies and erythrocyte sedimentation rate in persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes

Jean François Lesesve¹, Jean Devignes¹, Joanna Sokolowska¹, Isabelle Aimone-Gastin², Christine Jacob², Denis Wahl³, Marielle Sanmarco⁴, Xavier Troussard⁵ and Thomas Lecompte¹

1. Hématologie Biologique, CHU de Nancy, 54511, Vandœuvre-Les-Nancy Cedex, France,

2. Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Nancy.

3. Médecine vasculaire, CHU Nancy

4. Laboratoire d'Immunologie, Hôpital de la Conception, CHU Marseille

5. Laboratoire d'hématologie, CHU Caen

Acknowledgement

We thank Pr. Philippe de Moerloose (Unité d'Hémostase, Hôpitaux universitaires de Genève, Suisse) for critical review of the manuscript.

Sir,

Persistent polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes (PPBL) is a rare entity, predominantly diagnosed in smoking women and recognized by a moderate, chronic and absolute lymphocytosis with atypical binucleated lymphocytes (Gordon). HLA-DR7 is frequently expressed, and an extra isochromosome for the long arm of chromosome 3 +i(3)(q10) is detected in 80% of the cases (Troussard). The expression of B peripheral blood lymphocytes is consistently CD5- and CD27+ and suggests a memory B-cell of splenic origin. By contrast to B-cell chronic lymphoproliferative disorders, peripheral B-cells are polyclonal with kappa and lambda light-chain expression and no clonal rearrangement of immunoglobulin (Ig) heavy chain genes is usually identified. A moderate increase of serum polyclonal IgM with decrease IgG and IgA has been found in most cases. As anti-phospholipid antibodies (APL) have been previously reported in three cases of PPBL by Granel et al. (2002), we investigated Lupus anticoagulant (LA) and APL of IgM and IgG isotypes in a series of 20 PPBL patients (PTT-LA®, Diagnostica Stago; dRVVT®, Siemens Dade Behring) (Brandt et al 1995a-b, 1995; Miyakis S et al, 2006; Pengo et al, 2009). Anti-cardiolipin (aCL), anti-β₂-glycoprotein I (aβ₂GPI) and anti-phosphatidylethanolamine (aPE) antibodies with IgG and IgM isotypes were also explored using a in-house ELISA (Tincani et al, 2001; Granel, 2002)). Thresholds of positivity were >5 U/mL for aCL (IgG or IgM), >7 U/mL for aβ₂GPI (IgM or IgG), >58 UPEM for aPE (IgM) and >17 UPEG for aPE (IgG).

Twenty patients with typical PLPB diagnosis were investigated (18 women, 2 males), 12 from them previously published (Feugier, Cornet). Three patients were suffering from Raynaud's phenomenon or thyroïditis or lupus. Three women had an history of one foetal loss, 2 women two and 2 women three or more (early losses). None of them had an history of thrombosis. One male had constitutional thrombocytopenia. None of them met criteria for a true APL syndrome according to current definition (Miyakis, 2006), in particular no relevant clinical

history. All patients had increased IgM -15 polyclonal, 5 oligoclonal with a restriction of the Ig heterogeneity-, along with decrease IgG and/or IgA in 15. Fourteen patients presented with APL/cofactor antibodies with a recurrent profile $\alpha\beta 2\text{GPI}$ IgM positive (IgG negative) and/or aPE IgM positive (IgG negative) (Table 1). Two patients had positive detection of LA of IgM isotype and were both positive for $\alpha\beta 2\text{GPI}$ (IgM) and one for aPE (IgM). Investigation of a panel of auto-immune antibodies (anti-nuclear –ANA-, anti-double stranded DNA, anti-smooth muscle, anti-collagene, anti-thyroid, anti-mitochondria, anti-parietal cells) was negative except 5 cases with low levels of ANA below diagnostic value. Rheumatoid factor was found in one patient only. As the optical densities of the sample blanks of aPL positive sera were very high, we controlled the $\alpha\beta 2\text{GPI}$ and aPE IgM positivities by performing the test after depolymerisation of the IgM using cystein chlorhydrate that cancelled all ELISA tests positivities, including the 2 patients with LA. The blank of the ELISA tests decreased after treatment by cystein chlorhydrate as compared to the previous series completed without IgM depolymerisation, and the values of the blanks were then as these usually obtained in the laboratory. Nevertheless, as IgMs pentameric depolymerisation might have induced specific fixation loss to an antigen, and as monoclonal IgM with APL activity could be found in Waldenstöm disease (M. Sanmarco, unpublished data), a real APL syndrome might not been excluded. However, no clinical relevant history was found for all patients. A method to determine if the epitope of monoclonal IgM is specific of $\beta 2\text{-GPI}$ or PE would be to purify the Igs and to use HPLC with $\beta 2\text{-GPI}$ or PE and study elution product against specific ELISA.

We were also intrigued by an erythrocyte sedimentation rate (ESR) increase in 6 out 16 patients without obvious clinical correlation (ESR non available for 4 patients). We checked acute phase reaction proteins levels (C-reactive protein, orosomucoid, fibrinogen, haptoglobin, complement fraction C2 and C4, ferritin, $\alpha 1$ -antitrypsin) and no abnormalities were identified. All patients had an IgM >10 g/l (all patients with normal ESR had IgM <9 g/L), and had artifactual IgM aCL and aPE positivity. We hypothesized that ESR was also truly accelerated by the increased IgM, as for any increase in Ig, but with doubtful clinical value (no inflammation pointed out). Finally, 4 patients presented initially with doubtful HIV positivity which were subsequently ruled out.

To conclude, we would like to point out the need of a careful interpretation of laboratory investigations with possible IgM interference in the context of PLBL. Most patients seemed to harbour APL IgM antibodies, but related to an interference of their IgM with the laboratory tests. Moreover, acceleration of the ESR was found in one third of the patients without inflammation state. We stress that: i/ IgM in PLPB unspecifically bind to some APL/cofactor, and that interference had no clinical value, ii/ interference of the IgM antibodies should be considered and checked after an IgM depolymerisation pre-treatment protocol in laboratory tests.

Table I: Patients data

References

Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995a;74:1185-90.

Brandt JT, Barna LK, Triplett DA. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost.* 1995b;74:1597-603.

Cornet E, Lesesve JF, Mossafa H, Sébahoun G, Levy V, Davi F, Troussard X and the Groupe Français d'Hématologie Cellulaire (GFHC). Long-term follow-up of 111 patients with persistent polyclonal B-cell lymphocytosis (PPBL) with binucleated lymphocytes. *Leukemia.* 2009;23:419-22.

Erkan D, Derksen WJ, Kaplan V, Sammaritano L, Pierangeli SS, Roubey R, Lockshin MD. Real world experience with antiphospholipid antibody tests: how stable are results over time? *Ann Rheum Dis.* 2005 ;64:1321-5.

Feugier P, De March AK, Lesesve JF, Monhoven N, Dorvaux V, Braun F, Grégoire MJ, Jonveaux P, Lederlin P, Béné MC, Labouyrie E. Intravascular bone marrow accumulation in persistent polyclonal lymphocytosis: a misleading feature for B-cell neoplasm. *Mod Pathol.* 2004;17:1087-96.

Gordon DS, Jones BM, Browning SW, Spira TJ, Laurence DN. Persistent polyclonal lymphocytosis of B-lymphocytes. *N Engl J Med.* 1982;307:232-6.

Granel B, Serratrice J, Disdier P, SanMarco M, Hubert MM, Alessi MC, Cannoni H, Camoin L, Bouabdallah R, Juhan-Vague I, Weiller PJ. Anti-phospholipid/cofactor antibodies in three cases of persistent polyclonal B lymphocytosis. *Br J Haematol.* 2002 ;119:875-6.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006 ; 4 : 295-306.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, de Groot PG. Official communication of the scientific and standardization committee on lupus anticoagulant/phospholipid-dependent antibodies: update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost.* 2009 Jul 17. [Epub ahead of print]

Tincani A, Allegri F, Sanmarco M, Cinquini M, Taglietti M, Balestrieri G, Kolke T, Ichikawa K, Meroni P, Boffa MC. Anticardiolipin antibody assay: a methodological analysis for a better consensus determinations. A cooperative project of the european antiphospholipid forum. *Thromb Haemost* 2001; 86:575-83.

Troussard X, Cornet E, Lesesve JK, Kourel K, Mossafa H et le Groupe Français d'Hématologie cellulaire (GFHC). Polyclonal B-cell lymphocytosis with binucleated lymphocytes: a review. *OncoTargets and Therapy* 2008;1:59-66.



VU

NANCY, le 19 octobre 2009
Le Président de Thèse

NANCY, le 19 octobre 2009
Le Doyen de la Faculté de Médecine
Par délégation,

Professeur T. LECOMPTE

Mme le Professeur K. ANGIOI

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, 22 octobre 2009

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1
Par délégation

Madame C. CAPDEVILLE-ATKINSON

NOM & Prénom : SOKOLOWSKA- GILLOIS Joanna

**LYMPHOCYTOSE POLYCLONALE À LYMPHOCYTES BINUCLÉÉS :
UNE SERIE MONOCENTRIQUE DE 33 PATIENT(E)S**

Une série de 33 patients atteints d'une lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés (LPLB) est présentée. Dans la mesure où cette cohorte est l'une des plus importantes recensées, le but était de documenter au mieux les patients et de confronter aux données publiées afin de préciser cette entité. Cette anomalie concerne surtout les femmes fumeuses, présentant souvent un terrain familial et personnel des maladies auto-immunes, avec une hyper IgM. Nos constatations cliniques en font un diagnostic différentiel de la fibromyalgie. Biologiquement, nous avons pu préciser le profil immunophénotypique des lymphocytes B, avec implication d'une cellule B IgM^{bright}+D^{dim}CD27+ possiblement IgM mémoire de la zone marginale splénique. L'expression des TLR 7, 9, 10 montre une hyperexpression inhabituelle. Ce profil est spécifique et permet de faire le diagnostic positif / différentiel de LPLB. Une composante génétique est suggérée par la fréquence élevée du phénotype HLA DR7 ainsi qu'un cas familial (mère et fille). L'évolution des patients, bien que pour la plupart stable et bénigne, impose un suivi, puisque l'incidence des pathologies cancéreuses (surtout lymphomateuses) est plus élevée que dans la population générale.

PERSISTENT POLYCLONAL B-CELL LYMPHOCYTOSIS : FOLLOW UP OF 33 PATIENTS

THESE : MEDECINE SPECIALISEE ANNEE 2009

MOTS CLEFS : Lymphocytose polyclonale à lymphocytes B binucléés, fibromyalgie, lymphocytes B mémoire.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex