



HAL
open science

Étiologies associées aux augmentations des lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta

Mehdi Benchaabane Belmehel

► **To cite this version:**

Mehdi Benchaabane Belmehel. Étiologies associées aux augmentations des lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02958896

HAL Id: dumas-02958896

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02958896>

Submitted on 6 Oct 2020

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 28 Septembre 2020

Par M. BENCHAAABANE BELMEHEL MEHDI
Né le 07/01/1992 à Mazouna (Algerie)

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
Du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN
PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

**Etiologies associées aux augmentations des lymphocytes T doubles
négatifs alpha bêta**

----oOo----

JURY :

Président : Mme le Pr BARDIN NATHALIE

Membres : Mr le Pr LACROIX ROMARIC

Mr le Pr GUIEU REGIS

Mme Le Dr GOLESI FLORENCE

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

NUTRITION ET DIETETIQUE

M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE

M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE

M. Philippe CHARPIOT

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS
----------------------------	------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE - PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE - CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDER Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER Mme Fanny MATHIAS
---	---

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »

REMERCIEMENT

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans la participation de nombreuses personnes.

Tout d'abord, je tiens à remercier le jury :

Monsieur le Professeur Romaric LACROIX de m'avoir accordé sa confiance en proposant ce sujet et de m'avoir si parfaitement encadré tout le long du travail, je ne pouvais espérer meilleur directeur de. Véritable puits de science, il est pour moi un modèle à la fois dans le domaine professionnel et personnel.

Madame le Professeur Nathalie BARDIN me faire l'honneur de présider mon jury et de juger mon travail et le réel investissement dans notre encadrement durant mon stage au sein de votre laboratoire j'ai été honoré de suivre une partie de ma formation auprès de vos équipes.

Monsieur le Professeur Régis GUIEU me faire l'honneur de siéger en tant que jury de thèse, pour votre réel investissement dans notre encadrement durant mon stage au sein de votre laboratoire.

Madame le Docteur Florence GOLESI me faire l'honneur de siéger en tant que jury de thèse, le réel investissement dans notre encadrement durant mon stage.

Ce travail est aussi le fruit de la contribution de Mme la Docteur Shirley FRITZ, un grand merci pour votre rigueur et de votre disponibilité.

Je dédie ce travail,

À ma mère Khedidja et mon père Tayeb, merci pour votre amour, vos sacrifices au quotidien et pour m'avoir montré le bel exemple à suivre. Je ne trouverai jamais assez de mots pour exprimer tout mon amour et mon respect envers vous.

À mon épouse Amel, mes mots sont bien trop faibles pour exprimer mes sentiments à ton égard. Merci ma chère épouse pour ta patience, ton soutien durant cette période charnière de ma vie et pour le bonheur et l'amour que tu m'apportes au quotidien.

À mon frère Mohammed et son épouse Neila, mes neveux Yanis et le petit dernier Sami merci pour votre soutien et votre amour inconditionnel. Malgré la distance qui peut nous séparer, mon attachement à vous ne cesse de s'agrandir à chaque instant.

À mon ami et frère Abdou, malgré la distance notre amitié est restée solide

À mes amis et frérots montpelliérains, François, Nicolas, Vincent AZ, Vincent ES et Steven ne changez jamais vous êtes les meilleurs

À ces belles amitiés nées à Marseille : Momo, Bassam, Mohammed, Suzy, Marceau, Rémi et Lora

À mes amis co-internes : Baptiste, Noémie, Célia, Marc, Arthur, Léa, Charlotte, Emma, Laurène, Maude, Douliery, James, Ségolène, Emilie,

Table des matières

REMERCIEMENT

ABREVIATIONS

INTRODUCTION	4
I- LES LYMPHOCYTES T DOUBLES NEGATIFS ALPHA BETA	5
I.A. RAPPEL SUR LES LYMPHOCYTES T ET LE REPECTEUR T A L'ANTIGENE	5
I.A.1. LES LYMPHOCYTES T	5
I.A.2. LA MATURATION THYMIQUE DES LYMPHOCYTES « THYMOPOÏESE »	8
I.A.3. LE COMPLEXE REPECTEUR A L'ANTIGENE (TCR) -CD3	11
I.B. LES LTDN AB	14
I.B.1. HISTORIQUE DE DECOUVERTE DES LTDN AB	14
I.B.2. L'ORIGINE ET LE PROCESSUS DE GÉNÉRATION DES LTDN AB	15
I.B.2.i- La génération intrathymique des LTDN $\alpha\beta$	15
I.B.2.ii- La génération indépendante du thymus « extrathymique » des LTDN $\alpha\beta$	17
I.C. LES ÉTIOLOGIES ASSOCIÉES À L'AUGMENTATION DES LDNT AB	20
I.C.1. LA TRANSPLANTATION ET LA GREFFE :	20
I.C.2. LA NÉOPLASIE	22
I.C.2.i. Le lymphome non hodgkinien LNH	23
I.C.2.i.(1)- Lymphomes présentant des LDNT $\alpha\beta$ monoclonaux :	23
I.C.2.i.1.(a)- Mycosis fongoïde (MF)	23
I.C.2.i.1.(b)- Le lymphome hépatosplénique à cellules T (HSTL)	23
I.C.2.i.1.(c)- Leucémie-lymphome à cellules T de l'adulte due au rétrovirus HTLV-1 (ATLL)	24
I.C.2.ii. Les cancers solides associés à l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$	25
I.C.3. LES INFECTIONS	25
I.C.4. LES MALADIES AUTO-IMMUNES	26
I.C.4.i. Le lupus érythémateux disséminé	26
I.C.4.ii. Le syndrome de Gougerot Sjögren	26
I.C.4.iii. Le psoriasis	27

II- LE SYNDROME LYMPHOPROLIFERATIF AUTO-IMMUN ALPS « AUTOIMMUNE LYMPHOPROLIFERATIVE SYNDROME »	28
II.A. ÉPIDEMIOLOGIE	29
II.B. CARACTERISTIQUES CLINIQUES	29
II.C. PHYSIOPATHOLOGIE	30
II.D. DEMARCHE DIAGNOSTIQUE	35
II.E. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	41
II.E.1. MALADIE LYMPHOPROLIFERATIVE AUTO-IMMUNE DE DIANZANI	41
II.E.2. TROUBLE LEUCOPROLIFERATIF AUTO-IMMUN ASSOCIE A RAS.....	41
II.E.3. SYNDROME DE CARENCE EN CASPASE-8	41
II.E.4. D DEFICIT EN FADD	42
II.E.5. LE DEFICIT IMMUNITAIRE VARIABLE COMMUN.....	42
II.E.6. SYNDROME D’HYPER IGM.....	43
II.E.7. LA MALADIE LYMPHOPROLIFERATIVE LIEE A L’X	43
II.E.8. LE SYNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.....	44
II.E.9. LA MUTATION GAIN DE FONCTION DE STAT3	45
II.F. PRISE EN CHARGE	45
II.F.1. TRAITEMENT DES MANIFESTATIONS CLINQUE	45
II.F.1.i- Surveillance et traitement de la lymphoprolifération et de l’hypersplénisme	Erreur ! Signet non défini.
II.F.1.ii- Traitement des cytopénies et autres maladies auto-immunes.....	46
II.F.2. PREVENTION DES MANIFESTATIONS CLINIQUES.....	47
II.F.2.i- Prévention des manifestations cliniques primaires	47
II.F.2.ii- Prévention des complications secondaires.....	47
II.F.3. ÉVALUATION DES PARENTS A RISQUE	48
III- TRAVAIL PERSONNEL	49
III.A. MATERIELS ET METHODES	55
III.B. RESULTATS	55
III.C. CONCLUSION	61
DISCUSSION	63
RESUME	
SUMMARY	

Abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag : Antigène

CMH : Complexe Majeur
d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène

DC : Cellule dendritique

CMF : Cytométrie en flux

CTLA-4 : cytotoxic T-lymphocyte-
associated protein 4

DN : Double négatif

DP : Double positif

FOX-P3 : Forkhead box P3

gld : lymphoprolifération généralisée

GVHD : Graft versus host disease chronic
ou la maladie du greffon contre l'hôte

IFN γ : Interféron gamma

IL : Interleukine NA

ITAM: immune-receptor tyrosine based
activation motif

LTDN : Lymphocytes T doubles négatifs

LyT: Lymphocytes T

LED: Lupus érythémateux disséminé LED

MRL/lpr : Murphy roths
large/lymphoproliferation)

RAG : *Recombination Activation Genes*

RUNX 3 : Runt-related transcription factor

3

STAT : Transducteur de signal et
l'activateur de transcription

TCR : T cell receptor

TGF- β : Transforming growth factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

ZAP70 : *Zeta associated kinase*

Introduction

Les lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta (CD3+CD4- CD8- $\alpha\beta$ +) ou « LTDN $\alpha\beta$ » sont une sous-population hétérogène de lymphocytes T (LyT) très faiblement représentés dans la circulation sanguine des sujets sains (<1% des lymphocytes totaux). L'appellation "doubles négatifs" provient du fait qu'ils n'expriment ni le CD4 ni le CD8, et "alpha bêta" indique le type de chaînes constitutives du récepteur T à l'antigène (TCR) exprimées à la surface du lymphocyte. Très peu de données existent dans la littérature sur l'origine et les rôles de cette population de lymphocyte en physiologie ou en pathologie. La première description de ces LTDN $\alpha\beta$ concernait des lymphocytes T régulateurs dans un modèle murin de lupus spontané. Ils ont par la suite été¹ isolés et caractérisés chez l'homme en 2005² dans le syndrome lymphoprolifératif auto-immun « ALPS » dans lequel on observe une augmentation de ces LTDN $\alpha\beta$ dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Cette population lymphocytaire a été également décrite dans d'autres contextes cliniques cependant leurs étiologies restent mal connues et une difficulté de diagnostic différentiel est possible.

L'objectif de ce travail est de **faire un point bibliographique sur les connaissances actuelles des LTDN $\alpha\beta$** . De plus, au sein du laboratoire d'hématologie et de biologie vasculaire du CHU de La Conception APHM, un typage du TCR est réalisé. Il consiste à identifier le type de TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ chez les patients pour lesquels un immunophénotypage T/B et NK est demandé et présentant une population de LTDN supérieur ou égal à 12%. Ceci permet d'identifier les augmentations de LTDN $\alpha\beta$. **Notre hypothèse était que la grande majorité des cas montrant cette augmentation atypique n'était pas associée à un ALPS. L'objectif de mon travail personnel a donc été de déterminer l'origine étiologique des augmentations des LTDN $\alpha\beta$** dans une étude rétrospective incluant les patients ayant bénéficié d'un immunophénotypage de 2016 à 2020.

Nous décrivons dans une première partie de la thèse, les connaissances actuelles sur les LTDN $\alpha\beta$, leurs origines, leurs caractéristiques immunophénotypiques ainsi que les étiologies associées à leurs augmentations.

Dans la seconde partie, nous détaillerons une étiologie spécifique, le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) qui est la première pathologie dysimmunitaire où une

augmentation des LTDN $\alpha\beta$ a été retrouvée et dans laquelle elle joue un rôle important dans la physiopathologie et la démarche diagnostique.

Enfin dans la troisième partie, nous présenterons notre travail personnel concernant les différentes étiologies associées aux augmentations des LTDN $\alpha\beta$ retrouvées au sein du laboratoire d'hématologie et de biologie vasculaire de l'hôpital de la Conception.

I- Les Lymphocytes T doubles négatifs $\alpha\beta$

Pour commencer, nous ferons un rappel sur les lymphocytes T et leur récepteur à l'antigène le « TCR » (T cell receptor).

A. Rappel sur les lymphocytes T et le récepteur T à l'antigène

1. Les Lymphocytes T

Le lymphocyte T (LyT) est une cellule essentielle du système immunitaire chargée d'amplifier ou de freiner la réponse immune. Dans le sang périphérique, les lymphocytes T se caractérisent par l'expression du récepteur à l'antigène « TCR » qui est directement impliqué dans la reconnaissance antigénique et du CD3 qui permet la transduction du signal du TCR. Les LyT ont comme origine la cellule souche hématopoïétique qui au niveau de la moelle osseuse va se différencier en progéniteur lymphoïde commun. Celui-ci va pénétrer dans le thymus et y poursuivre sa différenciation. Les cellules en différenciation dans le thymus, aussi appelée thymocytes, subiront une sélection positive et une sélection négative qui permettra de s'assurer que le lymphocyte T qui sortira du thymus sera capable de reconnaître les cellules présentatrices de l'antigène et ne réagira pas contre le soi. À la sortie du thymus, le lymphocyte T qui est alors naïf (il n'a jamais rencontré l'antigène pour lequel il est spécifique), va gagner, les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) en empruntant la circulation sanguine. Ces sites spécialisés favorisent la rencontre entre les lymphocytes T et les antigènes du non-soi présentés à la surface des cellules présentatrices de l'antigène. La spécificité antigénique de l'interaction entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice de l'antigène, aboutira à l'activation du lymphocyte T. Celui-ci sera alors capable de proliférer de manière clonale et d'exercer des

fonctions effectrices. On parlera alors de lymphocyte T effecteur qui va s'opposer à l'expansion de l'antigène et de lymphocyte « mémoire » qui sera capable d'induire une réponse immunitaire rapide et efficace en cas de nouvelle rencontre avec cet antigène. Les lymphocytes effecteurs assurent des fonctions spécialisées, telles que la sécrétion de cytokines ou encore l'aide aux lymphocytes B dans la fonction humorale (lymphocytes T CD4+ encore appelés lymphocytes T auxiliaires), ainsi qu'une activité cytotoxique (lymphocytes T CD8+). Les lymphocytes T effecteurs ou « helper » en anglais (TH) de phénotype CD4 se divisent en plusieurs sous-populations (les plus connus sont TH1, TH2, THreg et TH17) caractérisées par des profils de sécrétion cytokinique différents (Figure 1). La sous-population TH1 qui sécrète les cytokines IL-2 et l'IFN γ , intervient dans des fonctions à médiation cellulaire telles que l'hypersensibilité retardée ou l'activation des lymphocytes cytotoxiques. La sous-population TH2 qui sécrète les interleukines IL-4, IL-5 et IL-10, intervient surtout dans la réponse humorale en activant les lymphocytes B. Une autre sous-population TH17 a été décrite, caractérisée par la production d'IL-17 qui est une cytokine hyper-inflammatoire. Elle est notamment impliquée dans la destruction ostéo-articulaire rhumatoïde.

Ensuite, les LyT effecteurs « cytotoxiques » de phénotype, CD8 ou LyTCD8+ sont capables d'induire la mort d'une cellule par l'excrétion de perforine et de sérines protéases comme les granzymes qui sont contenus dans des granules intracellulaires.

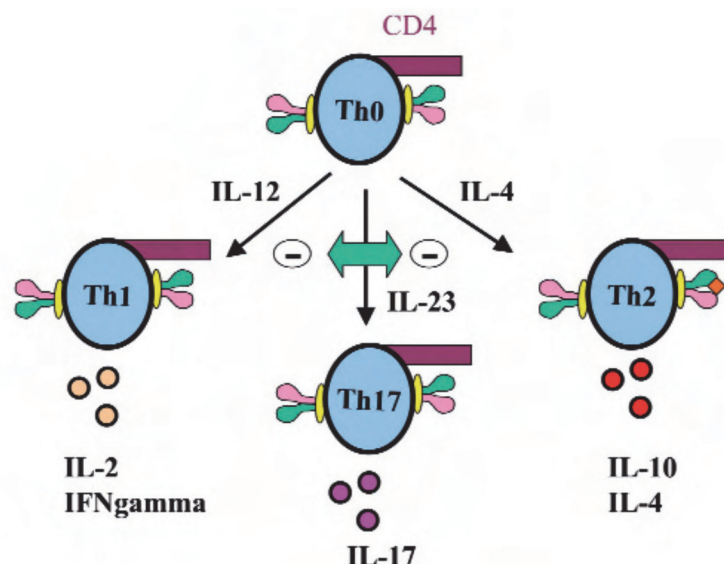


Figure 1 : Les lymphocytes T CD4+ lorsqu'ils sont activés par un antigène se différencient soit en lymphocytes TH1 qui sécrètent les cytokines IL-2 et IFN gamma soit en lymphocytes TH2 qui sécrètent les cytokines IL-10 et IL-4. Les lymphocytes TH1 ont un effet contrôle négatif sur le développement des lymphocytes TH2 et réciproquement. Les LT CD4+ peuvent aussi être activés, sous l'effet de l'IL-23, en LTH17 sécréteur d'interleukine 17³.

Les lymphocytes T mémoires sont issus d'une première réponse immunitaire. Ils vont se comporter comme des sentinelles capables d'induire une nouvelle réponse immune spécifique d'un antigène, mais dans un délai plus court. Cette mémoire immunologique est le principe même de la vaccination. Ces lymphocytes T mémoires ont une durée de vie très allongée et se distinguent par l'expression de la molécule CD45RO.

Ensuite, les lymphocytes T régulateurs « naturels » représentent un très faible contingent de lymphocytes T CD4 reconnaissant mieux le soi que les autres et échappent aux filtres thymiques et médullaires. Ils concernent 1 à 2% des lymphocytes T CD4 du sang. Ces lymphocytes T ont la particularité de freiner la réponse immune après avoir reconnu par leurs TCR divers auto-antigènes lors de leur migration dans les ganglions et les tissus périphériques. Ces lymphocytes T régulateurs expriment en grandes quantités la molécule CD25 (TCD4+CD25+high) et le facteur de transcription FOXP3. La fonction régulatrice des lymphocytes T régulateurs s'exerce surtout par l'envoi aux cellules présentatrices d'antigènes de signaux d'apaisement, par l'expression de CTLA-4, ou la libération de cytokines comme le TGFβ- et l'IL-10. Ces TCD4+CD25+high « constitutionnels » n'auraient pas un répertoire différent des lymphocytes T effecteurs, mais une sensibilité différente de leur TCR. De ce fait, ces cellules en étant plus facilement activées que les lymphocytes T effecteurs exerceraient sur l'ensemble de la réponse immune un frein permanent pour éviter des dérapages tels que ceux que pourrait occasionner la stimulation dans un ganglion par un épitope étranger d'un lymphocyte T ayant la capacité à ensuite de reconnaître un épitope du soi par mimétisme moléculaire. Les différentes molécules exprimées sur les différents lymphocytes T classiques qui sont résumées sur le Tableau 1 et classées en 3 différents types : molécules précoces de la lymphopoïèse T, molécules présentes sur une partie des lymphocytes T et molécules apparaissant après activation des cellules T.

Chez l'Homme et la souris, à il existe également à côté des lymphocytes T αβ « classiques » à d'autres populations de lymphocytes T, les lymphocytes T γδ⁴, les lymphocytes iNKT, MAIT connus sous le nom de lymphocytes T non conventionnels, qui peuvent être activés dans un mécanisme distinct des lymphocytes T conventionnels. Ces lymphocytes ont une ontogénie différente et surtout une diversité beaucoup plus restreinte.

Les lymphocytes T γδ bien qu'ayant des caractéristiques phénotypiques assez similaires (avec notamment expression de la molécule CD3), les lymphocytes T γδ se distinguent des lymphocytes T αβ par un grand nombre de points. D'un côté, ils ont comme rôle de renforcer l'interaction avec les molécules du CMH classiques. Ils peuvent être considérés comme faisant

partie de l'immunité adaptative en cela qu'ils ont opéré une recombinaison V(D)J ; de l'autre, la diversité de recombinaison est relativement restreinte et s'apparente ainsi à un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires. Ainsi, les LTDN $\gamma\delta$ répondent rapidement à des antigènes non peptidiques exprimés par les agents infectieux ainsi leurs actions est intégrée dans la réponse immunitaire globale de l'organisme. Contrairement aux lymphocytes T $\alpha\beta$, la plupart des lymphocytes T $\gamma\delta$ matures ont un phénotype double-négatif DN CD4- CD8-, ou simple positif SP CD8 +, ou exceptionnellement SP CD4 +. Pendant l'ontogénie, les lymphocytes T $\gamma\delta$ ne passent pas par les mêmes étapes de différenciation intrathymique, et la dichotomie $\gamma\delta/\alpha\beta$ se produit précocement au cours de l'ontogénie T. La répartition tissulaire des lymphocytes T $\gamma\delta$ après leur sortie du thymus est différente de celle des lymphocytes $\alpha\beta$ qui sont majoritairement dans les ganglions et le sang. On retrouve les lymphocytes $\gamma\delta$ essentiellement dans les tissus, les muqueuses et la peau. La diversité des TCR $\gamma\delta$ est beaucoup moins grande que celle des TCR $\alpha\beta$. Ainsi, une même chaîne V γ est exprimée par la majorité des lymphocytes $\gamma\delta$, celle-ci variant suivant l'âge. Les TCR $\gamma\delta$ ne sont pas restreints par le CMH. Ils ne reconnaissent pas des épitopes classiques, mais plutôt des épitopes conservés au sein des pathogènes. Pour ces raisons les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont considérés comme des cellules appartenant à l'immunité innée⁵. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ semblent particulièrement dédiés à l'immunité de la peau et des muqueuses notamment intestinales et broncho-pulmonaires. Ils ne représentent qu'une petite fraction des T périphériques, mais, du fait de leurs tropismes tissulaires, leurs nombres totaux dans l'organisme pourraient être aussi important que celui des LTDN $\alpha\beta$ voire potentiellement très grand, ils semblent avoir des fonctions et des distributions dans l'organisme très restreint selon leurs isotypes. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ reconnaissent des déterminants antigéniques présentés par des molécules du CMH « non classiques » présentent des antigènes non peptidiques de type phospholipides ou glycolipidiques. Ces groupes ne sont pas polymorphiques et les lymphocytes T $\gamma\delta$ n'ont qu'une très faible restriction du groupe CMH⁶ ce qui les place à la frontière entre l'immunité spécifique et l'immunité non spécifique (innée). Les T $\gamma\delta$ 1 reconnaissent des antigènes de stress présentés par les molécules de type HLA DRW53 comme l'Heat Shock Protein (HSP) des mycobactéries⁷ ou encore des toxines (toxine tétanique, ou toxine du staphylocoque SEA) et le palmidronate. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle essentiel dans l'immunité notamment contre des micro-organismes à croissance intracellulaire tels que les mycobactéries, les borrellia, *Francisella tularensis* ou encore les salmonella, avec une importante capacité d'activité cytotoxique. Ils sont impliqués dans la réponse immune des muqueuses et notamment des bronches. Les T $\gamma\delta$ ont le même développement phénotypique que les LTDN $\alpha\beta$. Après la rencontre de l'antigène, ils peuvent

acquérir un phénotype mémoire, soit effecteur (CD45RA-, CD27-, CD62L- ; CCR7-) avec faible capacité de prolifération, soit mémoire central (CD103+, CD45 RA+ et CD7+ à forte capacité de prolifération⁸. Les T $\gamma\delta$ ont également des rôles importants dans des fonctions non immunologiques comme l'embryogenèse et l'homéostasie tissulaire⁹. Plus récemment, les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont également été impliqués dans la régulation des mécanismes de cicatrisation épithéliale et dans l'homéostasie de la peau¹⁰.

Les lymphocytes iNKT (invariant Natural Killer) Les lymphocytes iNKT représentent un groupe hétérogène de lymphocytes T. Comme leur nom l'indique, ils possèdent des caractéristiques phénotypiques propres aux lymphocytes T (notamment un TCR et la présence de CD3), mais également aux lymphocytes NK (expression des molécules CD56 et CD16). Le TCR des lymphocytes NKT est quasi invariant. La chaîne α est toujours formée à partir de la même association de segments génétiques V α 24 et J α 18. Il existe par ailleurs une certaine diversité des chaînes β exprimées par ces cellules, mais beaucoup plus restreinte que dans le cas des lymphocytes $\alpha\beta$ classiques. Le TCR ainsi formé reconnaît non pas des peptides présentés par le CMH, mais des lipides et des glycolipides présentés par la molécule CD1d. La fréquence dans le sang des lymphocytes NKT est assez variable (0,001 à 3 % des lymphocytes circulants). Ces cellules jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires, et leur absence ou dysfonction est à l'origine de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou tumorales.

Les MAIT (lymphocytes T invariants associés aux muqueuses) Les cellules T invariantes associées aux muqueuses, une nouvelle sous-population de cellules T de type inné, présentent de nombreuses similitudes avec les cellules iNKT, à la fois en termes de propriétés immunologiques et de fonctions. Chez l'Homme, la majorité des cellules MAIT expriment un TCR constitué d'un réarrangement canonique de V α 7.2-J α 33 TCR α couplé à des chaînes TCR β limitées (majoritairement V β 2 ou V β 13). Les cellules T invariantes associées à la muqueuse sont connues en tant que cellules T non conventionnelles en partie parce qu'elles reconnaissent les antigènes non peptidiques présentés par la molécule MR1. Bien que principalement présentes comme les autres lymphocytes T non conventionnels dans les muqueuses ces cellules représentent jusqu'à 10 % des cellules T dans le sang périphérique chez l'Homme. Là encore ces cellules sont impliquées dans la réponse contre les pathogènes notamment digestifs cependant les cellules MAIT jouent également un rôle potentiel dans les maladies inflammatoires et les cancers¹¹.

Molécules précoces de la lymphopoïèse T	Molécules présentes sur une partie des lymphocytes T	Molécules apparaissant après activation des cellules T
<p>CD2 : molécule d'adhésion</p> <p>CD5 : molécule d'activation des cellules T induisant la sécrétion d'IL-2</p> <p>CD7 : molécule non spécifique d'immatrité)</p>	<p>CD4 : permet la liaison avec les molécules CMH classe II (présent sur 2/3 des lymphocytes, c'est aussi la cible du VIH)</p> <p>CD8 : permet la liaison avec les molécules CMH classe I (présent sur 1/3 des lymphocytes)</p> <p>CD28 : intervient dans la coopération cellulaire T – B (se couple au CD80 des lymphocytes B, mais aussi d'autres CPA, et induit la synthèse d'IL-2 et d'IFN-g par les lymphocytes CD4+)</p>	<p>CD45 RO. Cette molécule est présente sur les lymphocytes T activés et mémoire, mais pas sur les lymphocytes T naïfs (= portent la molécule CD45 RA).</p> <p>CD25 ou IL-2R a : récepteur pour l'IL-2, il apparaît après stimulation par les mitogènes ou les virus.</p> <p>– CD38</p> <p>– HLA-DR</p>

Tableau 1 : Les différentes molécules exprimées sur les lymphocytes T

Nous allons maintenant détailler les principales étapes de la maturation thymique des lymphocytes T qui est nommée thymopoïèse.

2. La maturation thymique des lymphocytes « Thymopoïèse »

Une fois dans le thymus, les progéniteurs lymphoïdes communs se différencient en lymphocytes T thymiques appelés thymocytes sous l'effet du micro-environnement épithélial thymique. Au cours de ce processus de différenciation, les thymocytes migrent de la périphérie (cortex) vers le centre (medulla) du thymus ces étapes sont divisées en trois :

Étape 1 : Dans la zone corticale du thymus, une prolifération intense de prothymocytes ou thymocytes corticaux est induite par le stem cell factor « SCF » et IL-7. Ensuite, les chaînes du TCR commencent à se réarranger en commençant par le locus de la chaîne β , puis le locus

de la chaîne alpha à l'étape suivante. Lors d'échec du réarrangement de la chaîne β (5 % des cas), un réarrangement du locus de la chaîne γ aboutira à la production de lymphocytes T $\gamma\delta$. À ce stade, le CD3 est intracytoplasmique ; les cellules sont appelées DN (double négatif CD4-CD8-). Ils expriment transitoirement le CD44 puis le CD25.

Étape 2 : Elle se situe également dans la zone corticale. Les thymocytes évoluent en pré-thymocytes ou thymocytes communs avec un réarrangement du locus alpha. A ce stade, on observe une co-expression en surface des molécules CD4 et CD8 (= doubles positifs CD4+CD8+). La sélection positive a lieu au stade double positif DP lorsque les thymocytes expriment un TCR $\alpha\beta$ potentiellement fonctionnel. Des antigènes du soi sont présentés par les cellules épithéliales corticales thymiques (cTEC) aux thymocytes DP. Les thymocytes dont le TCR ne reconnaît pas le complexe CMH-peptide du soi ne reçoivent pas de signal de survie et meurent. L'avidité du TCR pour le complexe CMH-peptide du soi est ici intermédiaire. Cette étape permet l'élimination des lymphocytes T impropres à collaborer avec les molécules HLA (CMH humain) de l'hôte. En effet, la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T a toujours lieu dans le contexte du CMH. On parle de « restriction de la reconnaissance de l'antigène par le CMH ».

Étape 3 : Les cellules de l'étape 2 se localisent dans la médullaire du thymus nommé thymocytes matures ou médullaire. À ce stade, une seconde étape de sélection d'affinité a lieu nommé la sélection négative, cette dernière s'accompagne d'une mort des cellules recevant un signal trop intense via le TCR. Elle entraîne ainsi la délétion des thymocytes exprimant un TCR ayant une trop forte affinité pour les antigènes du soi. Les cellules présentant ces antigènes sont ici les cellules dendritiques situées à la jonction cortico-médullaire. Ces cellules captent les antigènes exprimés par les cellules épithéliales médullaires thymiques (mTEC) et les présentent via leur CMH aux thymocytes double-positifs DP. La protéine cruciale de cette étape est la protéine AIRE (AutoImmune REgulator) présente dans les cellules épithéliales thymiques médullaires et indispensable à l'expression ectopique d'antigènes tissulaires (par exemple l'insuline). Un déficit en AIRE induit un syndrome appelé APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy) ou APS1 (Auto-immune Polyendocrine Syndrome type 1) associant des manifestations d'auto-immunité et un déficit immunitaire. La protéine THEMIS (Thymus Expressed Molecule Involved in positive Selection) exprimée par les thymocytes DP au moment de la sélection positive et pas après joue un rôle important en inhibant le signal transmis par le TCR par les complexes CMH/ protéines

du soi expliquant que le même signal induise une survie ou une apoptose. Suite à ces différentes étapes, les thymocytes donnent naissance à des lymphocytes T naïfs simple-positifs (SP) CD4 + ou CD8 + naïfs, reconnaissant respectivement les molécules du CMH de classe I ou de classe II, quittent le thymus par les vaisseaux de la jonction cortico-médullaire et passent dans les vaisseaux sanguins¹¹ (Figure 2).

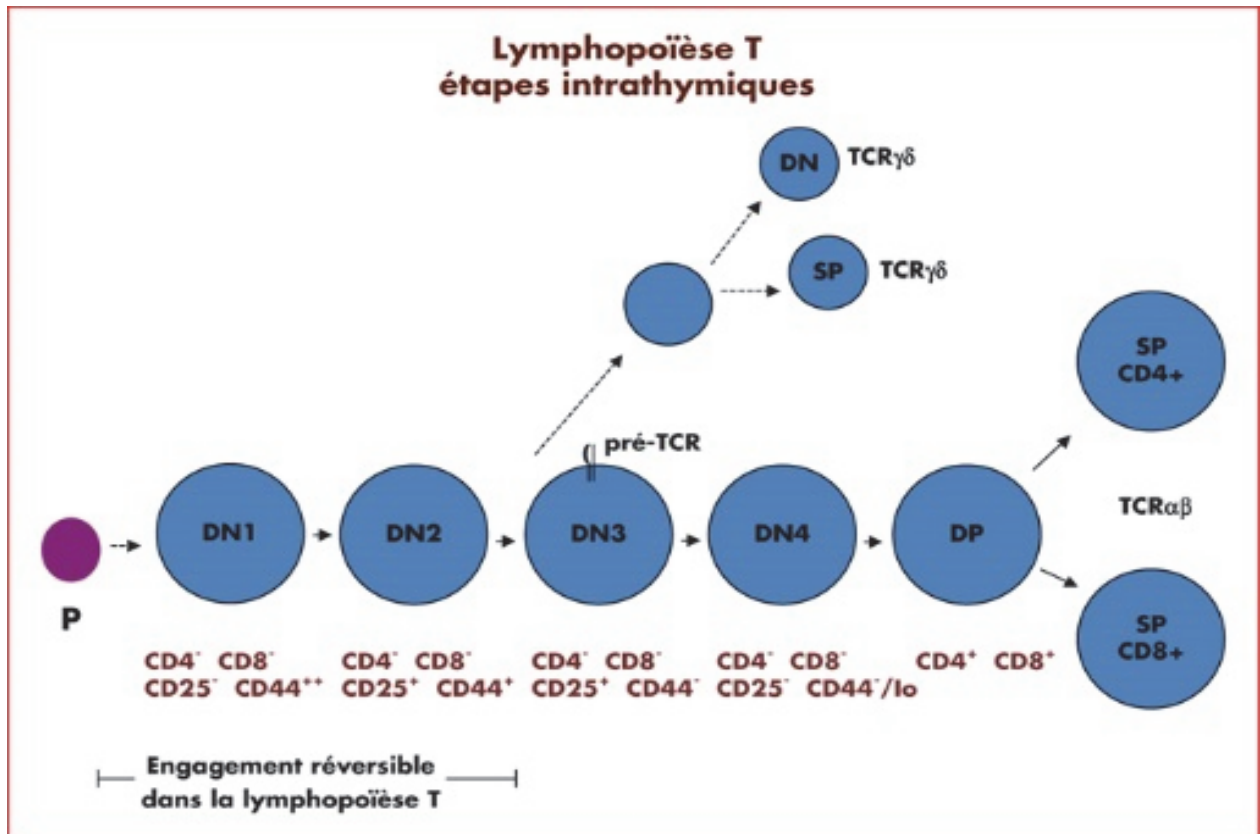


Figure 2 : principales étapes de la thymopoïèse T. Les progéniteurs hématopoïétiques (P) migrent dans le thymus ou ils trouvent le microenvironnement favorable à leur engagement dans la lymphopoïèse T et à leur différenciation en lymphocytes T matures naïfs exprimant TCR¹².

3. Le complexe récepteur à l'antigène (TCR) -CD3

Le complexe TCR – CD3 (Figure 3) est commun à tous les lymphocytes T et joue un rôle clé dans la reconnaissance de l'antigène. Cette diversité des cellules T apportée par leur TCR est essentielle pour assurer une protection contre un large panel d'antigènes.

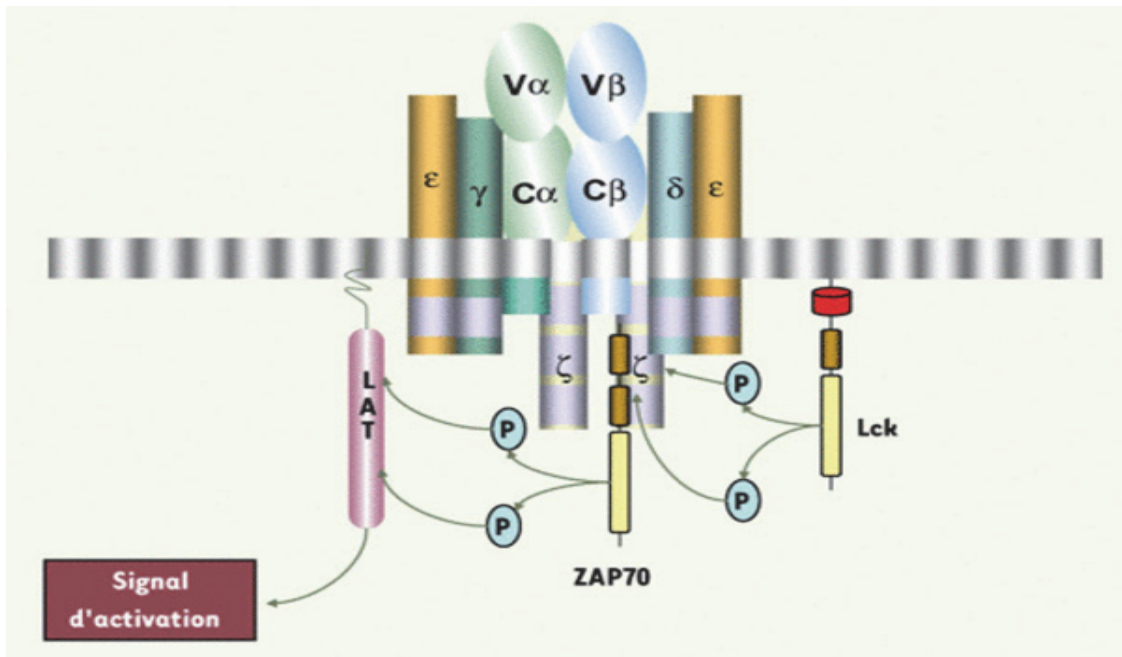


Figure 3 :

Le complexe TCR/CD3¹³. Le récepteur T de l'antigène est constitué d'un hétérodimère (α/β ou γ/δ) associé à 4 protéines transmembranaires : CD3 γ , δ , ϵ , et ζ . Les chaînes CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ et CD3 ζ forment des modules dimériques $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$. Chaque chaîne γ , δ , ϵ , et ζ présente dans sa partie intracytoplasmique des motifs ITAM (en violet) qui sont phosphorylés sur les résidus tyrosine par la tyrosine kinase Lck. La phosphorylation des ITAM de ζ permet l'association de ZAP70 à cette chaîne par l'intermédiaire des 2 domaines SH2 (en marron) portés par cette kinase et secondairement sa phosphorylation par Lck. ZAP70 ainsi activée phosphoryle à son tour l'adaptateur LAT.

Le TCR procure aux LyT la propriété de reconnaître des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules du CMH, et ceci de manière spécifique. Le TCR est un hétérodimère extrêmement polymorphique au sein de l'individu. Il est de deux types suivant les chaînes composant l'hétérodimère et caractérisées par différentes régions présentes au niveau des deux chaînes associées l'une à l'autre par un pont disulfure. Le réarrangement aléatoire des différents segments de gène (V (Variable), D (Divers), J (Jonction) et C (Constant)) et l'insertion ou de la délétion de nucléotides entre ces différents segments de gènes aboutissent à la génération d'une chaîne alpha (VJ) et d'une chaîne bêta (VDJ) au cours du développement thymique. Chez l'homme, il existe 54 gènes V alpha, 61 J alpha et 1 C alpha ainsi que 64-67 V bêta, 2 D bêta, 14 J bêta et 2 C bêta.¹⁴ La recombinaison s'effectue par les enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2 (*Recombination Activation Genes*) grâce aux séquences du signal de recombinaison [RSS]. Lors de ce processus, des nucléotides peuvent être ajoutés. La région hypervariable CDR3 est ainsi créée. Elle est cruciale dans la reconnaissance de l'Ag. Cette variabilité de génération des chaînes, associée à la variabilité d'appariement entre les chaînes $\alpha\beta$ produit théoriquement plus de 10^{15} lymphocytes T différents¹⁵. Ces LyT peuvent reconnaître la grande

majorité d'Ag étrangers présentés. La région V va permettre la reconnaissance de l'antigène et va être à l'origine du polymorphisme des TCR. Elle-même possède des régions hypervariables CDR (pour « *Complementary Determining Region* ») qui sont les zones de contact avec l'antigène, une région C, une région transmembranaire et une région intracytoplasmique qui est très courte. Il existe 2 types de TCR : 95 % des lymphocytes T ont un TCR formé de 2 chaînes $\alpha\beta$ et 5 % des lymphocytes T ont un TCR formé de 2 chaînes $\gamma\delta$.

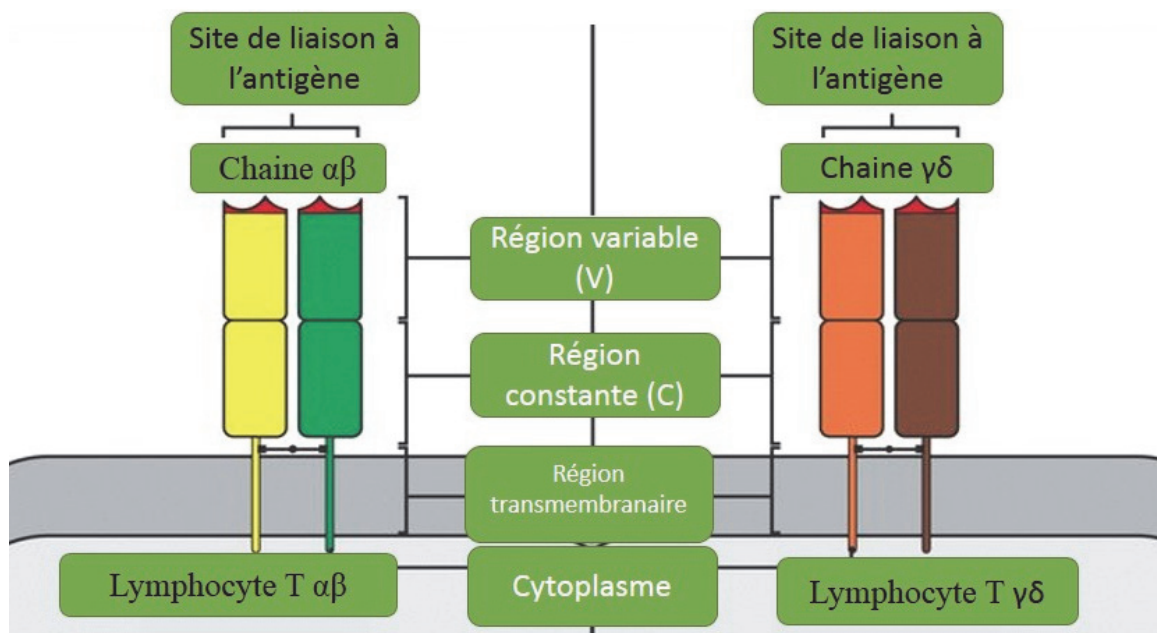


Figure 4 : T cell receptor TCR ou le récepteur à l'antigène du lymphocyte T 16

Le complexe CD3 est toujours associé au TCR. Il n'est pas polymorphique au sein de l'espèce humaine. Les chaînes du complexe ne possèdent pas de sites de liaisons à un ligand, mais jouent un rôle de transmission du signal d'activation du TCR lorsque celui-ci rentre en contact avec les peptides antigéniques présentés sur le CMH. Comme schématisé dans la figure 3, le CD3 est composé de la chaîne γ , la chaîne δ et les deux chaînes ϵ possèdent chacune un domaine extra-cytoplasmique et une région transmembranaire longue présentant des motifs d'ITAM (Motif d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine en anglais *immunoreceptor tyrosinebased activation moti*). Le CD3 est sous forme de modules dimériques, $\delta\epsilon$, $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$ ¹⁷, la partie transmembranaire contient deux résidus tyrosine séparés par 9 à 12 acides aminés. Trois sont portés par CD3 ζ , et un par chacune des autres chaînes : CD3 γ , CD3 δ et CD3 ϵ . La phosphorylation de ces motifs par des protéines kinase de la famille Src conduit au recrutement

et l'association de la tyrosine kinase appartenant à la famille Syk, ZAP70 (*zeta associated kinase*). Cette association s'effectue grâce à la reconnaissance, par deux domaines présents dans ZAP-70 (les domaines SH2), ainsi ZAP-70 est phosphorylée, activée et peut alors phosphoryler à son tour l'adaptateur LAT (lien pour l'activation des lymphocytes T, en anglais Linker for Activation of T-Cells)¹⁸ ainsi la phosphorylation des tyrosines de LAT entraîne le recrutement de protéines de signalisation, ainsi un complexe multi protéique organisé autour de LAT et la membrane cytoplasmique qu'initie l'activation des voies de signalisation aboutissant à l'activation des lymphocytes T.

Ensuite, Les molécules CD4 et CD8 sont des déterminants majeurs des lymphocytes T et permettent de distinguer en périphérie des lymphocytes auxiliaires exprimant la molécule CD4 et des lymphocytes cytotoxiques exprimant la molécule CD8. Ces molécules co-récepteurs pour le TCR, également importantes pour distinguer les différents stades de maturation des thymocytes au cours de l'ontogénie, appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les molécules CD4 et CD8 stabilisent l'interaction CMH/ TCR en interagissant avec une partie faiblement polymorphe du CMH et participent à la signalisation intra-cellulaire en recrutant des kinases de type Src, les protéines p56lck¹¹.

Parfois les molécules CD4 et CD8 sont absentes comme dans les lymphocytes gamma delta mais également dans une population de lymphocytes minoritaires nommées LTDN $\alpha\beta$.

Ces LTDN $\alpha\beta$ ainsi que les étiologies associées à leurs augmentations représentent la problématique de ma thèse, de ce fait nous y consacrerons une partie spécifique qui fera un point bibliographique sur les connaissances actuelles des LTDN $\alpha\beta$.

B. Les LTDN $\alpha\beta$

Après avoir rappelé l'historique de la découverte des lymphocytes TDN $\alpha\beta$, nous décrivons dans cette partie les hypothèses sur l'origine de ces lymphocytes et les étiologies associées à leurs augmentations dans la circulation sanguine. Les éléments de la littérature associés à leur rôle potentiel seront rapportés en lien avec les différentes étiologies connues.

1. Historique de découverte des LTDN $\alpha\beta$

Cela a commencé en 1976, lorsque des souris porteuses de la mutation *lpr* ont été développées par hasard par Murphy et Roth. Ces souris MRL/*lpr* (Murphy roths large lymphoprolifération) ont permis l'étude des gènes régulant le développement de la maladie lupique dans des souches de souris prédisposées. Les chercheurs ont alors observé une lymphoprolifération massive de lymphocytes T. En 1984, une autre mutation récessive qui mène à un phénotype semblable à *lpr* a été découverte et désignée « mutation *gld* ». (lymphoprolifération généralisée en anglais *generalized lymphoproliferative disease*). Cette lymphoprolifération observée chez les souris *lpr* et *gld* s'est révélée par la suite être due à une accumulation massive de LTDN $\alpha\beta$ dans les organes lymphoïdes secondaires comme l'on montré Morse et al. en 1982, puis Davidson et al. en 1986. Une maladie humaine phénotypiquement similaire a été décrite par Sneller et al en 1992 et appelée syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns (ALPS). L'origine des lymphocytes TDN $\alpha\beta$ associées à ce phénotype reste cependant controversée, même si le défaut d'apoptose médiée par Fas a déjà été identifiée il y a plus de deux décennies comme la cause principale de leurs accumulations

2. L'origine et le processus de génération des LTDN $\alpha\beta$

En ce qui concerne l'origine des LTDN $\alpha\beta$. L'expression des marqueurs de surface est hétérogène, de même que le profil des cytokines sécrétées. Ceci donne à penser que la population est hétérogène et que des origines ou des voies de différenciations différentes peuvent exister. En fait, l'affiliation précise de la lignée des LTDN reste incertaine et peut être différente entre les espèces (humains vs souris)¹⁹. La plupart des données disponibles proviennent de systèmes murins²⁰. Au final, deux hypothèses ont été avancées dans la littérature concernant le processus de générations des LTDN $\alpha\beta$, la première est intrathymique où se produit une génération non réversible de LTDN $\alpha\beta$ naïf et la seconde est extrathymique dont la génération non réversible ou réversible (en fonction du mécanisme de génération) de LTDN $\alpha\beta$ matures effecteur ou régulateurs.

i- La génération intrathymique des LTDN $\alpha\beta$

Le processus de générations des LTDN $\alpha\beta$ intrathymique est le résultat d'un réarrangement du gène TCR $\alpha\beta$ ²¹, qui donnera naissance à des LTDN $\alpha\beta$ naïfs²². Au cours du développement « normal » des lymphocytes T, les thymocytes subissent plusieurs étapes de différenciation, qui

comprennent quatre stades « double négatif » (thymocytes DN) chez la souris et trois chez l'homme²³. Après avoir passé ces étapes DN, les thymocytes murins se différencient par la suite via le stade simple positif immature CD8+ en cellules CD4 + CD8 + « double positif » (DP), avant de finalement s'engager dans l'expression exclusive de CD4 ou CD8 (Figure 5). Les thymocytes DN humains mûrissent via le stade simple positif immature CD4+ dans les cellules DP²⁴.

L'engagement de la lignée TCR $\alpha\beta$ ou TCR $\gamma\delta$ chez la souris et l'homme²⁵ est le résultat d'un réarrangement complexe du gène TCR²⁶. Chez la souris, les stades plus tardifs des thymocytes DN (DN3) au cours de la différenciation des lymphocytes T ont été suggérés pour donner lieu à des LTDN $\alpha\beta$ ou LTDN $\gamma\delta$, en fonction de la force du signal TCR²⁷. (Figure. 5A). Entre autres, les thymocytes DP murins peuvent donner naissance à des LTDN $\alpha\beta$ qui migrent ensuite vers l'épithélium intestinal pour devenir des résidents intraépithéliaux²⁸ (Figure. 5B).

De plus, la présentation in vitro de ligands de haute affinité aux thymocytes DP par les cellules épithéliales corticales du thymus a abouti à une différenciation immunorégulatrice^{29 30} des thymocytes DP en LTDN $\alpha\beta$ ^{31 32}. Ainsi, le mécanisme moléculaire à l'origine de la génération de ces derniers débute par le recrutement d'élément modulateur comme le CREM α ^{33 34} (détaillé par la suite)³⁵, ce qui permet un réarrangement de la chromatine régulant ainsi l'accessibilité des gènes spécifiques du CD4 et du CD8 aux facteurs de transcription (Éléments amplificateurs 8)³⁶ par un mécanisme de méthylation de l'ADN et la modification des histones. Ainsi, quatre éléments génomiques dans le modèle murin et six éléments dans le gène CD8 humain avec une sensibilité à la DNase spécifique à la lignée ont été identifiés³⁷. Dans les modèles murins transgéniques, au sein du gène CD8 (E8I – E8IV)³⁸ et le CREM α jouent un rôle clé pour permettre l'expression de CD8 spécifique, les éléments amplificateurs E8I – E8IV subissent un remodelage pendant le développement des lymphocytes³⁹, autorisant ou mettant fin à l'expression de CD8 alpha et/ou CD8 bêta, ainsi la présence d'E8 et le faible degré de méthylation de l'ADN le long du cluster de gènes CD8 dans les lymphocytes T CD8 + permet l'expression des gènes CD8, alors que l'absence de E8 et des niveaux accrus de méthylation de l'ADN interdisent l'expression des gènes CD8 ce qui génère des LTDN $\alpha\beta$ ^{40 41}. Ils migrent alors vers l'épithélium intestinal⁴² et deviennent résidents intraépithéliaux⁴³.

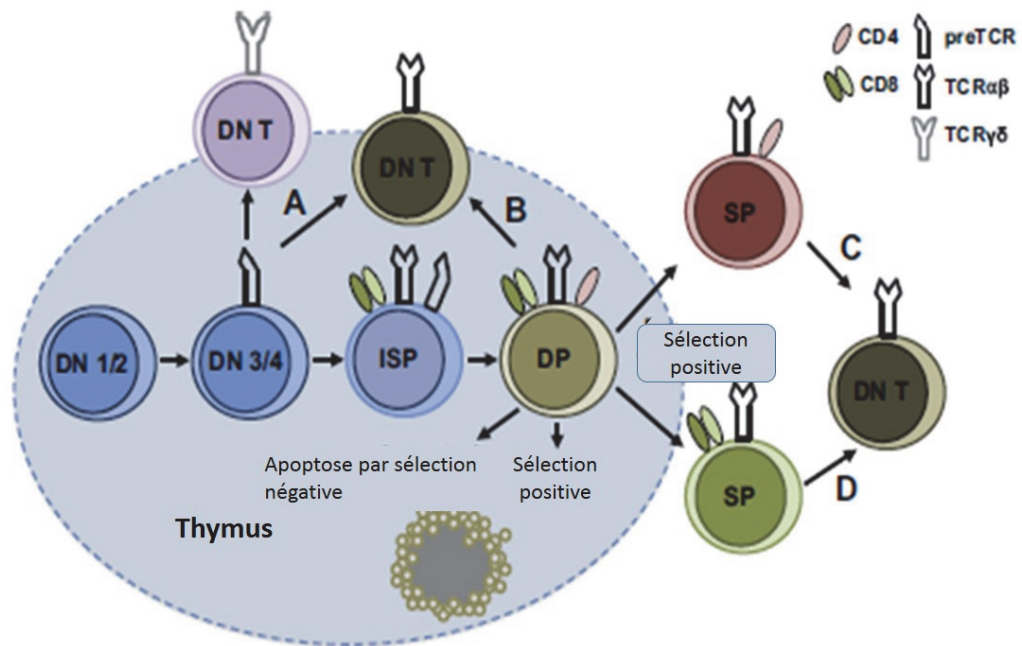


Figure 5 :

Les LTDN⁴⁴thymique. Les «cellules positives simples» (SP) matures à la périphérie (cellules T CD4 + ou CD8 +) dérivent des cellules CD4 + CD8 + «double positif» (DP) cellules qui dérivent de thymocytes simples positifs immature (ISP). (A) Les thymocytes doubles négatifs (DN3) de stade avancé peuvent donner lieu à des LTDN $\alpha\beta$ et des LTDN $\gamma\delta$. (B) Alternativement, LTDN peuvent dériver du Thymocytes DP qui migrent ensuite vers l'épithélium intestinal. Les cellules DN T peuvent dériver de lymphocytes T CD4 + périphériques activées (C) et / ou (D) CD8

ii- Génération indépendante du thymus « extrathymique » des LTDN $\alpha\beta$

À la suite d'études chez l'homme et dans des modèles murins *lpr* et *gld*, une deuxième affiliation dite « extrathymique » des LTDN $\alpha\beta$ a été suggérée⁴⁵. Plusieurs éléments de preuve soutiennent que les LTDN $\alpha\beta$ régulateurs ou effecteurs peuvent dériver à partir de LyT CD4 + et/ou CD8 + périphériques activés. Zhang et al. ont montré que les LyT CD4 périphériques murins matures (CD25 + / Foxp3 + et les cellules T CD25- / Foxp3-) peuvent dériver en LTDN $\alpha\beta$ restreintes au CMH II *in vitro* et *in vivo* et exercent une fonction de régulation. La force du signal de stimulation, les antigènes présentés par les cellules dendritiques, la durée de la stimulation et le milieu des cytokines (IL-2 et IL-15 vs IL-4) jouent un rôle important dans cette voie de différenciation des LyT CD4+ en LTDN $\alpha\beta$ régulateurs. Ces derniers peuvent supprimer des réponses allo-immunes spécifiques *in vivo*^{46,47}, ainsi que des réponses impliquant les LyT CD8+, les LyT CD4+⁴⁸, les lymphocytes B⁴⁹, les cellules NK⁵⁰ et les cellules dendritiques (DC). Trois profils phénotypiques de LTDN $\alpha\beta$ régulateurs ont été observés et sont représentés

sur le tableau 2⁵¹. En 2013, Grishkan et al. ont démontré *in vitro* que par stimulation de LyT CD4+ auxiliaires spléniques murins, ces derniers pouvaient se transformer en LTDN $\alpha\beta$, mais le mécanisme détaillé de cette conversion n'est à ce jour pas connu⁵².

LTDN $\alpha\beta$ régulateurs	Phénotype	References
	CD25+CD30+CD28low	Zhang ZX et al. ⁵³
	CD25+CD28+CD44+CD69+	Zhang D et al. ⁵⁴
	CD25-CD27+CD28low	Fischer K et al. ⁵⁵

Tableau 2 : Profils phénotypiques des LTDN $\alpha\beta$ régulateurs

Les LTDN $\alpha\beta$ peuvent aussi dériver de LyTCD8 + périphériques activées par la régulation négative de l'expression du co-récepteur de surface CD8. C'est d'ailleurs probablement un mécanisme majoritaire comme le montre plusieurs études^{56 57} Plusieurs mécanismes moléculaires^{58 59} sont impliqués dans la transformation de ces derniers. Parmi les molécules impliquées, on notera le rôle du CREM α (modulateur d'élément réactif alpha) qui est de réguler le cluster CD8 dans les LyT CD8 + périphériques en réponse à l'activation du TCR. Il participe également à la régulation de la chromatine (remodelage) en recrutant l'ADN méthyltransférase (DNMT) 3a et l'histone méthyltransférase G9a lors de l'amorçage et de la différenciation des LyT CD8+. Le Runt-related transcription factor 3 (RUNX 3) peut également influencer le paysage épigénétique du LyT CD8 + activées chez la souris. Ainsi, le maintien de l'expression du CD8 dépend de RUNX3 et du RUNX/Core au niveau du gène CD8. RUNX3 et RUNX/Core recrutent l'élément activateur E8I⁶⁰. L'absence d'E8I⁶¹ entraîne un remodelage de la chromatine ce qui va aboutir à la non-expression du CD8^{62 63 64}. Ainsi, E8I peut subir un remodelage épigénétique ordonné par CREM α et/ou de RUNX3 en réponse à l'activation du TCR. Ce qui provoque la non-expression du CD8 et génèrent des lymphocytes de type LTDN $\alpha\beta$ (Figure 6).

De plus, une étude récente de Harland et al a lié la perte d'expression de CD8 dans les LyT CD8 des souris OT-I (qui est un modèle murin transgénique contenant des inserts transgéniques au sein du TCR utilisé pour étudier le rôle des peptides dans la sélection positive et la réponse des cellules T CD8 + à l'antigène) à l'activation de STAT6 induite par l'IL-4 *in vitro* et *in vivo*⁶⁵. Cette activation orchestre la répression transcriptionnelle de gène CD8 et la méthylation de l'ADN soit directement, soit par induction de l'expression de GATA3⁶⁶. Cette répression est réversible en présence d'IFN- γ ⁶⁷.

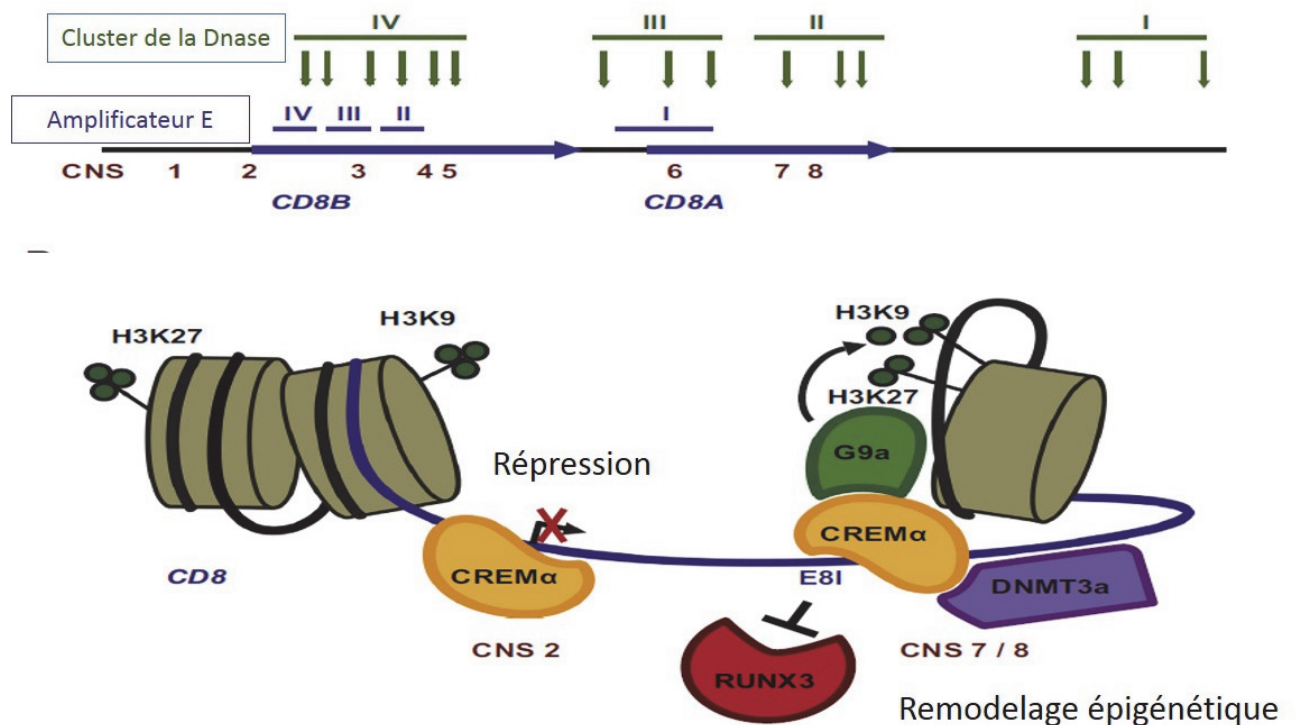


Figure 6 : Régulation transcriptionnelle et plasticité épigénétique du cluster de gènes CD8⁶⁸. (A) Carte schématique du groupe de gènes CD8 murin. Les sites hypersensibles de la DNase I (HSS) I-IV et les éléments activateurs de régulation de l'expression de CD8 E8I-E8IV 8 régions non codantes, les séquences (CNS1 – CNS8), définies comme des régions de 200 pb avec 70% d'homologie entre le génome humain et murin, sont représentées ci-dessous et cartographiées en DNase sites d'hypersensibilité et éléments amplificateurs. Le Modèle de régulation à médiation CREM α de l'expression de CD8 « CREM α » contrôle l'activité transcriptionnelle par transrépression du CD8. De plus, CREM α recrute aux éléments régulateurs et co-recrute DNMT3a et l'histone méthyltransférase G9a dans le cluster CD8 (CNS 2,7,8). G9a intervient dans méthylation de l'histone H3 à H3K9 et H3K27. La méthylation de l'ADN et des histones qui en résulte aboutit à la non-expression du CD8

Ainsi, les LTDN $\alpha\beta$ intrathymique naïfs dérivent soit des thymocytes doubles négatifs tardifs, soit des thymocytes DP (plus précisément des thymocytes immature simple positif), mais les LTDN $\alpha\beta$ extrathymique dérivent principalement des lymphocytes TCD8 par un phénomène de non-expression réversible chez l'homme du CD8 orchestré par le CREM α , RUNX3 ou STAT6⁶⁹

C. Les étiologies associées à l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$

Nous décrivons ici les étiologies associées à l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$ par entités clinico-biologiques. Premièrement, nous allons commencer par la transplantation d'organes solides et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Nous poursuivrons ensuite par les néoplasies, les infections et les maladies auto-immunes. Le rôle fonctionnel des LTDN $\alpha\beta$ sera abordé en rapport avec leur contexte étiologique.

1. La transplantation et la greffe :

Les LTDN $\alpha\beta$ sont augmentés chez les patients ayant subis une transplantation d'organes solides ou une allogreffe de cellules souches hématopoïétique chez en moyenne 5 à 7% des patients selon les études. Ces LTDN $\alpha\beta$ ont été associés à une fonction suppressive allospécifique dans les allogreffes⁷⁰. Ils suppriment également les Lymphocytes T anti-donneurs CD8 + et CD4 + d'une manière spécifique et prolongent la durée de vie l'allogreffe (l'organe transplanté)^{71 72}. Il a été montré que ces LTDN $\alpha\beta$ reg régulent négativement la réponse immunitaire allogénique médiée par les lymphocytes T CD4 + et CD8 + *in vitro* et *in vivo*⁷³. De plus, ils ont une capacité unique d'acquérir l'ensemble du complexe CMH-allo-antigène à partir de la membrane cellulaire des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par le biais d'une interaction cellule-contact-dépendante du TCR via un processus appelé « trogocytose » dans les modèles murins et d'exprimer le complexe capturé CMH-allo-antigène à leur surface⁷⁴. Le LyT CD8+ effecteur se lie alors au complexe capturé CMH-allo-antigène qui est présenté par les LTDN $\alpha\beta$ reg, ce qui aboutit à la transmission d'un signal d'apoptose au LyT CD8+⁷⁵. Par conséquent, la suppression des LyT CD8+ par les LTDN $\alpha\beta$ reg est spécifique à l'antigène (Figure 7). Ma et al. ont en plus constaté que les LTDN $\alpha\beta$ reg induisent une apoptose des lymphocytes B et des cellules dendritiques par la cytolysse médiée par la perforine^{76 77} ou par fas/fas1^{78 79 80}.

Chez l'homme, les LTDN $\alpha\beta$ regs humains ne provoquent pas d'apoptose⁸¹, mais une inactivation réversible. Ainsi la fonction des lymphocytes T effecteurs peut être restaurée une fois que les LTDN $\alpha\beta$ reg sont supprimés. Dans l'étude de McIver et coll. comprenant 40 patients qui ont reçu une transplantation d'organes, le pourcentage de LTDN $\alpha\beta$ regs dans le sang périphérique était inversement corrélé avec le risque de rejet de greffe⁸². Ainsi, il semble que les LTDN $\alpha\beta$ reg améliorent la survie post-transplantation et réduisent le risque de rejet.

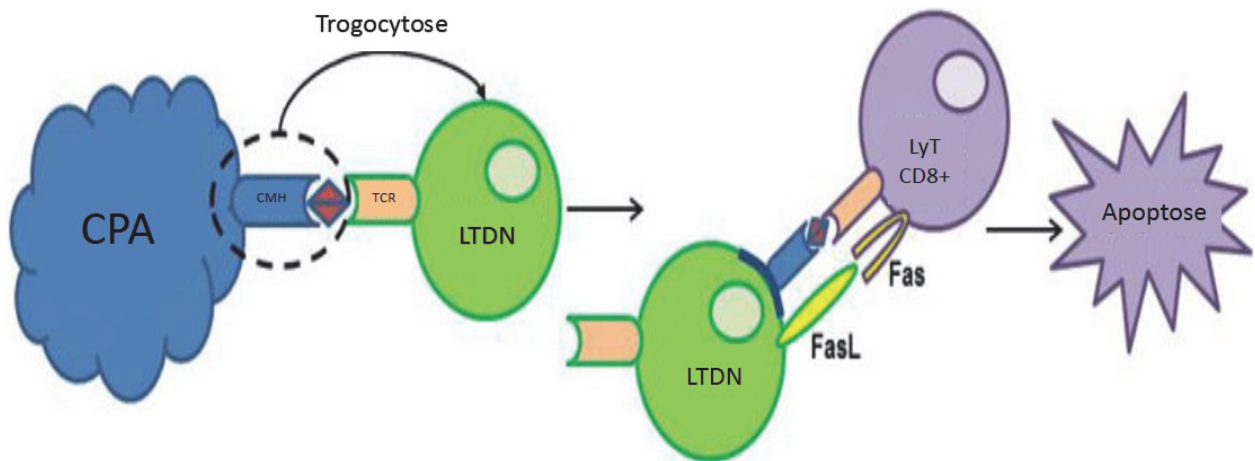


Figure 7 : « Trogocytose » mécanisme de suppression médiée par les lymphocytes T doubles négatifs le complexe allo-antigène CMH sur les cellules présentatrices d'antigène (CPA) engage le récepteur des cellules T (TCR) sur les Tregs à double négatif (DN). Ceci est suivi par la libération du complexe CMH/antigène par le CPA et la capture du complexe CMH/antigène par le Treg DN qui intègre le complexe dans sa membrane cellulaire. Les Tregs DN expriment ce complexe CMH/antigène capturé sur leur surface cellulaire. Les cellules T CD8 + portant le TCR apparenté engagent le complexe CMH/antigène sur les Tregs DN qui transmettent ensuite un signal apoptotique via FasL sur les Tregs DN via le récepteur Fas sur les cellules T CD8 +. Les lymphocytes T effecteurs CD8 + subissent une apoptose et sont supprimés.⁸³

Plusieurs données concernent plus spécifiquement le contexte des greffes de cellules souches hématopoïétiques^{84 85}. Dans ce contexte, le phénomène de tolérance est très utile pour prévenir les complications sévères de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD). Maciejewski et al. ont étudié le rôle potentiel des LTDN $\alpha\beta$ regs après une allogreffe chez l'homme sur la GVHD et la restauration du répertoire des récepteurs des LyT dans une cohorte de 40 patients avec donneurs HLA appariés. Ils ont constaté qu'une baisse ou absence de LTDN $\alpha\beta$ reg était associée à une fréquence accrue de GVHD, suggérant que les LTDN $\alpha\beta$ reg participent à la tolérance périphérique pour prévenir la GVHD post- allogreffe⁸⁶. Haige Ye et al⁸⁷ ont démontré que la reconstitution des LTDN $\alpha\beta$ reg avait un effet significatif sur la GVHD avec une corrélation inversement proportionnelle à 60 jours après l'allogreffe permettant ainsi d'éviter les manifestations graves de GVHD et de rechute. Pour finir, dans un modèle murin de greffe allogénique de moelle osseuse, les LTDN $\alpha\beta$ reg ont permis la survie du greffon par la suppression des cellules NK par la perforine et par la voie fas-fasL dépendante⁸⁸.

Au-delà des situations allogéniques des greffes, des augmentations des LTDN $\alpha\beta$ ont été observées dans des contextes néoplasiques (cancers solides et onco-hématologiques).

2. Néoplasie

Les LTDN $\alpha\beta$ sont élevés chez les patients présentant un contexte néoplasique chez environ 4 à 9% des patients⁸⁹. Les LTDN $\alpha\beta$ ont démontré une activité antitumorale suggérant une participation de LTDN $\alpha\beta$ effecteurs et régulateurs. Young et al. ont démontré que l'injection de LTDN $\alpha\beta$ était suffisante pour empêcher la croissance d'un cancer solide ou d'un lymphome. Merims et al. ont également démontré que l'activité antitumorale des LTDN $\alpha\beta$ peut s'étendre à de nombreuses néoplasies comme le mélanome.⁹⁰

Il faut cependant distinguer nettement dans le contexte des hémopathies malignes les augmentations de populations de LTDN $\alpha\beta$ réactionnelles (régulateurs ou effecteurs comme pour les tumeurs solides) **de LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux pathologiques** qui sont constitutifs de la pathologie lymphomateuse.

i. Lymphome non hodgkinien LNH

Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) ou hémopathies lymphoïdes sont des proliférations malignes développées à partir de précurseurs cellulaires présents dans les organes lymphoïdes primaires (lymphoblastes B ou T d'origine médullaire ou thymique), ou de précurseurs plus matures essentiellement extramédullaires, présents dans les organes lymphoïdes secondaires (lymphocytes B aboutissant aux plasmocytes, et T). On y distingue la maladie de Hodgkin (M de H), les lymphomes malins non Hodgkiniens (LMNH) B ou T.

(1) Lymphomes présentant des LDNT $\alpha\beta$ monoclonaux :

Les LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux ont été décrit dans le Mycosis fongoïde qui est le lymphome T cutané le plus fréquent, le lymphome hépatosplénique à cellules T (HSTL) et la leucémie-lymphome à cellules T de l'adulte due au rétrovirus HTLV-1 (ATLL)

(a) Mycosis fongoïde (MF)

La mycose fongoïde est le sous-type le plus courant de lymphome cutané à cellules T. Il représente moins de 1 % de tous les lymphomes non hodgkiniens, présente un large éventail de variantes cliniques, histologiques et phénotypiques avec différents impacts pronostiques. L'immunophénotype classique est le lymphocyte T à mémoire CD3 +/CD4 +/CD45RO +, mais il existe des formes rares constituées avec des LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux, il ne semble pas conférer une signification pronostique différente⁹¹. Au total, 34 cas de MF constitués de LTDN $\alpha\beta$ ont

été rapportés dans la littérature⁹²⁻⁹³. L'histopathologie est la même que celle du type conventionnel, mais les patients étaient plus jeunes au moment du diagnostic. Hodak et al.⁹⁴ ont rapporté que la plupart des cas de MF à LTDN $\alpha\beta$ étaient cliniquement de type hypopigmenté⁹⁵.

(b) Lymphome hépatosplénique à cellules T (HSTL)

Le lymphome à cellules T hépatosplénique est un lymphome rare avec une présentation clinique de type hépatosplénomégalie sans adénopathies significatives⁹⁶. Ce lymphome n'a pas de traitement standardisé et le pronostic est mauvais avec une durée de survie varie largement de 0 à 5 ans. La maladie survient principalement chez les jeunes adultes, en association avec un contexte d'immunosuppression à long terme. Principalement chez les transplantés d'organes solides ou chez des patients traités par l'azathioprine et l'infliximab pour la maladie de Crohn⁹⁷. Les cellules du lymphome sont généralement CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD5⁻, CD7⁺, CD8⁻ CD42⁺, CD52⁺, CD76⁺, CD82⁺ avec une expression du TCR gamma-delta dans la plupart des cas. Cependant, une dizaine de cas présentaient un phénotype de LTDN $\alpha\beta$ ⁹⁸ sans avoir une présentation clinique ou de pronostic différentes⁹⁹.

(c) Leucémie-lymphome à cellules T de l'adulte due au rétrovirus HTLV-1 (ATLL)

La leucémie-lymphome T de l'adulte (ATLL) liée au rétrovirus HTLV-1 (Human T Leukemia Virus 1) est une prolifération maligne de lymphocytes T et affecte généralement les adultes. L'infection par HTLV 1 est limitée aux cellules T. La transformation leucémique des lymphocytes induite par HTLV 1 n'est pas entièrement caractérisée. L'ATLL est de mauvais pronostic, avec une médiane de survie de moins de 1 an même après utilisation de polychimiothérapie¹⁰⁰. L'ATLL est endémique dans le sud-ouest du Japon, le bassin des Caraïbes et certaines parties de l'Afrique centrale. Sa distribution est liée à la prévalence de l'infection par le HTLV. L'immunophénotype des cellules de l'ATLL est celui des lymphocytes T matures activés exprimant CD2 et CD5 et est généralement CD4⁺/CD8⁻. Le récepteur CD3 et le TCR $\alpha\beta$ peuvent être régulés à la baisse et le CD7 est négatif. La forte expression de la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine-2 reconnue par l'anticorps monoclonal CD25 est une caractéristique distinctive¹⁰¹. Selon Sukumaran et al quelques cas d'ATLL à LTDN $\alpha\beta$ sont décrits, ainsi l'évaluation en CMF du sang périphérique montre un phénotype : CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD5⁻, CD7⁻, CD8⁻, CD25⁺, CD56⁻, CD34⁻, Tdt⁻, CD64⁻, TCR $\alpha\beta$ ¹⁰², l'expression de CD3 et le manque de Tdt exclut un phénotype de cellule T immature dans ces cas doubles

négatifs. Ces ATLL composés de LTDN $\alpha\beta$ n'ont ni une présentation clinique ni un pronostic différent des ATLL¹⁰³.

Dans cette partie nous avons décrit les lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux pathologiques, mais on observe également dans le lymphome B, T (non composé de LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux) et les pathologies myéloïdes chroniques ou aiguës, des LTDN $\alpha\beta$ non pathologiques, mais qui sont réactionnels avec une activité régulatrice et/ou effectrice pour lutter contre la cellule pathologique comme dans les cancers solides.

ii. Les cancers solides associés à l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$

Les LTDN $\alpha\beta$ sont élevés chez environ 6% des patients avec un cancer solides¹⁰⁴. Ces LTDN $\alpha\beta$ sont généralement réactionnels à la pathologie. Ainsi, dans les cancers solides, les LTDN $\alpha\beta$ ont principalement une activité anti-tumorale (LTDN $\alpha\beta$ effecteurs). Parmi les différents cancers, nous avons pris comme exemple le cancer du pancréas. La majorité des patients atteints de cancer du pancréas sont diagnostiqués au stade métastatique avec un taux de survie à cinq ans est inférieur à cinq pour cent¹⁰⁵. De manière intéressant, l'étude de l'activité anticancéreuse des LTDN $\alpha\beta$ ¹⁰⁶ contre les cellules cancéreuses pancréatiques démontrent que¹⁰⁷ les LDNT $\alpha\beta$ effecteurs inhibent de manière significative la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques par effet apoptotique (Fas/FasL). Un niveau augmenté de FAS et FASL est observé¹⁰⁸ dans ce contexte.

3. Les infections

Généralement durant les épisodes infectieux à germes intracellulaire, on observe une augmentation des LTDN $\gamma\delta$, mais dans de rares cas, il a pu être également mis en évidence une augmentation de LTDN $\alpha\beta$. Dans ce contexte, les LTDN $\alpha\beta$ effecteurs (comme dans les cancers solides) induisent une apoptose des cellules infectées avec un niveau d'expression sensiblement augmenté de FAS et FASL. Prenons comme exemple la leishmaniose¹⁰⁹. Les LTDN $\alpha\beta$ ont été étudiés dans la leishmaniose à *Leishmania braziliensis* qui infecte le derme, les macrophages et cellules dendritiques, provoquant une inflammation intense des tissus et un ulcère cutané. Ces lésions peuvent guérir spontanément ou après un traitement antimoine (traitement classique de la leishmaniose). La résolution des lésions dépend d'une réponse immunitaire adaptative. Les analyses de cytométrie en flux ont révélé une augmentation fréquente des LTDN $\alpha\beta$ qui accompagne l'augmentation des LyT NKT. Ainsi, l'activité de

cytotoxique qui se produit au niveau des lésions des patients n'est pas exclusivement dû au LyT NKT, mais également aux LTDN $\alpha\beta$ qui jouent un rôle effecteur par effet apoptotique sur les cellules infectées¹¹⁰.

4. Les maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes (MAI) découlent d'un processus de rupture de la tolérance au soi résultant en un dysfonctionnement du système immunitaire conduisant ce dernier à s'attaquer aux constituants normaux de l'organisme. C'est par exemple le cas dans le lupus ou le psoriasis qui aboutissent généralement à la destruction tissulaire et/ou une atteinte systémique.¹¹¹ Dans ce contexte, des augmentations de LTDN $\alpha\beta$ ont été décrites chez 2 à 8% des patients. De manière générale, leur rôle contrairement aux étiologies précédentes a été associé à la pathogenèse des MAI par la production d'IL-17 et/ou la stimulation des lymphocytes B. Pour illustrer ces mécanismes, nous allons détailler l'implication des LTDN $\alpha\beta$ dans le LED, le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGC) et le psoriasis.

i- Le lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique induite par des réponses immunitaires inappropriées aux auto-antigènes¹¹², entraînant une inflammation systémique et des lésions organiques¹¹³. Divers sous-ensembles de LyT, dont les LyT auxiliaires CD4+, contribuent à la physiopathologie, aux lésions tissulaires et à l'expression de la maladie. Les LTDN $\alpha\beta$ ont été observés chez les patients atteints de LED. Les premières publications ont montré une contribution des LTDN $\alpha\beta$ à l'inflammation des tissus, et un envahissement des tissus rénaux des patients atteints de néphrite associée au LED¹¹⁴. Dans ce contexte, ils produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-17A. L'élément modulateur (CREM) α comme détaillé précédemment, contribue à la régulation négative de l'expression de CD8 et à la génération subséquente de LTDN $\alpha\beta$. Chez les patients atteints de LED l'expression du CREM α ainsi que l'IL-17 sont augmentés. De plus, les LTDN $\alpha\beta$ contribuent à la production des anticorps anti-ADN doubles brins par les lymphocytes B¹¹⁵ par l'augmentation de l'expression de la cible de la rapamycine (mTORC1) ce qui entraîne la production d'IL-4 par les LTDN $\alpha\beta$ ¹¹⁶. On peut noter que le traitement avec l'inhibiteur de mTOR rapamycine réduit la production d'IL-4 par les LTDN $\alpha\beta$ chez les patients atteints de LED¹¹⁷.

ii- Le syndrome de Gougerot Sjögren

Le syndrome de Gougerot Sjögren (SGC) est une maladie auto-immune systémique caractérisée par une infiltration lymphocytaire des glandes exocrines (salivaires) et des glandes lacrymales qui entraîne une inflammation chronique, des lésions tissulaires et une altération de la fonction sécrétoire. Il peut survenir soit comme une maladie primaire, soit en association à d'autres maladies auto-immunes telles que le LED, la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose systémique. Allunno et al. ont observé une augmentation des LTDN $\alpha\beta$ dans le sang périphérique des patients souffrant de SGC. Les LTDN $\alpha\beta$ infiltrent les glandes salivaires où elles produisent de l'IL17^{118 119}. En plus de l'infiltration des lymphocytes T dans les glandes exocrines, l'hyperactivité des lymphocytes B et la production d'auto-anticorps sont des caractéristiques typiques des SGS. La maturation et l'activation aberrante des lymphocytes B sont au moins partiellement médiées par une expression accrue du facteur d'activation des cellules B (BAFF). La cytokine BAFF est produite¹²⁰ entre autres par les LTDN $\alpha\beta$. Une hypométhylation du gène TNFSF13B (NF Superfamily Member 13b) codant pour le BAFF est observée dans les LTDN $\alpha\beta$.

En résumé, comme dans le LED, les LTDN $\alpha\beta$ contribuent à la pathogenèse des SGS par la production d'IL-17 et/ou à la stimulation des Lymphocytes B pathologiques par la production du BAFF^{121 122}.

iii - Le psoriasis

Le psoriasis est une affection inflammatoire systémique caractérisée par une infiltration des cellules immunitaires de la peau et une prolifération excessive des kératinocytes. Les LTDN $\alpha\beta$ producteurs d'IL-17 ont été liées à une inflammation de la peau dans un modèle murin de psoriasis. Ils infiltrent aussi l'épiderme chez les patients atteints de psoriasis. De plus, les LTDN $\alpha\beta$ des patients atteints de psoriasis présentaient une méthylation réduite de l'ADN d'un élément amplificateur du gène de l'interféron gamma IFN γ , suggérant une accessibilité accrue aux facteurs de transcription¹²³. Les LTDN $\alpha\beta$ contribuent ainsi à l'inflammation de la peau par l'expression des cytokines effectrices inflammatoires IFN- γ ¹²⁴ et IL-17¹²⁵. Récemment certaines hypothèses selon lesquelles les LyT exprimant PD-1 peuvent être des acteurs cruciaux dans les maladies auto-immunes. Des LTDN PD-1⁺¹²⁶ ont été décrits et représentent un sous-ensemble des LyT autoréactif.

Pour conclure, les LTDN $\alpha\beta$ contribuent à la progression des maladies auto-immunes, mais ont une fonction antitumorale, anti-infectieuse, antirejet et anti-GVHD ce qui suggère l'existence de différents sous-types de LTDN $\alpha\beta$ qui restent à déterminer. Une augmentation des LTDN $\alpha\beta$ est également retrouvée dans une pathologie dysimmunitaire particulière, le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS). C'est dans cette pathologie que les LTDN $\alpha\beta$ ont été décrits pour la première fois. De par l'importance de cette population de lymphocytes dans la physiopathologie et la démarche diagnostique de cette pathologie, nous y consacrerons une partie spécifique.

II- Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun **ALPS « Autoimmune Lymphoproliferative** **Syndrome »**

Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) a été décrit il y a plus de 30 ans. C'est un trouble lymphoprolifératif non malin héréditaire caractérisé par des mutations hétérozygotes au sein de la première voie de signalisation du récepteur du signal d'apoptose (FAS). Les défauts dans l'apoptose à médiation par Fas provoquent une expansion et l'accumulation de lymphocytes autoréactifs polyclonaux «LTDN $\alpha\beta$ » dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Ceci entraîne des manifestations auto-immunes qui sont retrouvées chez plus des 2/3 des patients ALPS, le plus souvent sous forme de cytopénie auto-immune. Des atteintes d'organes sont plus rarement observées.¹²⁷ En 2010, Oliveira JB et al. proposé des critères diagnostiques révisés du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) qui sont actuellement appliqués pour le diagnostic de cette pathologie. Nous allons aborder successivement l'épidémiologie, la clinique, la physiopathologie, la démarche diagnostique et la prise en charge de l'ALPS en montrant le rôle important joué par les LTDN $\alpha\beta$.

A. Épidémiologie

La prévalence est assez rare. Le syndrome a été caractérisé chez plus de 500 patients à ce jour, et il a été rapporté au sein de plusieurs groupes ethniques par le monde avec une prédominance masculine. Les patients atteints développent des manifestations cliniques à un âge médian de 11 ans.

B. Caractéristiques cliniques

L'ALPS est cliniquement hétérogène et présente les signes cliniques primaires suivants : une lymphoprolifération de type lymphadénopathie, une hépatosplénomégalie avec ou sans hypersplénisme s'améliorant souvent avec l'âge, une maladie auto-immune impliquant les hématies et une augmentation du risque de lymphome tout au long de la vie.

Les patients atteints développent une hyperplasie lymphoïde non maligne progressive de LTDN $\alpha\beta$ autoréactifs.¹²⁸ La présentation classique est celle d'un adolescent atteint de

lymphadénopathie non infectieuse et non maligne et d'une splénomégalie, présente respectivement dans 95 % et 90 % des cas. L'hépatomégalie est présente dans 50 % des cas. L'accumulation de LTDN $\alpha\beta$ déclenche de nombreux symptômes auto-immuns qui varie selon les patients. La plus fréquente est une cytopénie de type anémie hémolytique auto-immune, qui peut être sévère. Le purpura thrombocytopénique idiopathique est également courant, entraînant des ecchymoses et des saignements excessifs. Une neutropénie auto-immune, qui peut persister même après une splénectomie peut-être également observée. Les cytopénies s'accompagnent souvent d'une augmentation ou d'une diminution concomitante des taux sériques d'immunoglobulines G (70 % des patients). Les implications d'organes solides sont beaucoup moins fréquentes, mais peuvent inclure des atteintes des reins (glomérulonéphrite), du foie (hépatite auto-immune), des yeux (uvéïte), de la thyroïde (thyroïdite), de la peau (éruption urticarienne) et du système nerveux (syndrome de Guillain-Barre).¹²⁹ Les patients atteints d'ALPS ont également un risque considérablement accru de développer des tumeurs malignes secondaires, qui ne diminuent pas avec l'âge et représentent une cause importante de morbidité et de mortalité.¹³⁰ Cela comprend aussi un risque accru de 150 fois pour les lymphomes hodgkiniens et un risque accru de 14 fois pour les lymphomes non hodgkiniens. A l'inverse des lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux, ici les LTDN $\alpha\beta$ resteront polyclonaux¹³¹.

C. Physiopathologie

Les mutations associées à ALPS varient à la fois par le gène affecté et le type de mutation, les mutations FAS sont les plus courantes et montrant une progression à l'ALPS d'environ 60 %¹³². Bien que l'ALPS résulte classiquement de mutations du gène FAS lui-même, plusieurs sous-types ont été proposés, basés sur les gènes causaux et les types de mutations rencontrées. Ils conduisent souvent à des présentations et des issues similaires. Ils incluent l'ALPS-FAS, l'ALPS-FASLG (gène *FASL*), l'ALPS-CASP10 (gène *CASP10*) et l'ALPS-U (anomalie génétique indéterminée)

Pour introduire cette partie, nous ferons un bref rappel sur le FAS, FAS ligand et leurs variants pathogènes ainsi que le processus d'apoptose lymphocytaire médié par Fas.

Le gène FAS comprend neuf exons. Les exons 1 et 2 codent pour une séquence signal qui, lors du trafic de la protéine Fas vers la surface cellulaire, est clivée. Les exons 3, 4 et 5 codent pour trois domaines extracellulaires riches en cystéine (CRD). L'exon 6 code pour le domaine transmembranaire. Les domaines intracellulaires de Fas sont codés par les exons 7-

9, l'exon 9 représentant le domaine de mort qui interagit avec la voie de transduction du signal intracellulaire induisant l'apoptose. L'ADN génomique du FAS s'étend sur environ 25 kb. (Figure 8). À ce jour, plus de 130 variantes pathogènes ont été signalées, y compris les variantes faux - sens et non - sens, les défauts d'épissage, les petites suppressions/insertions, les suppressions brutes et les suppressions/duplications complexes. Beaucoup de ces variantes pathogènes sont des allèles de perte de fonction.

La découverte d'individus avec ALPS avec des variantes pathogènes somatiques dans le *FAS* peut offrir de nouvelles perspectives, car la présence de variantes pathogènes dans certains, mais un sous-ensemble de lymphocytes pourrait permettre la dissection des mécanismes moléculaires de l'ALPS d'une manière qui ne peut pas être réalisée chez les individus avec variantes de la lignée germinale dans le *FAS*¹³³.

Produit génique normal *Le FAS* code pour une séquence signal de 16 acides aminés, suivie d'une protéine mature de 319 acides aminés avec un seul domaine transmembranaire et une masse moléculaire d'environ 36 kd.

La protéine codée par le *FAS* est membre de la superfamille des récepteurs du TNF et contient un domaine de mort (DD); il a été démontré qu'il joue un rôle central dans la régulation physiologique de la mort cellulaire programmée. L'interaction de Fas avec son ligand permet la formation d'un complexe de signalisation induisant la mort qui comprend la protéine du domaine de la mort associée à Fas (FADD), la caspase-8 et la caspase-10. Le traitement autoprotéolytique des caspases inductrices dans le complexe déclenche une cascade de caspases effectrices en aval, conduisant à l'apoptose. Il a également été démontré que Fas active NF-kappa β , MAPK3/ERK1 et MAPK8/JNK, conduisant à la transduction de signaux proliférants dans les fibroblastes diploïdes normaux et les lymphocytes T.

Dans le produit génique anormal. Une interférence dominante négative par des chaînes Fas anormales a été démontrée pour des variantes pathogènes hétérozygotes dans le domaine de la mort, ce qui conduit à une apoptose défectueuse médiée par le Fas dans de nombreux cas d'ALPS-FAS¹³⁴. Fas et FasL forment des homotrimères; par conséquent, les trimères Fas normaux (composés de 3 protéines normales) ne se produisent que dans un trimère sur huit, en supposant des quantités égales de protéines Fas mutées et sauvages¹³⁵. Les variantes pathogènes hétérozygotes extracellulaires affectant le domaine de liaison FasL (CRD2 et

CRD3) sont également associées à une interférence dominante négative, les protéines Fas s'auto-associent aux trimères avant l'interaction FasL.¹³⁶

Pour d'autres variantes pathogènes hétérozygotes extracellulaires, y compris les variantes qui affectent le domaine de la protéine qui régule l'auto-association en trimères, l'apoptose défectueuse peut s'expliquer par l'interférence de fragments tronqués et/ou solubles de Fas muté, ou par l'haploinsuffisance, dans laquelle le total de la quantité de Fas générée est inférieur au seuil requis pour l'induction physiologique de l'apoptose¹³⁷

chez les individus présentant des variantes pathogènes homozygotes ou hétérozygotes composites, une apoptose défectueuse médiée par Fas peut être expliquée par une perte de fonction¹³⁸. Contrairement à ceux qui ont des variantes pathogènes hétérozygotes, ces individus présentent une expression de surface absente ou réduite de Fas sur les lymphocytes.

Ensuite, le gène FASL s'étend sur environ 8 ko et comprend quatre exons. À ce jour, moins de dix allèles pathogènes ont été signalés dans *FASLG* en association avec un phénotype ALPS¹³⁹. Dans le cas du produit génique normal, l'ADNc de *FASLG* code pour une protéine de 281 acides aminés. Le ligand Fas (FasL) est une protéine transmembranaire de type II qui appartient à la famille des facteurs de nécrose tumorale. Il est exprimé dans les splénocytes et les thymocytes activés, conformément à son implication dans la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T et dans plusieurs tissus non lymphoïdes (par exemple, les testicules, le foie, les poumons, les ovaires, le cœur), où sa fonction n'est pas claire. Dans le produit génique anormal. L'individu avec la variante homozygote pathogène faux-sens a montré une diminution de la mort cellulaire médiée par Fas et une cytotoxicité dépendante de Fas décrit par Del-Rey et al 2006. La variante pathogène hétérozygote affecte la région de liaison Fas extracellulaire de FASL. La variante produit une protéine FasL interférente dominante qui se lie à FasL de type sauvage, empêchant l'apoptose médiée par Fas¹⁴⁰.

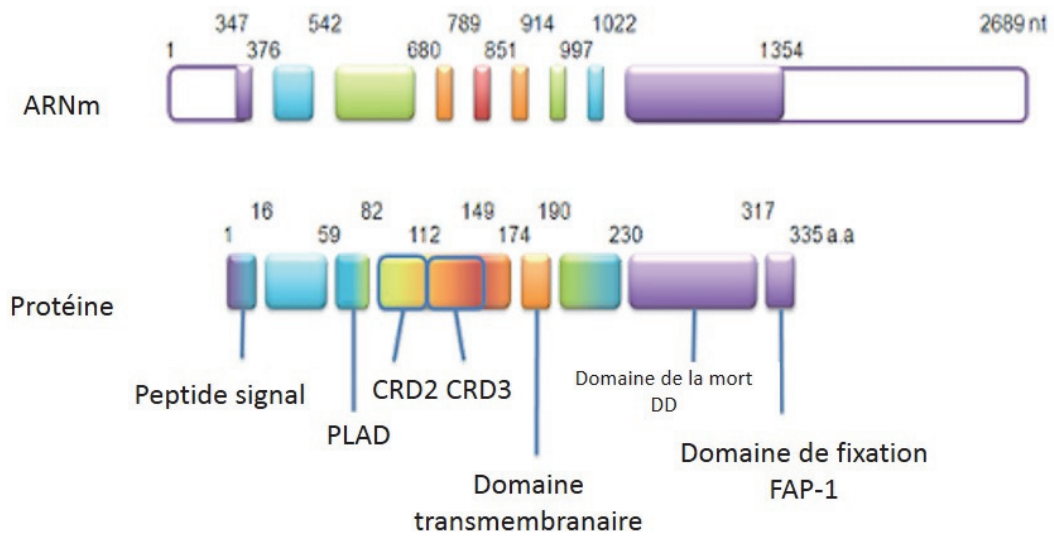


Figure 8 : Structure du gène FAS ¹⁴¹

Dans des conditions normales, l'activation des LyT induit l'expression de FAS Ligand¹⁴² (FASL), qui peut se lier aux récepteurs FAS sur les mêmes cellules ou des cellules voisines. Après l'interaction Fas-FasL, le domaine de mort (DD) de Fas peut interagir avec celui de FADD (Fas associated death domain). Le domaine effecteur de mort (DED) de FADD permet le recrutement des procaspases 8 et 10 qui contiennent chacune deux DED dans leur pro-domaine. La formation du DISC (death inducing signaling complex) entraîne le clivage des procaspases en caspases actives (hétérotétramères des petits et grands domaines). Cette activation peut être bloquée par des concentrations élevées d'analogue inactif de caspase 8. En revanche, en présence d'une faible concentration d'analogue inactive de caspase 8, les caspases 8 et 10 activent la caspase terminal et déclenchent une cascade biochimique aboutissant à la destruction organisée de la cellule par apoptose. Ce processus est connu sous le nom de mort cellulaire induite par activation AICD (**Figure 9**)¹⁴³.

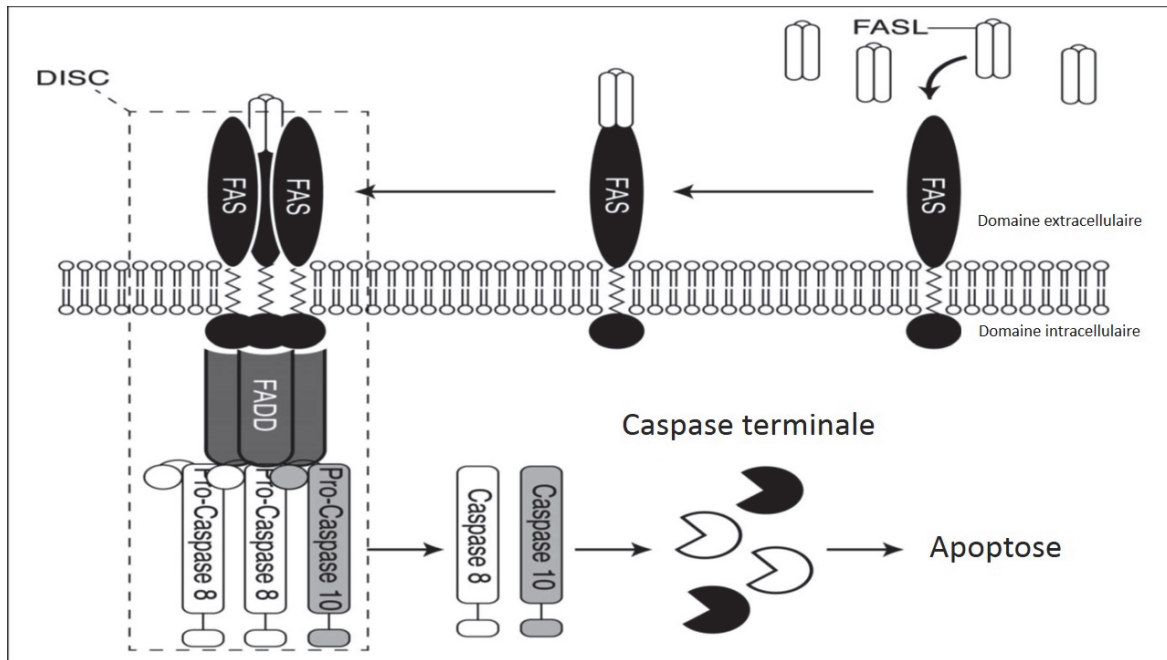


Figure 9 : Diagramme simplifié illustrant la première voie du récepteur du signal d'apoptose (FAS) impliqués dans la mort cellulaire induite par l'activation. FAS ligand (FASL) se lie au FAS Cela recrute une protéine associée au FAS avec le domaine de la mort (FADD) et pro-caspases 8 et 10, qui constituent avec le FAS le complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Le DISC propage alors un signal pro-apoptotique via l'activation des caspases terminales¹⁴⁴.

Chez les individus en bonne santé, les lymphocytes T périphériques qui réagissent avec les auto-antigènes subissent une stimulation répétée, ce qui conduit à une augmentation de la production de Fas ligand (FASL) ainsi que la formation de DISC et AICD¹⁴⁵. La voie Fas-FasL est importante pour la régulation de l'homéostasie lymphocytaire, notamment pour éliminer les lymphocytes effecteurs après stimulation antigénique. L'observation de réponses vaccinales et anti-infectieuses normales et parallèlement de manifestations auto-immunes chez les patients présentant un ALPS suppose que l'action de la voie Fas-FasL est particulièrement importante pour réguler les proliférations induites par des antigènes du soi¹⁴⁶. La production des LTDN $\alpha\beta$ et l'apparition de l'hypergammaglobulinémie ont initialement été observées dans les modèles murins de déficiences en Fas ou FasL. Les LTDN $\alpha\beta$ proviendraient en grande majorité de lymphocytes T CD8 autoréactifs, ou ils sont « mal sélectionnés », qui se convertissent en LTDN $\alpha\beta$ en éteignent l'expression du CD8 et ne peuvent plus être éliminés par la voie Fas¹⁴⁷. Ces LTDN $\alpha\beta$ sont polyclonaux. Par ailleurs, l'activation des lymphocytes T *in vivo* conduit à l'expression de molécules d'activation impliquées dans la collaboration entre lymphocytes T et B, comme le ligand de la molécule CD40. Les lymphocytes B, stimulés par la voie CD40 et le récepteur de l'antigène, ils subissent alors la commutation de classe isotypique ainsi qu'une maturation en plasmocytes. En conséquence, de grandes quantités d'immunoglobulines d'isotype G et A sont sécrétées.

D. Démarche diagnostique

Oliveira JB et al (2010) ont mis en place les critères diagnostiques du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) qui sont actuellement appliqués pour le diagnostic de l'ALPS sont résumés dans le tableau 3. Ceux-ci comprennent des critères obligatoires et accessoires. Les critères obligatoires incluent deux critères. Le premier est clinique avec une ou des adénopathies ou splénomégalie chronique (> 6 mois), non maligne, non infectieuse et le second est un critère immunophénotypique avec la présence de LTDN $\alpha\beta \geq$ à 1,5 % des lymphocytes totaux ou 2,5 % des lymphocytes T en l'absence de lymphopénie¹⁴⁸. Ces critères sont requis pour un diagnostic clinique de l'ALPS et doivent être complétés par critères accessoires dit « primaire » qui incluent la mise en évidence d'un défaut d'apoptose des lymphocytes et une mutation pathogène somatique ou germinale dans le gène FAS, FASLG ou CASP10. Il existe également des critères accessoires secondaires qui comprennent l'exploration des niveaux du ligand FAS soluble (sFASL > 200 pg/mL), d'interleukine-10 (> 20 pg/mL), de vitamine B12 plasmatique (> 1500 ng/L) ou d'interleukine-18 (> 500 pg/ml), la présence de cytopénies auto-immunes (anémie hémolytique, thrombocytopénie ou neutropénie) ainsi que les taux élevés d'immunoglobulines G (hypergammaglobulinémie polyclonale) et pour finir les antécédents familiaux d'ALPS^{149 150 151}. Ainsi, un diagnostic définitif est basé sur la présence des deux critères obligatoires plus au moins un critère accessoire primaire et un diagnostic probable est basé sur la présence des deux critères obligatoires plus au moins un critère accessoire secondaire.

Critères obligatoires		Critères accessoires
1. Adénopathie ou splénomégalie chronique (> 6 mois), non maligne, non infectieuse ou les deux 2. Cellules CD3 + TCR $\alpha\beta$ + CD4 – CD8– DNT élevées (\geq 1,5% du total des lymphocytes ou 2,5% des lymphocytes CD3 +) dans le cadre d'une numération lymphocytaire normale ou élevée	Primaire	1. Apoptose lymphocytaire défectueuse (dans 2 tests séparés) 2. Mutation pathogène somatique ou germinale dans le FAS, le FASLG ou le CASP10
	Secondaire	1. Niveaux plasmatiques élevés de sFASL (> 200 pg / mL) OU niveaux plasmatiques élevés d'interleukine-10 (> 20 pg / mL) OU niveaux élevés de sérum ou de vitamine B12 plasmatique (> 1500 ng / L) OU niveaux plasmatiques élevés d'interleukine-18 > 500 pg / ml 2. Résultats immunohistologiques typiques 3. Cytopénies auto-immunes (anémie hémolytique, thrombocytopénie ou neutropénie) ET taux élevés d'immunoglobulines G (hypergammaglobulinémie polyclonale) 4. Antécédents familiaux d'une lymphoprolifération non maligne / non infectieuse avec ou sans auto-immunité
Un diagnostic définitif est basé sur la présence des deux critères requis plus un critère accessoire primaire. Un diagnostic probable est basé sur la présence des deux critères requis plus un critère accessoire secondaire.		
Tableau 3 : Critères diagnostiques révisés du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) (syndrome de Canale-Smith) ¹⁵²		

L'analyse de la population LTDN est réalisée à l'immunophénotypage par cytométrie de flux. Brièvement, l'analyse de la population de cellules T CD45+, CD3+ montre un sous-ensemble CD4- et CD8- distinct représentant les LTDN. Le sous-typage TCR de cette population double négative montrant une expression TCR $\alpha\beta$ en faveur d'un diagnostic d'ALPS (Figure 10). On peut aussi retrouver de manière associée une expansion d'autres sous-ensembles de lymphocytes comme les LTDN $\gamma\delta$, et des LyT CD8 cytotoxique. En ce qui concerne le reste du bilan immunologique, la recherche d'autoanticorps, le plus souvent un anticorps anti-globuline, anticorps anti-phospholipide, anticorps antinucléaire, et le facteur rhumatoïde sont souvent positifs.

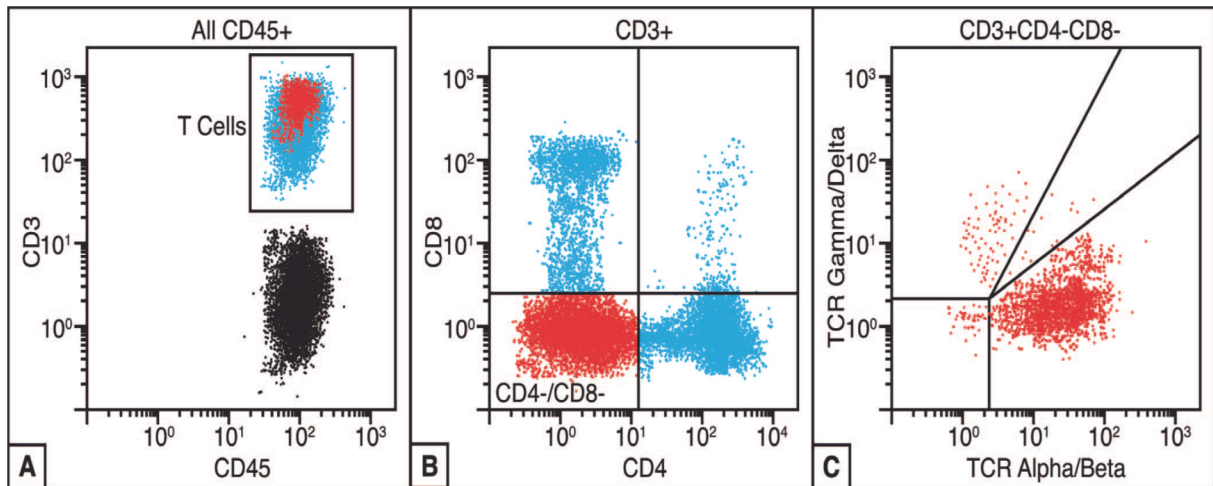


Figure 10 : Cytométrie en flux caractéristiques du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS). A et B, le sang périphérique des patients atteints d'ALPS : une population étendue de cellules T CD3+ qui sont négatives pour les CD4 et CD8 (double négatif, surligné en rouge). C, La population de cellules T à double négatif doit être positive pour le récepteur des cellules T $\alpha\beta$ (TCR).

En ce qui concerne la biochimie clinique, on observe des anomalies de la fonction hépatique (en cas d'hépatite auto-immune), une protéinurie (en cas de glomérulonéphrite) ainsi qu'une concentration sérique élevée de vitamine B 12. Mais des résultats normaux dans les ALPS typiques sont fréquemment observés tels que les concentrations et fonctions des facteurs de complément, les réponses prolifératives in vitro des cellules T (par exemple, en réponse à des mitogènes et des antigènes communs), les Fonctions des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques (CTL).

Nous allons ensuite nous focaliser sur un critère accessoire primaire qui est la recherche de mutation pathogène somatique ou germinale du FAS, le FASLG et le CASP10 (caspase 10) qui sont recherchés par séquençage NGS (Next Generation Sequencing). En France le NGS est réalisé à l'hôpital Necker à Paris. Cette technique a une place primordiale dans la démarche diagnostique ainsi un algorithme est suggéré pour le bilan diagnostique de l'ALPS (Figure 10). L'analyse de séquence du gène d'intérêt est effectuée en premier et suivie d'une analyse de suppression/duplication ciblée sur le gène si aucun variant pathogène n'est trouvé. Il est recommandé de tester le FAS en premier. En l'absence d'une variante pathogène du Fas germinale, le séquençage du FAS dans les LTDB $\alpha\beta$ triées doit être effectué pour détecter les variantes pathogènes somatiques. S'il est présent, le diagnostic d'ALPS-sFAS est établi. Si ni une lignée germinale ni un variant pathogène du FAS somatique n'est identifié, Caspase10 et FASLG doivent être testés. Un test d'apoptose médié par Fas doit être effectué si les variantes

pathogènes de la lignée germinale dans CASP10 ou FASLG ne sont pas identifiées (répéter si nécessaire, en notant l'influence de la thérapie immunosuppressive concomitante). En cas d'anomalie, le diagnostic d'ALPS-U est établi. Les tests de confirmation ne doivent jamais retarder le traitement en cas de suspicion d'ALPS. Cependant, le dépistage des mutations liées à l'ALPS permet également de sous-classifier la maladie (tableau 4), qui peut guider le test des proches, fournir des informations pronostiques et éclairer la planification du traitement. Environ 30 % des patients atteints d'ALPS n'ont pas de mutation génétique identifiable. Dans ces cas, les tests fonctionnels restent la référence et peuvent détecter une apoptose défectueuse médiée par le FAS, quelle que soit la mutation causale. Si les tests fonctionnels sont poursuivis, l'apoptose des lymphocytes défectueux doit être démontrée dans deux tests séparés.^{153 154}

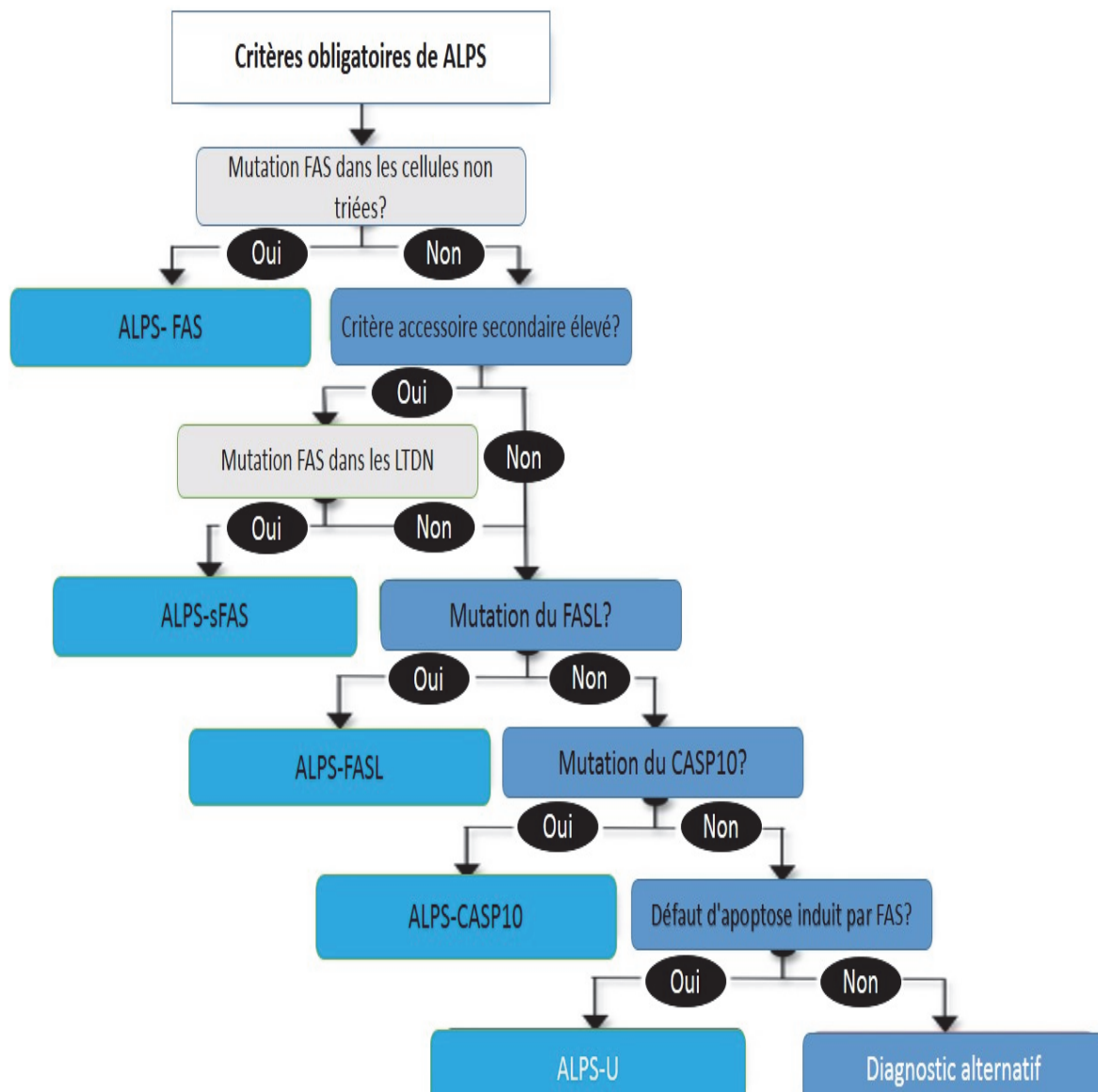


Figure 11: algorithme diagnostique par NGS pour le diagnostic de l'ALPS¹⁵⁵

Diagnostic	Définition	Proportion d'ALPS attribuée à des variantes pathogènes	Proportion de variantes pathogènes détectables par cette méthode	
			Analyse de séquence	Analyse de sup / dup ciblée sur un gène
S-FAS	Répond aux critères cliniques pour ALPS plus mutation germinative du FAS	3% -6%	5/5	Inconnu
ALPS-sFAS	Répond aux critères cliniques pour ALPS plus mutation somatique du FAS	65% -70%	> 90%	3-4 %
ALPS-FASL	Répond aux critères cliniques pour ALPS plus mutation germinative du FASL	~ 15% -20%		
ALPS-CASP10	Répond aux critères cliniques pour ALPS plus mutation germinative CASP10	<1%	7/7	Inconnu
ALPS-U	Répond aux critères cliniques pour ALPS, mais pas de mutation génétique détectée	~ 20%	Inconnu	Inconnu

Tableau 4 : Sous-types de diagnostic du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) par NGS ¹⁵⁶

Abréviations : CASP10 : caspase 10; sFAS : somatique FAS; U, inconnu.

Lorsque un examen histologique sur ganglion est réalisé, on retrouve typiquement dans l'ALPS¹⁵⁷ une hyperplasie folliculaire et une expansion paracorticale de petits lymphocytes prolifératifs (qui sont des LTDN $\alpha\beta$ et qui représentent en moyenne 10 à 20 % des cellules paracorticales), d'immunoblastes et de plasmocytes (Figure 12). L'immunohistochimie démontre un nombre accru de lymphocytes T double négatifs paracorticaux, qui sont CD3⁺, CD4⁻ et CD8⁻. Ces LTDN sont positifs pour l'HLADR, un indicateur d'activation préalable, bien qu'il soit intéressant de noter qu'ils sont également fréquemment positifs pour CD45RA,

qui est un marqueur des lymphocytes T naïfs. Il n'y a pas de perte d'antigènes des cellules pan – T (CD2, CD5, CD7)¹⁵⁸. Bien que généralement non réalisée dans le cadre clinique, la coloration TUNEL (Nick-End Marquage de la désoxynucléotidyltransférase terminale) montre un niveau normal d'apoptose dans les centres germinaux avec une apoptose considérablement diminuée ou absente dans le paracortex¹⁵⁹. Les images de cellules dysplasiques et d'hémophagocytoses ne sont pas présentes¹⁶⁰. Les biopsies d'autres organes montrent généralement un infiltrat lymphocytaire non destructeur composé principalement de lymphocytes T doubles négatifs. Une hépatomégalie peut être présente et des cas d'ALPS avec une fibrose périportale concomitante, une hématoïèse extramédullaire et une hépatite chronique active ont été décrits¹⁶¹.

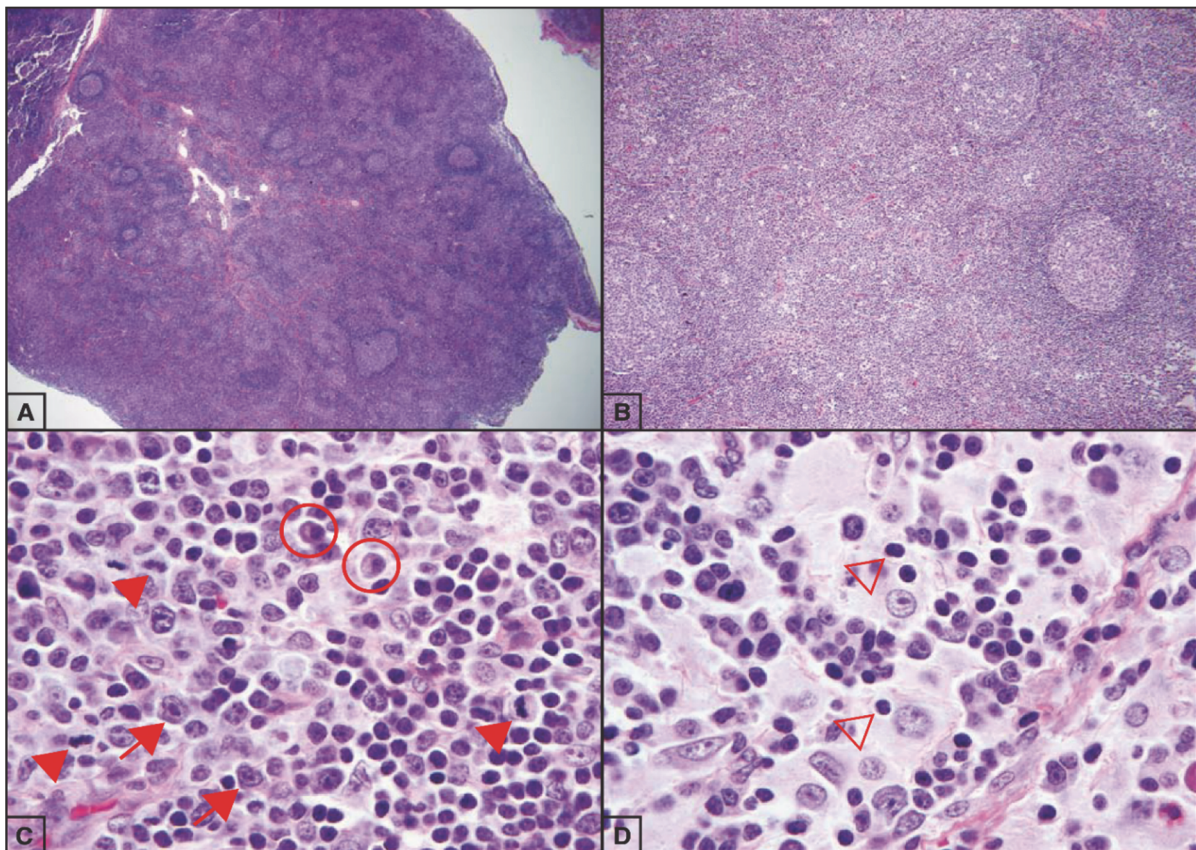


Figure 12 : Les ganglions lymphatiques chez les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) présentent souvent des changements caractéristiques¹⁶². A et B, un ganglion lymphatique élargi avec une hyperplasie folliculaire de type floride composée de petits lymphocytes matures. C, Les lymphocytes paracorticaux sont hautement prolifératifs (têtes de flèches) et peuvent être associés à la fois aux immunoblastes (flèches) et aux plasmocytes (encadrés). D, une histiocytose sinusale avec emperipolèse (pointes de flèches) peut être observée dans une minorité de cas (hématoxyline-éosine, grossissements originaux $\times 2$ [A], $\times 10$ [B] et $\times 100$ [C et D]).

E. Diagnostic différentiel

L'ALPS est une entité rare dont la véritable incidence est inconnue, une attention particulière doit être accordée aux hypothèses alternatives des anomalies observées avant de poser un diagnostic d'ALPS. Le diagnostic différentiel comprend : comme détaillé précédemment dans les étiologies associées à l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$: la greffe de moelle osseuse et transplantation d'organes, les lymphomes et hémopathies myéloïdes, les maladies auto-immunes et les infections. Plus proche de l'ALPS, des variants pathogènes dans des gènes à l'intérieur (autres que *FAS*, *FASLG* et *CASP10*) et à l'extérieur de la voie Fas/FasL ont été rapportées avec des manifestations cliniques proches de l'ALPS. Cependant, ils ne remplissent pas les critères diagnostiques actuels de l'ALPS. Ceux-ci incluent :

1. Maladie lymphoproliférative auto-immune de Dianzani

Une centaine de patients décrits à ce jour, les personnes atteintes de DALD (Dianzani auto-immune lymphoproliférative disease) présentent une auto-immunité, une lymphoprolifération, une splénomégalie et une fonction Fas défectueuse sans expansion des LTDN $\alpha\beta$. Aucun gène associé n'a été identifié à ce jour ¹⁶³

2. Trouble leucoprolifératif auto-immun associé à Ras

Le RALD (RAS-associated auto-immune leukoproliférative disorder) résulte de variantes de gain de fonction somatique dans *NRAS* et *KRAS*, qui ne sont présentes que dans les cellules sanguines. Il s'agit d'une maladie extrêmement rare, avec moins de 20 patients rapportés à ce jour. Semblable à l'ALPS, le RALD est un trouble d'immunodéficience primaire avec une apoptose défectueuse. L'apoptose anormale dans RALD résulte d'un défaut dans une voie d'apoptose secondaire, plutôt que dans la voie d'apoptose médiée par le FAS dans ALPS. Le RALD est caractérisé par une lymphadénopathie périphérique légère sans expansion des LTDN $\alpha\beta$, une splénomégalie (hépatite) et une auto-immunité. Des infections récurrentes des voies respiratoires sont signalées chez certaines personnes affectées ^{164 165 166}.

3. Syndrome de carence en caspase-8

Le CEDS (Caspase-8 deficiency) est un syndrome d'immunodéficience autosomique récessive extrêmement rare, avec moins de 40 patients rapportés à ce jour. Entraînant une lymphadénopathie, une splénomégalie, une élévation marginale des lymphocytes LTDN $\alpha\beta$ et une apoptose défectueuse médiée par le FAS, en plus de fréquentes infections bactériennes et virales secondaires à une activation défectueuse des lymphocytes T, B et NK. Aucune auto-immunité n'a été signalée à ce jour chez les personnes atteintes du CEDS. Le spectre complet de la maladie n'a pas été élucidé étant donné la rareté des individus présentant des variantes pathogènes connues¹⁶⁷.

4. Déficit en FADD

La déficience en FADD est un syndrome d'immunodéficience primaire autosomique récessive rare, avec une centaine de patients rapportés à ce jour et caractérisée par de graves infections bactériennes et virales, des malformations cardiaques congénitales et des épisodes récurrents de fièvre, de dysfonctionnement hépatique et de convulsions. Les marqueurs biochimiques sont compatibles avec l'ALPS, mais les individus affectés décrits à ce jour n'ont pas les caractéristiques cliniques et biologiques caractéristiques de l'ALPS, y compris la lymphadénopathie, la splénomégalie et l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$. La carence en FADD est causée par un variant bi_ allélique pathogène dans *FADD*¹⁶⁸.

Le diagnostic différentiel de l'ALPS comprend d'autres troubles d'immunodéficience caractérisés ou compliqués par la lymphoprolifération, les maladies auto-immunes, il s'agit notamment des éléments suivants.

5. Le déficit immunitaire variable commun

Les DICV ont une incidence estimée à 1/50 000. Ils sont retrouvés également chez les hommes et les femmes. Ils se caractérisent par un déficit immunitaire humoral qui apparaît généralement après l'âge de 24 mois et plus fréquemment au début de l'âge adulte avec une sensibilité accrue aux infections et une diminution des réponses aux vaccins protéiques et polysaccharidiques. D'un point de vue clinique, les individus atteints de DICV courent un risque accru de maladie auto-immune qui cible souvent les cellules sanguines et de lymphoprolifération chronique, y compris la lymphadénopathie, la splénomégalie et le lymphome¹⁶⁹. D'un point de vue immunologique, les individus atteints de DICV ont des cellules B mémoires absentes ou

diminuées Les DICVs avec une quantité lymphocytes B normale doivent être pris en compte dans le diagnostic différentiel de l'ALPS (lymphocytes B normaux ou augmenté et hyper gammaglobulinémie avec les IgM normaux ou abaissés), contrairement aux situations où les lymphocytes B sont diminués avec des concentrations sériques généralement faibles d'immunoglobulines.

6. Syndrome d'Hyper IgM

Le Syndrome d'Hyper IgM HIGM (Hyper IgM syndrome) dont la forme la plus fréquente est liée à l'X et implique un déficit en CD40L. Actuellement, plusieurs formes de HIGM non liées à l'X ont maintenant été identifiées. À des degrés divers, ils partagent des caractéristiques avec la forme liée à l'X (voir Syndrome *hyperIgM* lié à l'X), provoqués par des variantes pathogènes du *CD40LG*. Les caractéristiques communes incluent les infections bactériennes récurrentes telles que l'otite moyenne, la sinusite et les pneumonies. Des troubles hématologiques auto-immuns, dont la neutropénie, la thrombocytopénie et l'anémie hémolytique, sont également observés. D'autres complications peuvent inclure des lymphomes et d'autres tumeurs malignes ainsi que des complications gastro-intestinales. La concentration sérique d'IgM est élevée tandis que les autres niveaux d'immunoglobulines sont normaux ; les réponses spécifiques des anticorps sont défectueuses. Contrairement à HIGM, la fonction des lymphocytes T dans l'ALPS est généralement dans les limites normales, reflétée par une absence d'infections opportunistes. Les infections bactériennes, respiratoires et gastro-intestinales récurrentes sont typiques ; les infections opportunistes sont rares. Une hyperplasie lymphoïde (ganglions cervicaux, mésentériques, amygdale), observée dans ALPS, a été rapportée dans HIGM sans augmentation des LTDN $\alpha\beta$ ¹⁷⁰.

7. La maladie lymphoproliférative liée à l'X

La maladie lymphoproliférative liée à l'X XLP (X-linked lymphoproliferative syndrome) est associée à une réponse immunitaire inappropriée à une infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) entraînant une mononucléose infectieuse inhabituellement sévère et souvent mortelle sans augmentation des LTDN $\alpha\beta$. Elle est causée par des mutations hémizygotiques pathogènes dans le gène *SH2D1A* (*SH2 Domain Containing 1A*) qui sont localisées sur le chromosome X. La présentation la plus courante est une infection à EBV associée à une réponse immunitaire non réglementée et exagérée avec une prolifération généralisée de cellules T cytotoxiques, de cellules B infectées par l'EBV et de macrophages. La mortalité est supérieure

à 90 %. Chez environ un tiers des hommes atteints de XLP, l'hypogammaglobulinémie d'une ou plusieurs sous-classes d'immunoglobulines est diagnostiquée avant l'infection par l'EBV ou chez de rares survivants de l'infection par l'EBV. Le pronostic pour les hommes avec ce phénotype est plus favorable s'ils sont pris en charge par l'administration régulière d'immunoglobulines intraveineuses (IgIV). Des lymphomes ou d'autres maladies lymphoprolifératives surviennent chez environ un tiers des hommes atteints de XLP, dont certains souffrent d'hypogammaglobulinémie ou ont survécu à une infection initiale par l'EBV. Les lymphomes observés chez les personnes atteintes de XLP sont généralement des lymphomes à cellules B de haut grade (type non hodgkinien), sont souvent extranodaux et impliquent en particulier l'intestin. La démonstration de l'apoptose défectueuse de la restimulation des récepteurs des cellules T chez les personnes atteintes de XLP suggère que l'homéostasie lymphocytaire altérée affecte également la pathogenèse de la maladie¹⁷¹. L'allogreffe de moelle osseuse est la seule thérapie curative pour XLP. L'espérance de vie moyenne sans allogreffe a été estimée à moins de dix ans.

8. Le syndrome de Wiskott-Aldrich

L'incidence est estimée à moins de 1/100 000 naissance vivante. La maladie touche quasi exclusivement les garçons. Est un spectre de troubles des cellules hématopoïétiques, avec des défauts prédominants des plaquettes et des lymphocytes causés par la mutation de *WAS* (*Wiskott Aldrich syndro*). Des troubles liés sont présents dans la petite enfance sans augmentations des LTDN $\alpha\beta$. Les hommes atteints souffrent de thrombocytopénie avec saignement muqueux intermittent, diarrhée sanglante et pétéchies et purpura intermittents ou chroniques ; eczéma ; et les infections bactériennes et virales récurrentes, en particulier les otites récurrentes. Au moins 40 % de ceux qui survivent aux complications précoces développent une ou plusieurs affections auto-immunes, y compris l'anémie hémolytique, le purpura thrombocytopénique immunitaire, la neutropénie à médiation immunitaire, l'arthrite, la vascularite des petits et gros vaisseaux et des dommages à médiation immunitaire aux reins et au foie. Individus avec un *WAS* les troubles liés à la maladie, en particulier ceuqui ont été exposés à l'EBV, courent un risque accru de développer des lymphomes, qui surviennent souvent dans des endroits extranodaux inhabituels tels que le cerveau, les poumons ou le tractus gastro-intestinal. Les hommes avec XLT ont une thrombocytopénie avec de petites plaquettes ; d'autres complications du syndrome de Wiskott-Aldrich, y compris l'eczéma et le dysfonctionnement immunitaire, sont légères ou absentes.

9. La mutation gain de fonction de STAT3

Mutation gain de fonction de STAT3 ou STAT3 GOF (signal transducer and activator of transcription 3 gain of function) est associée à l'immunodéficience et au syndrome d'infection récurrente hyper-IgE (différent du syndrome de JOB qui est un déficit de STAT3 avec une symptomatologie plus grave). Ces variantes provoquent une maladie auto-immune avec des caractéristiques proches de l'ALPS : une lymphadénopathie, des LTDN $\alpha\beta$ élevées et des cytopénies auto-immunes. A la différence de l'ALPS, on retrouve des infections récurrentes, une petite taille et une auto-immunité multiorganique.¹⁷²

F. Prise en charge

Un bilan extension après le diagnostic initial est nécessaire pour déterminer l'étendue de la maladie. Celui-ci comprend :

- Un examen physique avec des examens d'imagerie pour évaluer les organomégalies éventuelles. En cas d'organomégalie importante, une recherche de lymphome est obligatoire particulière si des signes évocateurs sont présents (fièvre, sueurs nocturnes, perte de poids)
- Une numération sanguine complète et immunophénotypage lymphocytaire
- Un bilan d'auto-immunité

1. Traitement des manifestations clinique

En l'absence de traitement curatif, la gestion actuelle se concentre sur les points suivants¹⁷³

i- Surveillance et traitement de la lymphoprolifération et de l'hypersplénisme

Les manifestations de lymphoprolifération nécessitent une observation clinique étroite, ainsi des tomodensitogrammes et TEP sont recommandés tous les deux à trois ans. La biopsie est indiquée en cas de suspicion clinique de lymphome. Les corticostéroïdes et les médicaments immunosuppresseurs (sauf le sirolimus) ne diminuent pas la lymphadénopathie à long terme

chez les personnes atteintes d'ALPS et sont généralement réservés aux complications graves de la lymphoprolifération (par exemple, obstruction des voies respiratoires, hypersplénisme significatif associé à la splénomégalie) et/ou manifestations auto-immunes.

Le sirolimus est actuellement indiqué dans le traitement de la lymphoprolifération de manière plus soutenue, y compris pour le maintien de la rémission après le traitement initial suivi d'une période d'arrêt de l'utilisation. Cependant, le sirolimus n'est pas sans effets secondaires¹⁷⁴. Dans les cas graves, des agents plus puissants (lympho-épuisants) peuvent être nécessaires pour contrôler suffisamment les manifestations lymphoprolifératives telles que le cyclophosphamide et certains anticorps monoclonaux tels que l'alemtuzumab (Ac anti-CD52) ou une baisse des LTDN $\alpha\beta$ est obtenu.

ii- Traitement des cytopénies et autres maladies auto-immunes

Les cytopénies auto-immunes sont généralement traitées par immunosuppression avec des corticostéroïdes ainsi que des agents d'épargne des corticostéroïdes, si un traitement prolongé des cytopénies auto-immunes est nécessaire et/ou en cas de cytopénies réfractaire. Le sirolimus devrait être considéré comme un agent de première intention épargnant les corticostéroïdes. Le sirolimus nécessite une surveillance des niveaux de médicament et des effets secondaires toxiques. Le mycophénolate mofétil (MMF) pourrait être utilisé en alternative. Les personnes souffrant d'anémie hémolytique auto-immune sévère peuvent bénéficier de l'IgIV en association avec des corticostéroïdes. Le rituximab (Ac anti-CD20) a également été utilisé avec succès dans le traitement des cytopénies réfractaires dans l'ALPS, son utilisation est généralement réservée en cas d'échec des autres thérapeutiques (Sirolimus et MMF). La splénectomie est réservée comme option de dernier recours dans le traitement des cytopénies réfractaires menaçant le pronostic vital et/ou de l'hypersplénie sévère en raison du risque élevé de récurrence de cytopénies et du risque infectieux. Les individus atteints de neutropénie chronique isolée peuvent être améliorés avec du G-CSF à faible dose. De plus, l'utilisation d'un agoniste des récepteurs de la thrombopoïétine (TPO) peut être envisagée pour la thrombocytopénie immunitaire isolée (PTI).

Une greffe de moelle osseuse curative en dernier recours doit être envisagée pour les patients très symptomatique et réfractaire à toute thérapeutique.

2. Prévention des manifestations cliniques

i- Prévention des manifestations cliniques primaires

La greffe de moelle osseuse (allogreffe) est actuellement le seul traitement curatif de l'ALPS ainsi un niveau normal de LTDN $\alpha\beta$ est retrouvé. En raison des risques associés, elle a jusqu'à présent été pratiquée principalement chez des individus atteints d'ALPS avec des phénotypes cliniques sévères, tels ceux avec des cytopénies auto-immunes sévères et/ou réfractaires, ceux avec un lymphome et ceux qui ont développé des complications de la thérapie immunosuppressive (souvent à long terme). Les succès de l'allogreffe dans cette indication ont montré que l'apoptose défectueuse médiée par le Fas ne constitue pas un obstacle à cette option de traitement ¹⁷⁵

ii- Prévention des complications secondaires.

Les vaccinations présplénectomie (en tenant compte des vaccinations de rappel post-splénectomie) et la prophylaxie à la pénicilline sont fortement recommandées pour les personnes qui subissent une splénectomie. L'évaluation clinique, l'imagerie et les études de laboratoire décrites dans les évaluations après le diagnostic initial peuvent être utilisées dans la surveillance des manifestations de la lymphoprolifération et de l'auto-immunité.

Des études d'imagerie spécialisées telles que la TEP et la tomодensitométrie combinées en combinaison avec une surveillance clinique et de laboratoire peuvent être utiles pour la détection de la transformation maligne, en gardant à l'esprit que la TEP/TDM est souvent anormale dans l'ALPS, de sorte que la distinction entre les résultats « typiques » de l'ALPS et une nouvelle tumeur maligne (lymphome) peut être difficile¹⁷⁶.

3. Évaluation des parents à risque

Il est approprié d'effectuer des tests de génétique moléculaire sur des parents à risque pour l'ALPS si la variante pathogène a été identifiée. Les parents qui ont la variante pathogène spécifique, doivent être informés de leur risque accru, et bénéficier d'une surveillance spécifique particulièrement chez les jeunes. Un conseil génétique est recommandé.

En conclusion, comme nous venons de l'exposer, l'augmentation des LTDN $\alpha\beta$ joue un rôle important dans la démarche diagnostique de l'ALPS. Cette pathologie demande une prise en charge spécifique avec des conséquences qui peuvent être lourdes. Il est donc important que le diagnostic soit correctement posé et donc que les diagnostics différentiels aient été correctement éliminés. L'augmentation des LTDN $\alpha\beta$ n'est pas spécifique de l'ALPS. Dans la troisième partie de notre travail et nous rapporterons les résultats d'un travail personnel cherchant à évaluer les différentes étiologies associées aux augmentations des LTDN $\alpha\beta$ en pratique courante au laboratoire d'immunophénotypage.

III- Travail personnel

La population de lymphocytes LTDN $\alpha\beta$ est une population de lymphocytes T très minoritaire dans la circulation sanguine chez l'homme. Une élévation de cette population au-delà de 1,5 % des lymphocytes totaux a été décrite pour la première fois dans le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (ALPS) pour laquelle elle constitue un critère majeur pour l'établissement du diagnostic. Cependant, depuis la description de l'ALPS et de l'établissement de ses critères diagnostic en 2010, l'élévation des LTDN $\alpha\beta$ dans la circulation sanguine a également été rapportée dans d'autres contextes auto-immuns, tumoraux ou dans le cadre des suivis de greffe. La fréquence de ces augmentations n'est à ce jour pas clairement établie. La multiplicité des contextes pouvant associer plusieurs critères de l'ALPS peut entraîner en pratique courante des difficultés de diagnostic différentiel. Ainsi, une meilleure connaissance des étiologies pouvant être associées aux augmentations des LTDN $\alpha\beta$ est nécessaire afin d'améliorer la conduite exploratoire du biologiste au laboratoire d'immunophénotypage et son rôle de consultant en biologie auprès des médecins prescripteurs.

Notre hypothèse était que la grande majorité des cas montrant une augmentation atypique des LTDN $\alpha\beta$ n'est pas associée à un ALPS. L'objectif de mon travail personnel a donc été de déterminer l'origine étiologique des augmentations des LTDN $\alpha\beta$ dans une étude rétrospective incluant les patients ayant bénéficié d'un immunophénotypage de 2016 à 2020.

Au sein du laboratoire d'hématologie et de biologie vasculaire du CHU de La Conception APHM, un typage systématique du TCR est réalisé lorsqu'un immunophénotypage T/B et NK est demandé et présente une population de LTDN supérieur ou égal à 12 %. Ceci est réalisé, quel que soit l'indication de la prescription et le contexte clinique associé. Cette démarche constitue une opportunité unique de répondre à l'objectif fixé.

A. Matériels et méthodes

Nous avons effectué une étude rétrospective sur les élévations de LTDN $\alpha\beta$ au sein du laboratoire d'immunophénotypage à l'hôpital de la Conception (Assistance publique des hôpitaux de Marseille) sur tous les immunophénotypages T/B/NK réalisés entre janvier 2016 et mai 2020 soit environ 52 000 immunophénotypages pour identifier les étiologies associées aux augmentations de cette population.

Ces immunophénotypages comprenant la détermination de cette sous-population de lymphocytes T sont réalisés par cytométrie en flux dont nous rappelons brièvement le principe.

La CMF permet l'étude de cellules isolées entraînées par un flux liquide par un principe d'immunofluorescence. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule traversant le faisceau lumineux d'un laser. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques liées à la diffraction de la lumière du laser (taille, structure interne des particules) ainsi qu'aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. (Figure 12)

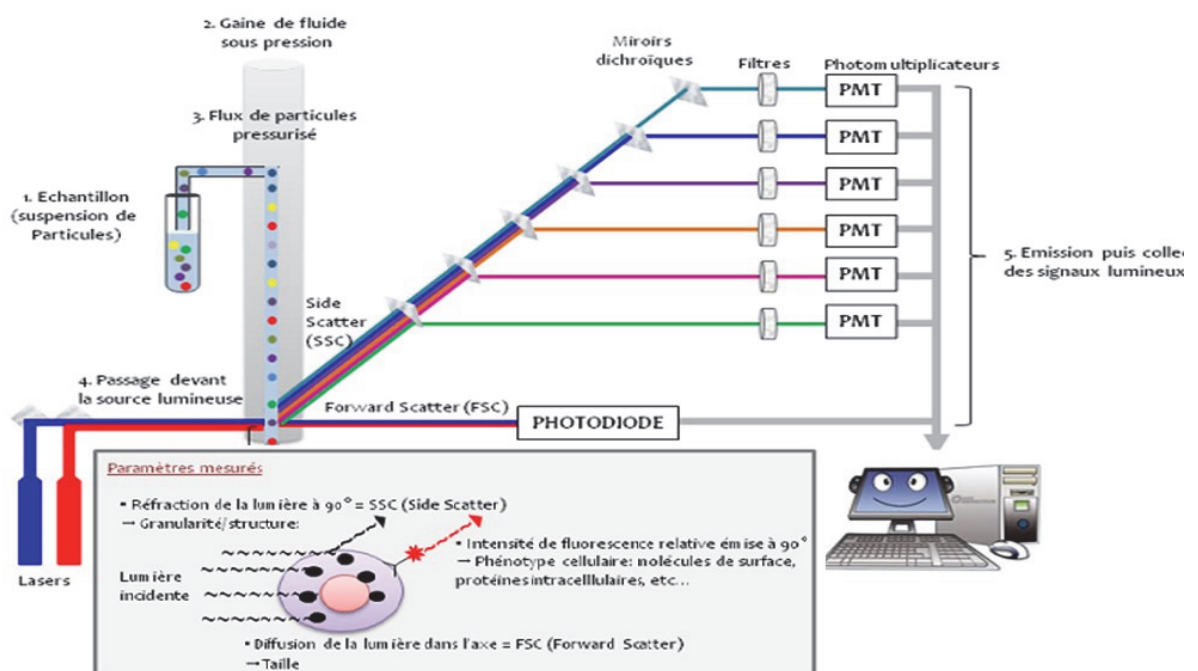


Figure 12 : Principe de la cytométrie en flux¹⁷⁷

Critères de sélection des patients :

Tous les patients présentant des lymphocytes T CD3 + CD4 – CD8 → 12 % ont bénéficié du typage de leur TCR permettant d'identifier les patients avec une élévation de la population LTDN $\alpha\beta$ dans le sang. Cette élévation a été définie en suivant les critères diagnostiques de l'ALPS soit des LTDN $\alpha\beta > 1,5$ % des lymphocytes totaux ou $> 2,5$ % des lymphocytes T, les patients lymphopéniques sont exclus de notre études.

Les patients provenaient exclusivement des différents hôpitaux et services de l'APHM (assistance publique des hôpitaux de Marseille) pour lesquelles une demande d'immunophénotypage T/B/NK avait été demandée. Les indications les plus fréquentes correspondaient des contextes de recherche ou d'exploration de syndromes lymphoprolifératifs chroniques ou des désordres immunohématologiques (transplantation moelle et organe, déficits immunitaires acquis, maladies auto-immunes et inflammatoires, suivi thérapeutique des immunomodulateurs). La présence de lymphocytose, de lymphocytes anormaux ou atypiques dans le frottis sanguin, la neutropénie, l'anémie hémolytique auto-immune (AIHA), la thrombocytopénie et la recherche d'une immunodéficiences possible étaient fréquemment associées aux demandes d'immunophénotypage T/B/NK.

Immunophénotypage

Les immunophénotypages ont été réalisés sur cytomètre Navios (Beckman Coulter, Miami, FL, US) équipé de 3 lasers (405, 488 et 647 nm). Tous les anticorps proviennent également de Beckman Coulter. Le panel de dépistage comprend les spécificités CD45, CD4, CD8, CD3, HLA-DR, CD19, CD5 et CD16/56. Le panel d'étude du TCR comprend les spécificités CD45, CD3, CD4, CD8, TCR alpha/bêta, TCR gamma/delta.

Nous avons procédé par étape pour l'identification des populations lymphocytaires sur sang :

Tout d'abord par un screening sur les leucocytes CD45+ (marqueurs panleucocytaires) avec la structure en SS (side scatter) *versus* le CD3 (marqueurs des lymphocytes T) la population de lymphocytes T est identifiée ensuite sur cette population on fait une séparation CD4+ et CD8+. On obtient alors 4 populations de lymphocytes T :

- T CD3 + CD4+CD8 - (Lymphocytes TCD4+)
- T CD3 + CD4-CD8+ (Lymphocytes TCD8+)
- T CD3 + CD4+CD8+ (Lymphocytes doubles positifs CD4+CD8+)
- T CD3 + CD4-CD8 - (Lymphocytes doubles négatifs CD4 - CD8-)

Les lymphocytes doubles négatifs CD4 - CD8- représentent la population d'intérêt. Puis nous avons effectué un typage du TCR sur la population T double négatif avec les marqueurs *alpha bêta* vs *gamma delta*. Ci-dessous sont représentés des exemples typiques de résultats.

Cas 1 : Les LTDN $\alpha\beta$ représentent 27 % des LTDN (Figure13)

Cas 2 : les LTDN $\alpha\beta$ représentent 82 % des LTDN (Figure14)

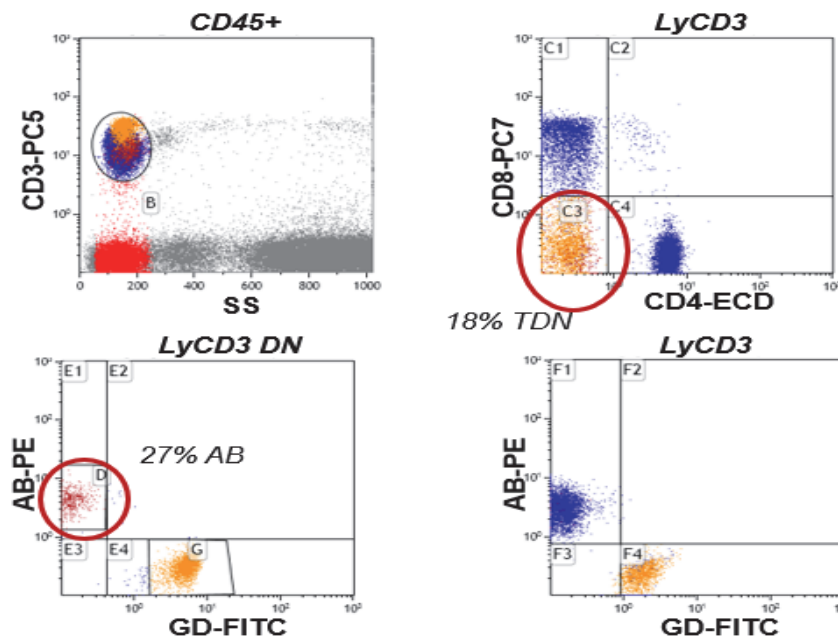


Figure 13 : Représentation des résultats immunophénotypique du cas 1 (les LTDN $\alpha\beta$ représentent 27 % des LTDN)

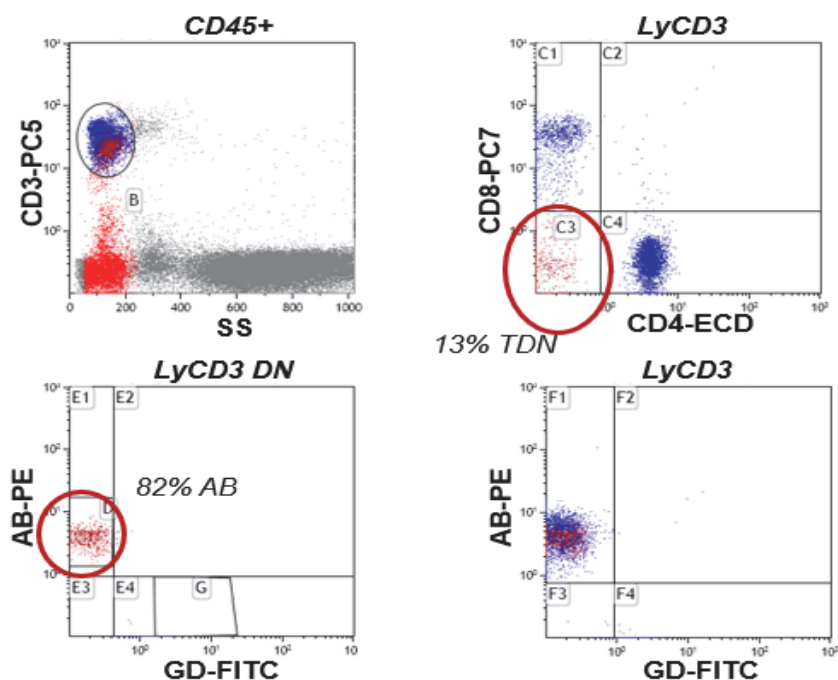


Figure 14 : Représentation des résultats immunophénotypique du cas 2 (les LTDN $\alpha\beta$ représentent 82 % des LTDN)

Par la suite nous avons réalisé une recherche de données clinico-biologique pour les patients avec des LTDN $\alpha\beta$ pour comprendre et catégoriser cette augmentation après exclusion des patients présentant une lymphopénie.

Nous avons utilisé les critères diagnostics pour l'ALPS afin d'identifier les vrais ALPS et ensuite nous avons classé les patients en fonction de grandes entités pathologiques : MAI, Greffe d'organes, pathologies oncohématologiques. Nous avons pris un groupe de témoin au nombre de 34 de 6 à 86 ans avec une moyenne d'âge de 44 ans [la moyenne d'âge, l'écart-type, âge minimal, maximal et le sexe-ratio sont résumés sur le tableau résumé des caractéristiques du groupe témoins (tableau résultats témoin 1)] ainsi que leurs répartitions en termes de valeurs absolues de lymphocytes totaux, le pourcentage et valeurs absolues des LTDN $\alpha\beta$ (tableau résultats témoin 2).

Nombre de patient	moyenne d'âge	écart types	âge min	âge max	Sexe-ratio H/F
34	44	22	6	86	2.27
Tableau résultats témoin 1: résumé des caractéristiques du groupe témoins					

	Lymphocytes en G/l	Lymphocytes LTDNab en G/l	LTDNab (%) des lymphocytes totaux
Moyenne	2.36	0.013	0.57
Ecart-type	1.19	0.007	0.1
Tableau résultats témoin 2 : la répartition du groupe témoin : valeurs absolues de lymphocytes totaux, le pourcentage et valeurs absolues des LTDN alpha bêta			

B. Résultats

Les résultats obtenus sur notre étude rétrospective sont les suivants : sur 52093 immunophénotypages T/B/NK du 4 janvier 2016 au 2 mai 2020 au sein du laboratoire on retrouve 40 patients indépendants (les patients avec 2 ou 3 immunophénotypages seul le premier est pris en compte) non lymphopénique pour lesquels un typage du TCR a été réalisé, ce qui représente 0.21% de tous les immunophénotypages de notre laboratoire sur la même période, ce résultat est similaire à celui retrouvé dans notre laboratoire entre 2008 et 2012 (0.29%) [Des patients avec des lymphocytes T doubles négatifs > à 12 % des lymphocytes totaux avec des lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta > à 1,5 % des lymphocytes totaux (> 12 % TDN + LTDN $\alpha\beta$ >1,5 % des lymphocytes totaux). Ce groupe répond aux critères phénotypiques de l'ALPS].

Le tableau (tableau résultats 1) qui suit résume le nombre de patients, moyenne d'âge, écart type, âge minimal et maximal et le sexe-ratio hommes/femmes.

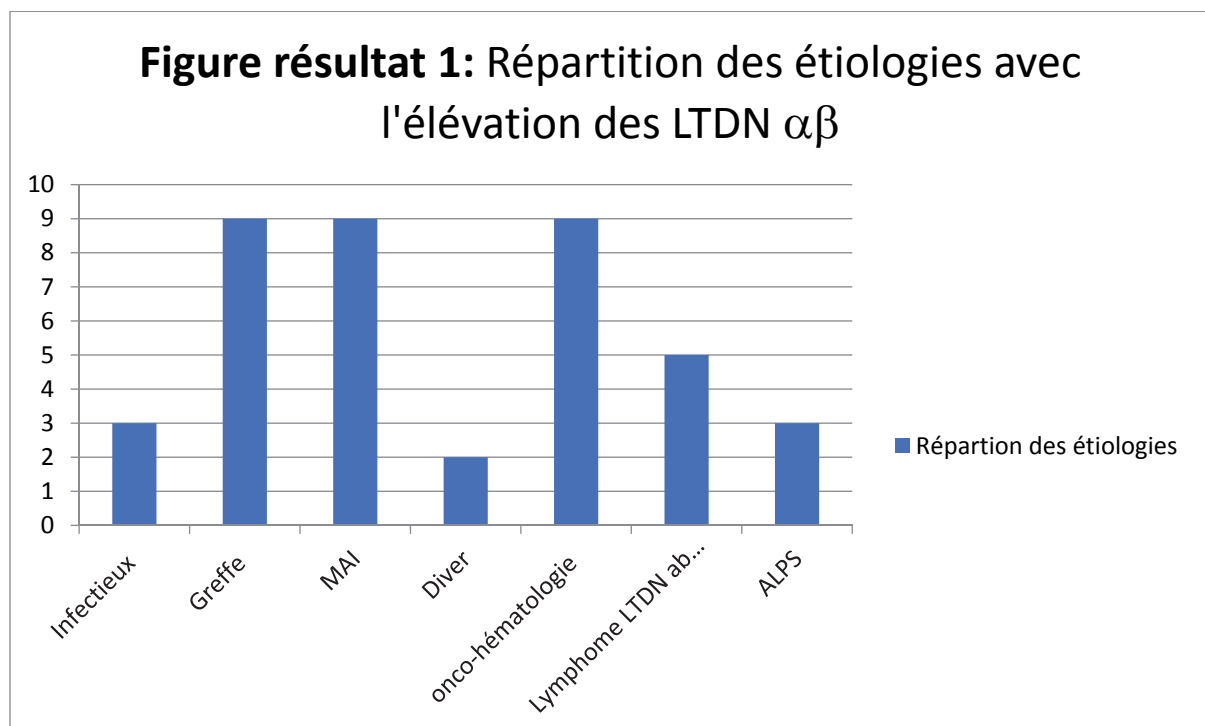
	nombre patient	moyenne d'âge	écart types	âge min	âge max	Sexe-ratio H/F
> 12 %TDN + >1,5 LTDN $\alpha\beta$ >1,5% des lymphocytes totaux	40	37	22	8	71	1,85

Tableau résultats 1 : résumé des caractéristiques des patients présentant des étiologies avec l'élévation des LTDN $\alpha\beta$

Les 40 patients montrent des LTDN alpha bêta >1,5 % des lymphocytes totaux, ce qui représente 0.077 % de tous les immunophénotypages de notre laboratoire sur la même période, ce résultat est comparable à celui retrouvé dans notre laboratoire entre 2008 et 2012 (0.1%).

Nous résumons la moyenne des lymphocytes totaux et les LTDN $\alpha\beta$ sur le tableau résultat 1, la moyenne d'âge est de 37 ans avec un écart-type de 22 [min:8 ;max71] et un sex-ratio hommes femmes à 1,8. Ces résultats diffèrent sur la moyenne d'âge de 44 ans et le sex-ratio hommes femmes de 2.2 dans le groupe témoin.

Sur les 40 cas (dont 30 adultes et 10 enfants) présentant les critères immunophénotypiques de l'ALPS seulement 3 patients, soit 7,5 % sont véritablement des ALPS. Les 37 autres cas (28 adultes et 9 enfants)présentent une absence du deuxième critère majeur (clinique) sur les adénopathies ou splénomégalie chronique (> 6 mois), non maligne, non infectieuse ou les deux). Ces patients sont classés en 7 grandes entités : ALPS, onco-hématologie, MAI, greffé d'organes solides, infections, lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux et divers ainsi la répartition des étiologies est résumée sur la figure résultat 1. Ensuite, nous détaillerons les résultats des patients du groupe 1 classé par grandes entités. En terme d'étiologies, le nombre patient transplanté d'organes solides, présentant une pathologie auto-immune (MAI) ou une pathologie onco-hématologique hors lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ représente à parts égales 22,5 % (9 patients chacun) des patients. Les infections représentent seulement 7,5 % des patients (3 patients), Les lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux ont été diagnostiqués représentant 12,5 % (5 patients) des patients avec une moyenne de LTDN $\alpha\beta$ à $0,5 \pm 0,1$ G/l.

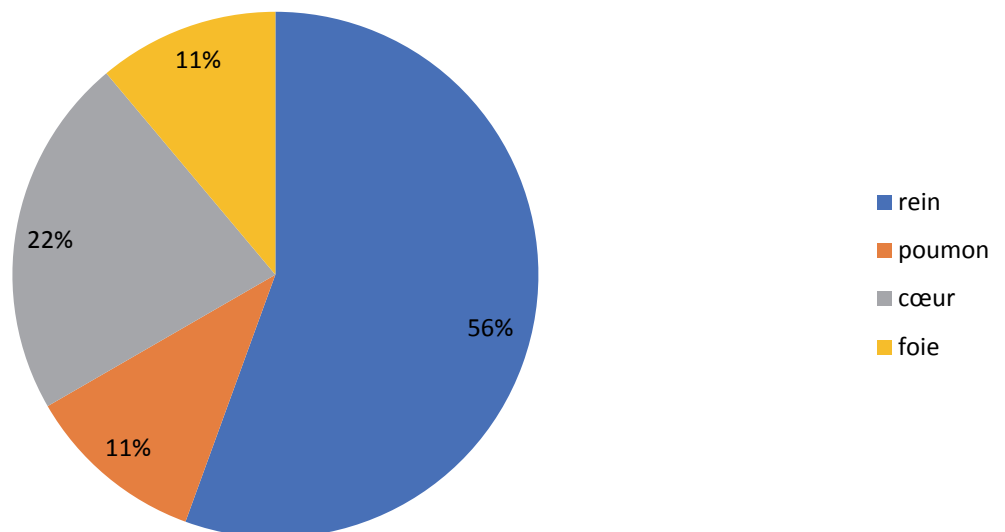


	Lymphocytes Totaux en G/l	LTDN ab en G/l	%LTDN ab par rapport aux lymphocytes totaux	% TCD4-CD8- alpha-beta par rapport au TCR
Moyenne Ecart-type	1,93 1.3	0.13 0.4	6,67 16.9	26,9 60.1

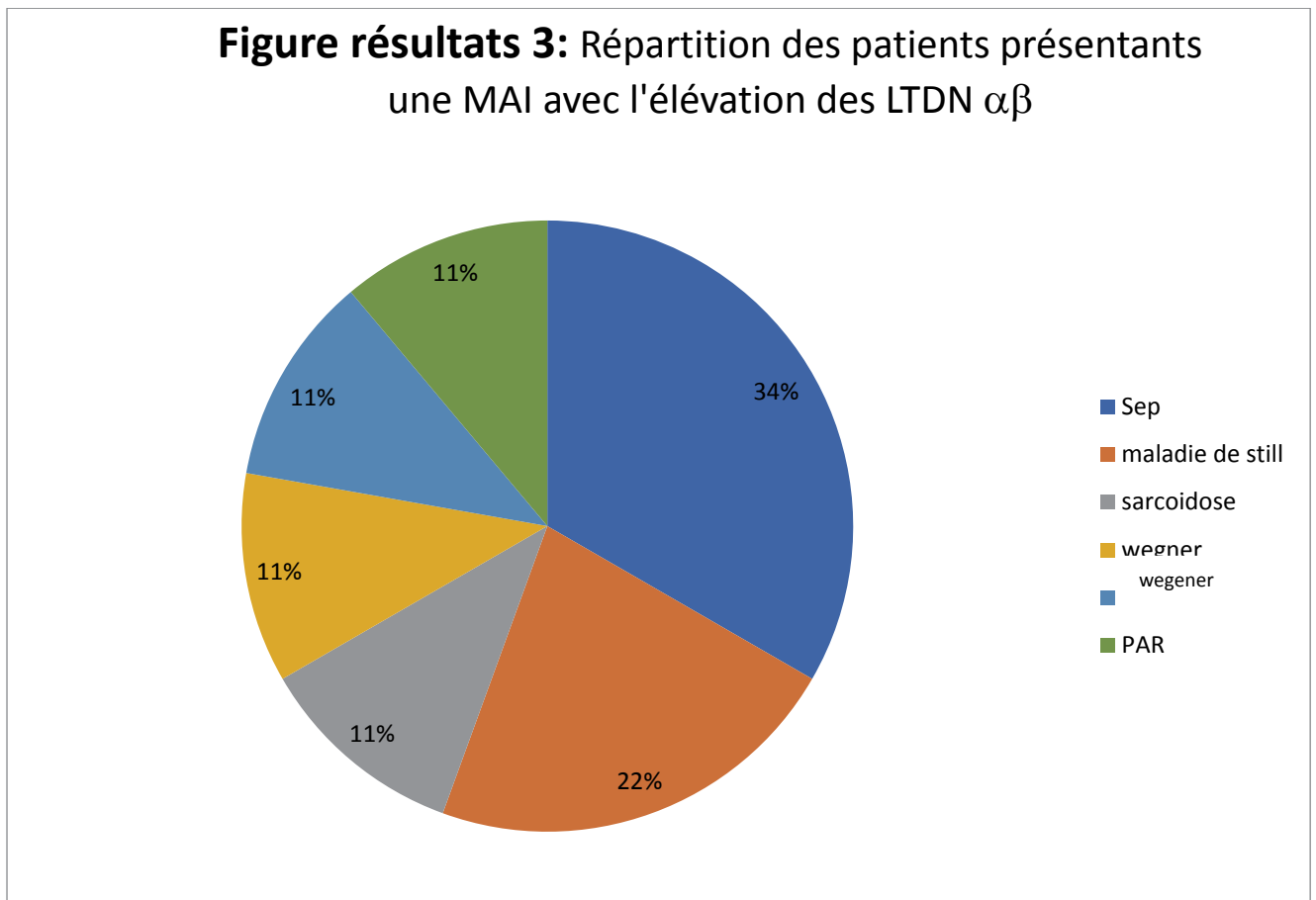
Tableau résultats 2 : Analyse quantitative des élévations de LyTDN $\alpha\beta$ (> 12 %TDN + LTDN ab>1,5% des lymphocytes totaux) Valeurs absolues de lymphocytes totaux, valeurs absolues et le pourcentage des LTDN alpha bêta

Parmi les patients transplantés présentant des augmentations de LYTDN $\alpha\beta$ (9 patients), la répartition de type de greffe est la suivante : 55 % greffé du rein (5 patients), 22 % greffé du cœur (2 patients), 11 % greffé du poumon et du foie (1 patient chacun) (Figure résultats 2).

Figure résultats 2: Répartition des transplantés par type d'organes avec l'élévation des LTDN $\alpha\beta$

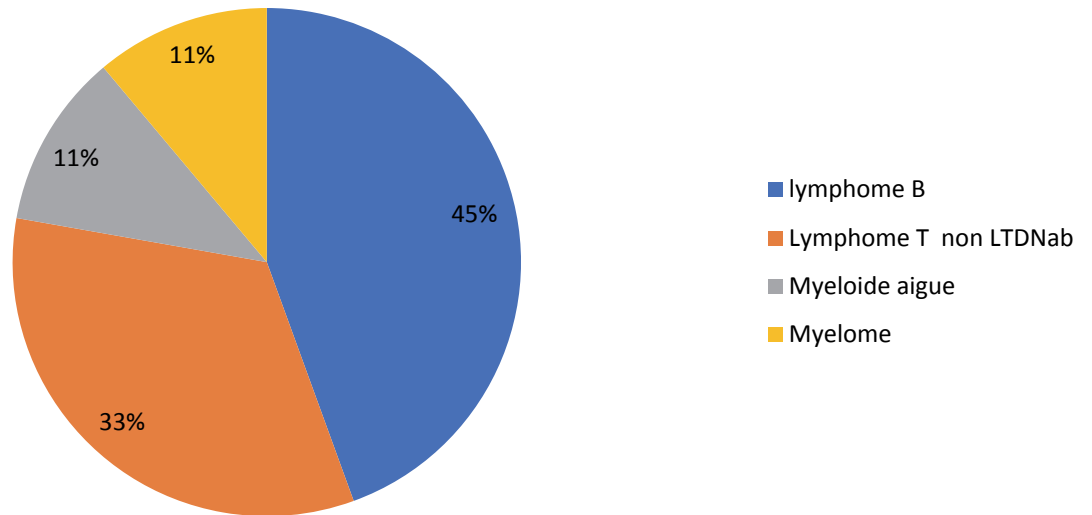


Parmi les patients présentant une pathologie dysimmunitaire (9 patients), les patients avec une sclérose en plaques représentent 33 % (3 patients) dont deux tiers étaient sous traitement par anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab), 22 % (2 patients) une maladie de Still et 11 % (1 patient chacun) une sarcoïdose, une vascularite (Wegener), un purpura thrombotique auto-immun (PTAI) et une polyarthrite rhumatoïde (Figure résultats 3).



Parmi les patients présentant une pathologie hématologique hors lymphome à LTDN $\alpha\beta$ (9 patients), 45 % (4 patients) des patients présentent un lymphome B, 33 % (3 patients) des patients présentent un lymphome T non à LTDN $\alpha\beta$ monoclonale, 11 % (1 patient chacun) à parts égales présentaient une leucémie aiguë myéloïde ou un myélome multiple. Ces derniers résultats sont représentés sur la figure résultat 4.

Figure résultats 4 : Répartition des patients présentant une étiologie onco-hématologique avec l'élévation des LTDN $\alpha\beta$



Concernant les 3 patients avec un ALPS. Ces trois patients présentent les deux critères majeurs de l'ALPS, qui sont des adénopathies ou splénomégalie chronique (> 6 mois), non maligne, non infectieuse ainsi que des LTDN $\alpha\beta \geq 1,5$ % du total des lymphocytes non lymphopénique. Les trois patients présentaient une des mutations pathogènes : un avec une mutation germinale du gène FAS et les deux autres présentait une mutation du FAS ligand. La moyenne d'âge des 3 patients était de 12,3 ans (min 9 et max 17) et la valeur absolue des LTDN $\alpha\beta$ des patients étaient respectivement de 0,30, 0,25 et 0,26 G/l le tableau résultats 3 résume les moyennes et écarts types des patients ALPS.

	Lymphocytes Totaux en G/l	LTDN ab en G/l	%LTDN ab par rapport aux lymphocytes totaux	% TCD4-CD8- alpha-beta par rapport au TCR
Moyenne	1,93	0.27	14	26,9
Ecart type	1.3	0.02	10.9	29.1

Tableau résultats 3 : la répartition des patient ALPS (> 12 %TDN + >1,5 LTDN ab>1,5% des lymphocytes totaux)

La comparaison des quantités absolues de lymphocytes totaux et des LTDN $\alpha\beta$ des patients par grande étiologies est représentée dans le tableau résultats 4. Dans la littérature et l'étude de 2008 à 2012, les valeurs de référence des LTDN $\alpha\beta$ serait $0,02 \pm 0,015$ G/l, on peut considérer que les LTDN $\alpha\beta$ augmentent au-delà de 0,05 G/l. ces résultats sont similaire à ceux que vous avons observé dans notre étude.

Nous observons que les valeurs de LTDN $\alpha\beta$ dans les lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux sont les plus élevés suivis des vrais ALPS, MAI, onco-hématologie et les transplantations d'organes.

		MAI	Onco- hématologie (hors Lymphome à LTDNab monoclonale)	Greffe	Lymphome à LTDNab monoclonaux	ALPS
Lyt Tot G/l	Moyenne (min-max)	1,9 (1.1-2.4)	2,4 (1.6- 4)	2 (1-3)	1,74 (1.5-3)	1,93 (1.3-2.9)
	Écart-type	0,75	1,3	0,7	0,87	1,3
LTDN ab G/l	Moyenne (min-max)	0,19 (0.07-0.22)	0,17 (0.08- 0.21)	0,12 (0.09-0.2)	0,41 (0.23-0.54)	0,27 (0.25-0.3)
	Écart-type	0,12	0,1	0,09	0,3	0,02

Tableau résultats 2 : la répartition des patients du groupe 1 par grandes entité étiologique valeurs absolues de lymphocytes totaux, valeurs absolues des LTDN $\alpha\beta$

C. Conclusion

Les lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta (CD3+CD4-CD8- $\alpha\beta$ +) ou « LTDN $\alpha\beta$ » sont une sous-population hétérogène de lymphocytes très faiblement représentés dans la circulation sanguine des sujets sains (<1 % des lymphocytes totaux). Peu de données existent dans la littérature sur leurs rôles physiologiques et pathologiques. Isoler et caractériser chez l'homme en 2005 dans les syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns « ALPS » ainsi que dans beaucoup d'autres étiologies. Notre travail avait comme objectif de faire un point sur les connaissances actuelles des LTDN $\alpha\beta$ et d'identifier les étiologies associées aux augmentations des LTDN $\alpha\beta$.

En nous basant sur les critères diagnostics de l'ALPS, nous avons réalisé une étude rétrospective sur plus de 52 000 immunophénotypes T/B/NK du 4 janvier 2016 au 2 mai 2020 au sein de notre laboratoire nous avons identifié un groupe de 40 patients dont la moyenne d'âge était de 37 ans répondants au critère immunophénotypique de l'ALPS avec des lymphocytes T doubles négatifs > à 12 % des lymphocytes totaux avec des lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta > à 1,5 % des lymphocytes totaux. Ceci est donc une situation très rare (<0,1% des demandes d'immunophénotypage)

Parmi ces patients seulement 3 présentaient un ALPS vrai. La très grande majorité des cas étaient associé à d'autres étiologies impliquant une activation réactionnelle du système immunitaire (transplantation d'organes, auto-immunité, ou une hémopathie). À noter, que 5 patients présentaient un véritable lymphome de phénotype LTDN $\alpha\beta$. L'exploration de la clonalité T a permis de confirmer cette monoclonalité.

Dans la littérature et l'étude précédentes dans notre laboratoire de 2008 à 2012, les valeurs de référence des LTDN $\alpha\beta$ serait $0,02 \pm 0,015$ G/l, on peut considérer que les LTDN $\alpha\beta$ augmentent au-delà de 0,05 G/l. ces résultats sont similaire à ceux que vous avons observé dans notre étude.

Nous observons que les valeurs de LTDN $\alpha\beta$ dans les lymphomes à LTDN $\alpha\beta$ monoclonaux sont les plus élevés suivis des vrais ALPS, MAI, onco-hématologie et les transplantations d'organes.

Discussion

Nous avons dans ce travail essayé de rassembler les données disponibles sur une population de lymphocytes T de phénotypage atypique CD4-CD8- TCR $\alpha\beta$. Cette population est très minoritaire dans la circulation sanguine comme l'a confirmé nos données ($<0,02G/l$). Cette population présente un intérêt diagnostique dans une pathologie dysimmunitaire rare l'ALPS qui reste à l'heure actuelle la principale indication poussant à s'intéresser aux LTDN $\alpha\beta$ en pratique clinique.

Pour commencer, les origines des LTDN $\alpha\beta$ circulants sont soit thymiques naïves ou extra thymique mature effecteur ou régulateur. Dans la littérature les LTDN $\alpha\beta$ naïfs et effecteurs sont décrits comme dérivant principalement des lymphocytes T CD8+ par un mécanisme récemment identifié de régulation négative de l'expression de la molécule CD8. Cependant, les LTDN $\alpha\beta$ peuvent également dériver de lymphocytes TCD4+ à fonction régulatrice dont le mécanisme de génération est actuellement méconnu.

L'ALPS est la première entité décrite avec une accumulation de LTDN $\alpha\beta$. Une augmentation de cette population même en pourcentage faible ($>1,5\%$ des lymphocytes totaux) constitue depuis 10 ans un critère diagnostique majeur de l'ALPS. Cependant, il existe de nombreuses autres étiologies beaucoup plus fréquentes qui peuvent s'associer dans de rares cas à une augmentation de LTDN $\alpha\beta$. La description de ces cas est plutôt récente, mal connue en pratique courante et sans doute incomplète. En 2010, au moment de la publication des critères diagnostiques de l'ALPS seul quelques cas de greffes d'organes et les modèles murins de lupus avait été décrits. Au final, l'ALPS ne représente que 5 à 10 % des étiologies même dans les centres d'explorations des déficits immunitaires. Nos résultats confirment que l'ALPS reste un diagnostic rare. Il suit des critères diagnostiques clinico-biologique bien définis, d'où la part très importante de la concordance des informations cliniques et des résultats biologiques. Cependant, de véritables problèmes de diagnostic différentiel peuvent se poser en pratique courante avant l'accessibilité aux résultats spécialisés de confirmation du centre de référence à l'hôpital Necker. Ceci est particulièrement vrai pour des cas d'augmentation de LTDN $\alpha\beta$ associés à des organomégalies dans le cas de lymphome ou de cytopénies dans le cadre de maladies auto-immunes. Une bonne connaissance de l'existence de ces étiologies associées à une augmentation des LTDN $\alpha\beta$ peut permettre d'avancer avec plus de prudence vers un diagnostic juste et d'éviter pour le biologiste d'alerter faussement le clinicien en attente d'orientation diagnostique pour son patient.

En dehors de l'ALPS, les étiologies associées à une augmentation de LTDN $\alpha\beta$ dans la littérature regroupent 3 grandes entités principales : la transplantation d'organes, les maladies auto-immunes et les tumeurs. Dans notre étude, nous retrouvons globalement le même panel d'étiologie. Celle-ci peut comporter bien évidemment un certain nombre de biais du au recrutement de laboratoire. Ceci explique par exemple, l'absence de cas associé à des tumeurs solides puisqu'il n'existe pas en général de suivi immunophénotypique de ces patients. À l'inverse, plusieurs cas de sclérose en plaque ont été décrit ce qui ne semble pas être précisé dans la littérature. Ceci peut s'expliquer par les réalisations fréquentes d'immunophénotypages lymphocytaires chez ces patients pour le suivi de leur immunothérapie. A noter que cette pratique de suivi régulier pour la sclérose en plaque est clairement postérieure à 2010. Mis à part ces quelques exceptions, il faut toutefois souligner que le recrutement très diversifié du laboratoire, pour des indications à la fois hématologiques et immunologiques, constituait un cadre idéal pour aborder la question des étiologies associées à l'une augmentation de LTDN $\alpha\beta$. De plus, la pratique systématique du phénotypage du TCR lors des augmentations significatives de lymphocytes TDN permettait une opportunité assez unique et originale de rechercher ces étiologies dans un contexte large de pratique courante, plus proche des questions de terrain.

Comme le montre ce travail, les augmentations de LTDN $\alpha\beta$ sont rarement rencontrés (<0,08% des immunophénotypages), mais par leur rareté peuvent poser des problèmes d'interprétation et de conduite à tenir aux biologistes immunophénotypeurs à la fois dans leur rôle de validation biologique des examens et de consultant en biologie. Nos données associées à celles de la littérature suggèrent la conduite suivante en cas d'augmentation de LTDN $\alpha\beta$. Tout cas de ce type nécessite une confrontation des données clinico-biologiques. Dans les cas où les patients sont connus pour une greffe, une maladie auto-immune ou tumorale, un simple suivi de cette population semble nécessaire. Cependant en cas d'association avec des organomégalies et/ou des cytopénies, la recherche des critères secondaires de l'ALPS est nécessaire. De plus, une recherche étiologique de lymphome doit être réalisé. En cas d'éléments cliniques évocateurs, ou d'anomalie cytologique ou d'une élévation de LTDN $\alpha\beta$ > 0,3 G/l, une approche de la clonalité de la population LTDN $\alpha\beta$ doit être réalisée par analyse du répertoire Vb β par cytométrie en flux. On notera que dans notre cohorte, 5 véritables lymphomes T DN $\alpha\beta$ ont pu ainsi être diagnostiqué bien que ce phénotype soit sensé être extrêmement rare et très mal connu. Les cas décrits dans la littérature sont plutôt de mauvais pronostic.

Au-delà de leur intérêt comme outil dans le domaine du diagnostic *in vitro*, des pistes thérapeutiques avec des LTDN $\alpha\beta$ effecteurs dans les néoplasies et les infections sont à l'étude

pouvant aboutir à de nouvelles thérapeutiques. De même, il y a un intérêt grandissant pour les LTDN $\alpha\beta$ régulateurs dans la greffe comme un critère prédictif de rejets dans les transplantations d'organes solides ou de rechute en post allogreffe dans les hémopathies malignes. Toutes ces observations encouragent à une meilleure connaissance de cette population minoritaire de lymphocytes T afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Résumé

Les lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta (CD3+CD4-CD8- $\alpha\beta$ +) ou « LTDN $\alpha\beta$ » sont une sous-population hétérogène de lymphocytes très faiblement représentés dans la circulation sanguine des sujets sains (<1 % des lymphocytes totaux). Peu de données existent dans la littérature sur leurs rôles physiologiques et pathologiques. Isoler et caractériser chez l'homme en 2005 dans les syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns « ALPS » ainsi que dans beaucoup d'autres étiologies. Notre travail avait comme objectif de faire un point sur les connaissances actuelles des LTDN $\alpha\beta$ et d'identifier les étiologies associées à leurs augmentations. Pour commencer, les origines des LTDN $\alpha\beta$ circulants sont soit thymiques naïves ou extra thymique mature effecteur ou régulateur. Dans la littérature les LTDN $\alpha\beta$ naïfs et effecteurs sont décrits comme dérivant principalement des lymphocytes T CD8+ par un mécanisme récemment identifié de régulation négative de l'expression de la molécule CD8. Cependant, les LTDN $\alpha\beta$ peuvent également dériver de lymphocytes TCD4+ à fonction régulatrice dont le mécanisme de génération est actuellement méconnu.

En nous basant sur les critères diagnostics de l'ALPS, nous avons réalisé une étude rétrospective sur plus de 52 000 immunophénotypes T/B/NK du 4 janvier 2016 au 2 mai 2020 au sein de notre laboratoire nous avons identifié un groupe de 40 patients dont la moyenne d'âge était de 37 ans répondants au critère immunophénotypique de l'ALPS avec des lymphocytes T doubles négatifs > à 12 % des lymphocytes totaux avec des lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta > à 1,5 % des lymphocytes totaux. Ceci est donc une situation très rare (<0,1% des demandes d'immunophénotypage). Parmi ces patients seulement 3 présentaient un ALPS vrai. La très grande majorité des cas étaient associés à d'autres étiologies impliquant une activation réactionnelle du système immunitaires (transplantation d'organes, auto-immunité, ou une hémopathie). A noter, que 5 patients présentaient un véritable lymphome de phénotype LTDN $\alpha\beta$. L'exploration de la clonalité T a permis de confirmer cette monoclonalité.

Ces augmentations de LTDN $\alpha\beta$ (au-delà de 0,05 G/l) sont rarement rencontrés en routine (<0,08% des immunophénotypes), mais par leur rareté peuvent poser des problèmes d'interprétation et de conduite à tenir aux biologistes. Nos données associées à celles de la littérature suggèrent la nécessité d'une confrontation des données clinico-biologiques, Ainsi une meilleure connaissance de ces étiologies peut aider le biologiste immunophénotypeur à la fois dans leur rôle de validation biologique des examens et de consultant en biologie pour guider le clinicien dans l'interprétation de ces situations rares de mise en évidence d'une augmentation LTDN $\alpha\beta$.

Mots clés :

TCRa β , Syndrome lymphoprolifératif auto-immun, Fas, lymphocytes T doubles négatifs $\alpha\beta$, lupus érythémateux disséminé, maladie auto-immune, transplantation d'organe.

Summary

Double negative $\alpha\beta$ T cells (CD3 + CD4- CD8- $\alpha\beta$ +) or 'DNTC $\alpha\beta$ ' are a heterogeneous subpopulation of lymphocytes and very poorly represented in the bloodstream of healthy people (<1% of total lymphocytes). Very little data exists in the literature on their physiological and pathological roles.

Two origins described in the literature on the generation process of DNTC $\alpha\beta$, the first is intrathymic by their escape to negative selection in the thymus which allows their expansion in peripheral blood, so thymic DNTC $\alpha\beta$ are immature and naïve and the second origin is extrathymic, extra-thymic DNTC $\alpha\beta$ where: effector (derived from CD8 + LyTs thanks to the downregulation of CD8 expression) or regulatory (derived from CD4 + LyTs thanks to the downregulation of expression of CD4).

DNTC $\alpha\beta$ are isolated and characterised in 2005 in autoimmune lymphoproliferative syndromes 'ALPS' as well as in many other etiologies. Our work aimed to take stock of current knowledge of $\alpha\beta$ LTDNs and identify the etiologies associated with their increases. To begin with, the origins of circulating DNTCs $\alpha\beta$ are either naïve thymic or mature effector or regulator extrathymic. In the literature, naïve and effector DNTCs $\alpha\beta$ are described as deriving mainly from CD8 + T cells by a recently identified mechanism of downregulation of the expression of the CD8. However, DNTCs $\alpha\beta$ can also be derived from CD4 + T cells with regulatory function, the generation mechanism is currently unknown.

Based on the diagnostic criteria of the ALPS, we performed a retrospective study of more than 52,000 T/B/NK lymphocyte typing from January 4, 2016, to Mai 2, 2020, in our laboratory. 40 independents patients responding to revised diagnostic criteria of ALPS with DNTC > 12% of total lymphocytes with DNTC $\alpha\beta$ > 1.5% of total lymphocytes, average age was only 37 years old, Only 3 cases of ALPS . The majority of cases were associated with other etiologies involving a reactive activation of the immune system (organ transplantation, autoimmunity, or blood disease). It should be noted that 5 patients presented a true lymphoma of the LTDN $\alpha\beta$ phenotype (Exploration of the T clonality confirmed this monoclonality).

The increases DNTCs $\alpha\beta$ (beyond 0.05 G / l) are rarely encountered (<0.08% of all immunophenotyping), but their rarity may have problems of interpretation and behavior for biologists. Our data associated with the literature suggest the need for a comparison of clinical-biological data, a better knowledge of these etiologies can help the immunophenotyping biologist both in their role of biological validation and of consultant in biology for guides the clinician in the interpretation of these rare situations showing an increase in LTDN $\alpha\beta$.

Références

- 1 Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6(7):782-789.
- 2 Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(7):2828-2835.
- 3 Morel J, Berthelot M, LE LYMPHOCYTE T : DE LA THÉORIE À LA PRATIQUE, Club rhumatismes et inflammations, fiches immunologie, 2007 chapitre 2
- 4 Claude Lambert. Lymphocytes T non conventionnels circulants détectés par cytométrie en flux. Immunologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2005.
- 5 David A. Ferrick, D. P. King, K. A. Jackson, Intraepithelial $\gamma\delta$ T lymphocytes: sentinel cells at mucosal barriers, Springer Seminars in Immunopathology volume 22, pages283–296(2000)
- 6 Chen J, Niu H, He W, Ba D. Antitumor activity of expanded human tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2001;125(3):256-263.
- 7 Chen ZW, Letvin NL. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm. *Trends Immunol.* 2003;24(4):213-219
- 8 De Rosa SC, Mitra DK, Watanabe N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. *J Leukoc Biol.* 2001;70(4):518-526.
- 9 Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. De Rosa .*J Leukoc Biol.* 2001
- 10 Jameson JM, Cauvi G, Witherden DA, Havran WL. A keratinocyte-responsive gamma delta TCR is necessary for dendritic epidermal T cell activation by damaged keratinocytes and maintenance in the epidermis. *J Immunol.* 2004;172(6):3573-3579
- 11 Collège des Enseignants d'Immunologie. Immunologie fondamentale et immunopathologie (DFGSM2-3 Médecine), 2^{ème} édition, 2018 (French Edition) (Emplacements du Kindle 2860-2873). Elsevier Health Sciences. Édition du Kindle.
- 12 Choufi B, Lassoued K, The thymus in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation, *Hématologie* Volume 18, issue 5, 2012
- 13 Le Deist, F, Rieux-Laucat, F ; Hivroz, C, Anomalies d'expression du complexe récepteur T de l'antigène/CD3 et déficits immunitaires, *Med Sci (Paris)*, 2007, Vol. 23, N° 2 ; p. 161-166
- 14 Aymeric JL, Lefranc G, Immunologie humaine De Boeck Supérieur, 2011
- 15 Sewell AK. Why must T cells be cross-reactive?. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(9):669-677.
- 16 Brandt D, Hedrich CM. TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2018;17(4):422-430
- 17 Call ME, Wucherpennig KW. Molecular mechanisms for the assembly of the T cell receptor-CD3 complex. *Mol Immunol.* 2004;40(18):1295-1305.
- 18 Werlen G, Palmer E. The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(3):299-305¹⁸ CD3 complex and immunodeficiencies Le Deist *Med Sci* 2007
- 19 Le Deist, F, Rieux-Laucat, F ; Hivroz, C, Anomalies d'expression du complexe récepteur T de l'antigène/CD3 et déficits immunitaires, *Med Sci (Paris)*, 2007, Vol. 23, N° 2 ; p. 161-166

- 20 Martina MN, Noel S, Saxena A, Rabb H, Hamad AR. Double negative (DN) $\alpha\beta$ T cells: misperception and overdue recognition. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(3):305-310.
- 21 Joachims ML, Chain JL, Hooker SW, Knott-Craig CJ, Thompson LF. Human alpha beta and gamma delta thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR beta expression, and gamma delta developmental potential--differences between men and mice. *J Immunol.* 2006;176(3):1543-1552.
- 22 Chapman, J.C., Chapman, F.M. & Michael, S.D. The production of alpha/beta and gamma/delta double negative (DN) T-cells and their role in the maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 73 (2015)
- 23 DikWA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EFE, Baert MRM, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med* 2005;201:1715-23.
- 24 Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2002;2:760-72
- 25 Kreslavsky T, Kim HJ, Koralov SB, et al. Negative selection, not receptor editing, is a physiological response of autoreactive thymocytes. *J Exp Med.* 2013;210(10):1911-1918. doi:10.1084/jem.20130876
- 26 JoachimsML, Chain JL, Hooker SW, Knott-Craig CJ, Thompson LF. Human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ thymocyte development: TCR gene rearrangements, intracellular TCR β expression and $\gamma\delta$ developmental potential – differences between men and mice. *J Immunol Baltim Md* 1950 2006;176:1543-52.
- 27 Hayes SM, Li L, Love PE. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* 2005;22:583-93. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.014>.
- 28 Mayans S, Stepniak D, Palida S, Larange A, Dreux J, Arlian B, et al. $\alpha\beta$ T cell receptors expressed by CD4-CD8 $\alpha\beta$ -intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities. *Immunity* 2014;41:207-18.
- 29 Wang R, Wang-Zhu Y, Grey H. Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(4):2181-2186.
- 30 Baldwin TA, Sandau MM, Jameson SC, Hogquist KA. The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection. *J Exp Med.* 2005;202(1):111-121.
- 31 Priatel JJ, Utting O, Teh HS. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2001;167:6188-94.
- 32 PE Love, EW Shores, MD Johnson, T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *American Association for the Advancement of Science* 1993 vol. 261 no. 5123 918-921
- 33 Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol.* 2008;181(12):8761-8766.
- 34 Tarbox JA, Keppel MP, Topcagic N, et al. Elevated double negative T cells in pediatric autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2014;34 (5):594-599
- 35 Hedrich CM, Crispin JC, Tsokos GC. Epigenetic regulation of cytokine expression in systemic lupus erythematosus with special focus on T cells. *Autoimmunity.* 2014;47(4):234-241
- 36 Michelle L. T. Nguyen, Sarah A. Jones, Julia E. Prier, Transcriptional enhancers in the regulation of T cell differentiation, *Front. Immunol.* 2015
- 37 Kieffer LJ, Yan L, Hanke JH, Kavathas PB. Appropriate developmental expression of human CD8 beta in transgenic mice. *J Immunol.* 1997;159(10):4907-4912.
- 38 Zhang XL et al. CD8 expression up to the double-positive CD3(low/intermediate) stage of thymic differentiation is sufficient for development of peripheral functional cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001
- 39 Lambolez F, Kronenberg M, Cheroutre H. Thymic differentiation of TCR alpha beta(+) CD8 alpha alpha(+) IELs. *Immunol Rev.* 2007;215:178-188.
- 40 Bilic I, Koesters C, Unger B, et al. Negative regulation of CD8 expression via Cd8 enhancer-mediated recruitment of the zinc finger protein MAZR. *Nat Immunol.* 2006;7(4):392-400. doi:10.1038/ni1311

- ⁴¹ Ellmeier W, Haust L, Tschisnarov R. Transcriptional control of CD4 and CD8 coreceptor expression during T cell development. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(23):4537-4553. doi:10.1007/s00018-013-1393-2
- ⁴² Pobeziński LA, Angelov GS, Tai X, et al. Clonal deletion and the fate of autoreactive thymocytes that survive negative selection. *Nat Immunol.* 2012;13(6):569-578.
- ⁴³ Mayans S, Stepniak D, Palida S, et al. $\alpha\beta$ T cell receptors expressed by CD4(-)CD8 $\alpha\beta$ (-) intraepithelial T cells drive their fate into a unique lineage with unusual MHC reactivities. *Immunity.* 2014;41(2):207-218.
- ⁴⁴ Brandt D, Hedrich CM. TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2018;17(4):422-430.
- ⁴⁵ Ford MS, Zhang Z-X, Chen W, Zhang L. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J Immunol Baltim Md.* 2006
- ⁴⁶ Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood.* 2007;109(9):4071-4079.
- ⁴⁷ Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6(7):782-789.
- ⁴⁸ Ford MS, Young KJ, Zhang Z, Ohashi PS, Zhang L. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 2002;196(2):261-267
- ⁴⁹ Ma Y, He KM, Garcia B, Min W, Jevnikar A, Zhang ZX. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation.* 2008;15(1):56-63.
- ⁵⁰ Kathy M. He, Yuexia Ma, Shuang Wang, Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. He KM *European journal of immunology.* European Journal of Immunology, 2007Volume 37, Issue 12
- ⁵¹ Julia Fang Gao, Megan S. Ford McIntyre, Stephen C. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. . Gao JF *European journal of immunology.* 2011, Volume 41, Issue 9
- ⁵² Grishkan IV, Ntranos A, Calabresi PA, Gocke AR. Helper T cells down-regulate CD4 expression upon chronic stimulation giving rise to double-negative T cells. *Cell Immunol.* 2013;284(1-2):68-74.
- ⁵³ Zhang ZX et al. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nature medicine.* 2000.
- ⁵⁴ Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood.* 2007;109(9):4071-4079.
- ⁵⁵ Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 2005;105(7):2828-2835.
- ⁵⁶ Ligocki AJ, Niederkorn JY. Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. *Transplantation.* 2015;99(8):1553-1559.
- ⁵⁷ Strober S, Dejbachsh-Jones S, Van Vlasselaer P, Duwe G, Salimi S, Allison JP. Cloned natural suppressor cell lines express the CD3+CD4-CD8- surface phenotype and the alpha, beta heterodimer of the T cell antigen receptor. *J Immunol.* 1989;143(4):1118-1122.
- ⁵⁸ Hedrich CM et al. CAMP-responsive element modulator α (CREM α) trans-represses the transmembrane glycoprotein CD8 and contributes to the generation of CD3+CD4-CD8- T cells in health and disease.. *J Biol Chem.* 2013
- ⁵⁹ Hedrich CM, Rauen T, Crispin JC, et al. cAMP-responsive element modulator α (CREM α) trans-represses the transmembrane glycoprotein CD8 and contributes to the generation of CD3+CD4-CD8- T cells in health and disease. *J Biol Chem.* 2013;288(44):31880-31887.
- ⁶⁰ Hassan H, Sakaguchi S, Tenno M, et al. Cd8 enhancer E8I and Runx factors regulate CD8 α expression in activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(45):18330-18335.
- ⁶¹ Zhang ZX, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med (Berl).* 2001;79(8):419-427.

- ⁶² Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med*. 2000;6(7):782-789.
- ⁶³ Zhang ZX, Young K, Zhang L. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(8):419-427.
- ⁶⁴ Juvet SC, Zhang L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(1):48-58.
- ⁶⁵ Harland, K. L., Day, E. B., Apte, S. H., Russ, B. E., Doherty, P. C., Turner, S. J., & Kelso, A. Epigenetic plasticity of Cd8a locus during CD8 + T-cell development and effector differentiation and reprogramming. *Nature Communications* 2014
- ⁶⁶ Onodera A, Yamashita M, Endo Y, et al. STAT6-mediated displacement of polycomb by trithorax complex establishes long-term maintenance of GATA3 expression in T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 2010;207(11):2493-2506.
- ⁶⁷ Hedrich CM, Crispín JC, Rauen T, et al. cAMP responsive element modulator (CREM) α mediates chromatin remodeling of CD8 during the generation of CD3+ CD4- CD8- T cells. *J Biol Chem*. 2014;289(4):2361-2370. doi:10.1074/jbc.M113.523605
- ⁶⁸ Hassan H. Cd8 enhancer E8I and Runx factors regulate CD8 α expression in activated CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011
- ⁶⁹ Balomenos D, Rumold R, Theofilopoulos AN. The proliferative in vivo activities of lpr double-negative T cells and the primary role of p59fyn in their activation and expansion. *J Immunol*. 1997;159(5):2265-2273
- ⁷⁰ Juvet SC, Zhang L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(1):48-58.
- ⁷¹ Zhang ZX et al. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000
- ⁷² Juvet SC, Zhang L. Double negative regulatory T cells in transplantation and autoimmunity: recent progress and future directions. *J Mol Cell Biol*. 2012;4(1):48-58.
- ⁷³ Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol*. 2008;181(4):2271-2275.
- ⁷⁴ Ford McIntyre MS, Young KJ, Gao J, Joe B, Zhang L. Cutting edge: in vivo trogocytosis as a mechanism of double negative regulatory T cell-mediated antigen-specific suppression. *J Immunol*. 2008;181(4):2271-2275.
- ⁷⁵ Thomson CW, Lee BP, Zhang L. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol Res*. 2006;35(1-2):163-178.
- ⁷⁶ Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood*. 2007;109(9):4071-4079.
- ⁷⁷ Ma Y et al. Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation*. 2008
- ⁷⁸ Young KJ et al. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Human immunology*. 2002
- ⁷⁹ Zhang ZX, Lian D, Huang X, et al. Adoptive transfer of DNT cells induces long-term cardiac allograft survival and augments recipient CD4(+)Foxp3(+) Treg cell accumulation. *Transpl Immunol*. 2011;24(2):119-126.
- ⁸⁰ Gao JF, McIntyre MS, Juvet SC, et al. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(9):2699-2708.
- ⁸¹ Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(3):739-748
- ⁸² McIver Z, Serio B, Dunbar A, et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008;141(2):170-178.
- ⁸³ Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood*. 2007;109(9):4071-4079.

- 84 Hertl et al. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques 2018
- 85 Martín-Antonio B, Granell M, Urbano-Ispizua A. Genomic polymorphisms of the innate immune system and allogeneic stem cell transplantation. *Expert Rev Hematol*. 2010;3(4):411-427.
- 86 McIver Z, Serio B, Dunbar A, et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2008;141(2):170-178
- 87 Ye H, Chang Y, Zhao X, Huang X. Characterization of CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells reconstitution in patients following hematopoietic stem-cell transplantation. *Transpl Immunol*. 2011;25(4):180-186.
- 88 Ligocki AJ, Niederkorn JY. Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. *Transplantation*. 2015;99(8):1553-1559.
- 89 Moorman JP, Prayther D, McVay D, Hahn YS, Hahn CS. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology*. 2003;312(2):320-329.
- 90 Schütz C, Fischer K, Völkl S, et al. A new flow cytometric assay for the simultaneous analysis of antigen-specific elimination of T cells in heterogeneous T cell populations. *J Immunol Methods*. 2009;344(2):98-108.
- 91 Kotaro Nagase, Reiko Shirai, Takeshi Okawa, CD4/CD8 Double-negative Mycosis Fungoides Mimicking Erythema Gyrratum Repens in a Patient with Underlying Lung Cancer, Nagase K. *Acta Derm Venereol* . 2014
- 92 Fierro MT, Novelli M, Savoia P, et al. CD45RA+ immunophenotype in mycosis fungoides: clinical, histological and immunophenotypical features in 22 patients. *J Cutan Pathol*. 2001;28(7):356-362.
- 93 Ito A, Sugita K, Ikeda A, Yamamoto O. CD4/CD8 Double-negative Mycosis Fungoides: A Case Report and Literature Review. *Yonago Acta Med*. 2019;62(1):153-158.
- 94 Hodak E, David M, Maron L, Aviram A, Kaganovsky E, Feinmesser M. CD4/CD8 double-negative epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: an immunohistochemical variant of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(2):276-284.
- 95 Massone C, Crisman G, Kerl H, Cerroni L. The prognosis of early mycosis fungoides is not influenced by phenotype and T-cell clonality. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):881-886.
- 96 Cooke CB, Krenacs L, Stetler-Stevenson M, et al. Hepatosplenic T-cell lymphoma: a distinct clinicopathologic entity of cytotoxic gamma delta T-cell origin. *Blood*. 1996;88(11):4265-4274
- 97 Mackey AC, Green L, Liang LC, Dinndorf P, Avigan M. Hepatosplenic T cell lymphoma associated with infliximab use in young patients treated for inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007;44(2):265-267.
- 98 Suarez F, Wlodarska I, Rigal-Huguet F, et al. Hepatosplenic alphabeta T-cell lymphoma: an unusual case with clinical, histologic, and cytogenetic features of gammadelta hepatosplenic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1027-1032.
- 99 Alsohaibani FI, Abdulla MA, Fagih MM. Hepatosplenic T-cell lymphoma. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2011;27(1):39-42
- 100 Khader A, Shaan M, Balakrishnan S, Ambooken B, Muhammed K, Rajan U. Multifaceted adult T-cell leukemia/lymphoma in India: a case series. *Indian J Dermatol*. 2015;60(1):103.
- 101 Matutes E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007 ; 60(12) : 1373-1377.
- 102 Lin TH, Wu HC, Hsieh YC, Tseng CE, Ichinohasama R, Chuang SS. CD4 and CD8 double-negative adult T-cell leukemia/lymphoma with monomorphic cells expressing CD99: a diagnostic challenge in a country non-endemic for human T-cell leukemia virus. *Pathol Int*. 2013;63(2):132-137.
- 103 Alsohaibani FI, Abdulla MA, Fagih MM. Hepatosplenic T-cell lymphoma. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2011;27(1):39-42.
- 104 Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(44):9694-9705.
- 105 Lu Y, Hu P, Zhou H, et al. Double-negative T Cells Inhibit Proliferation and Invasion of Human Pancreatic Cancer Cells in Co-culture. *Anticancer Res*. 2019;39(11):5911-5918.

- ¹⁰⁶Movia D, Bazou D, Prina-Mello A. ALI multilayered co-cultures mimic biochemical mechanisms of the cancer cell-fibroblast cross-talk involved in NSCLC MultiDrug Resistance. *BMC Cancer*. 2019;19(1):854.
- ¹⁰⁷ Merims S, Li X, Joe B, et al. Anti-leukemia effect of ex vivo expanded DNT cells from AML patients: a potential novel autologous T-cell adoptive immunotherapy. *Leukemia*. 2011;25(9):1415-1422.
- ¹⁰⁸ Rojo AI, Rada P, Mendiola M, et al. The PTEN/NRF2 axis promotes human carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(18):2498-2514.
- 109 WHO | Leishmaniasis. WHO. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/
- 110 Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, et al. CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):219.
- ¹¹¹ Maladies-auto-immunes. INSERM 2020
- ¹¹² Brandt D, Hedrich CM. TCR $\alpha\beta$ ⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2018;17(4):422-430.
- ¹¹³Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2110-2121.
- ¹¹⁴ Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*. 2008;181(12):8761-8766.
- ¹¹⁵Sieling PA, Porcelli SA, Duong BT, et al. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J Immunol*. 2000;165(9):5338-5344.
- ¹¹⁶ Lai ZW, Borsuk R, Shadakshari A, et al. Mechanistic target of rapamycin activation triggers IL-4 production and necrotic death of double-negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2013;191(5):2236-2246
- ¹¹⁷ Koga T, Hedrich CM, Mizui M, et al. CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- α underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2234-2245.
- ¹¹⁸Gan Y, Zhao X, He J, et al. Increased Interleukin-17F is Associated with Elevated Autoantibody Levels and More Clinically Relevant Than Interleukin-17A in Primary Sjögren's Syndrome. *J Immunol Res*. 2017;2017:4768408
- 119 Alunno A, Bistoni O, Bartoloni E, et al. IL-17-producing CD4-CD8- T cells are expanded in the peripheral blood, infiltrate salivary glands and are resistant to corticosteroids in patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(2):286-292.
- 120 Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):491
- 121 Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol*. 2008;181(3):2211-2219.
- 122 Crispín JC, Tsokos GC. Human TCR-alpha beta⁺ CD4- CD8- T cells can derive from CD8⁺ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol*. 2009;183(7):4675-4681.
- 123 Brandt D, Serгон M, Abraham S, Mäbert K, Hedrich CM. TCR⁺CD3⁺CD4⁻CD8⁻ effector T cells in psoriasis. *Clin Immunol*. 2017;181:51-59
- 124 Grozdev I, Korman N, Tsankov N. Psoriasis as a systemic disease. *Clin Dermatol*. 2014;32(3):343-350.
- 125 Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:227-255
- 126 Ueyama A, Imura C, Fusamae Y, et al. Potential role of IL-17-producing CD4/CD8 double negative $\alpha\beta$ T cells in psoriatic skin inflammation in a TPA-induced STAT3C transgenic mouse model. *J Dermatol Sci*. 2017;85(1):27-35.¹²⁶, PD-1/PD-L and autoimmunity:a growing relationship. Zamani MR. *Cell Immunol* 2016
- 127 Rieux-Laucat F. Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité: un défaut hérité ou acquis d'apoptose lymphocytaire [Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an inherited or a somatic defect of apoptosis]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(6-7):645-650.

- 128 Sneller MC, Wang J, Dale JK, et al. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood*. 1997;89(4):1341-1348.
129. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001;98(1):194-200.
- 130 Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, et al. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001;98(1):194-200.
- ¹³¹ Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010;116(14):e35-e40.
- 132 Jackson CE, Fischer RE, Hsu AP, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Genet*. 1999;64(4):1002-1014.
- ¹³³ Normalfunction gene FAS genetic home ref, NIH 2020
- 134 Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, et al. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci*. 1999;19(10):3809-3817.
- 135 Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*. 2005;105(7):2828-2835.
- 136 Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*. 2000;288(5475):2354-2357
- 137 Kuehn HS, Caminha I, Niemela JE, et al. FAS haploinsufficiency is a common disease mechanism in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Immunol*. 2011;186(10):6035-6043.
- 138 Van der Burg M, de Groot R, Comans-Bitter WM, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a child from consanguineous parents: a dominant or recessive disease?. *Pediatr Res*. 2000;47(3):336-343
- 139 Kucuk ZY, Charbonnier LM, McMasters RL, Chatila T, Bleesing JJ. CTLA-4 haploinsufficiency in a patient with an autoimmune lymphoproliferative disorder. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140 (3):862-864.e4.
- 140 Bi LL, Pan G, Atkinson TP, et al. Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med Genet*. 2007;8:41.
- 141 Doriane Sanséau. FAS (Fas cell surface death receptor). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2014
- 142 Matson DR, Yang DT. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: An Overview. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(2):245-251
- 135 Strich R. Programmed Cell Death Initiation and Execution in Budding Yeast. *Genetics*. 2015;200(4):1003-1014.
- ¹⁴⁴ Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma*. 2004;45(3):423-431.
- 145 Aurélie Pépin. Régulation de l'apoptose des lymphocytes T par les protéines de la famille TSC22D. *Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI*, 2011.
- ¹⁴⁶ Bride K, Teachey D. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: more than a FAScinating disease. *F1000Res*. 2017;6:1928.
- ¹⁴⁷ Rieux-Laucat F. Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité : un défaut hérité ou acquis d'apoptose lymphocytaire [Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an inherited or a somatic defect of apoptosis]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(6-7):645-650.
- 148 Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010;116(14):e35-e40.
- 149 Caminha I, Fleisher TA, Hornung RL, et al. Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(4):946-949.e6.

- 150 Seif AE, Manno CS, Sheen C, Grupp SA, Teachey DT. Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study. *Blood*. 2010;115(11):2142-2145.
- 151 Savaşan S, Warriar I, Buck S, Kaplan J, Ravindranath Y. Increased lymphocyte Fas expression and high incidence of common variable immunodeficiency disorder in childhood Evans' syndrome. *Clin Immunol*. 2007;125(3):224-229.
- ¹⁵² Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010;116(14):e35-e40.
- 153 Magerus-Chatinet A, Stolzenberg MC, Loffredo MS, et al. FAS-L, IL-10, and double-negative CD4⁻ CD8⁻ TCR alpha/beta⁺ T cells are reliable markers of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) associated with FAS loss of function. *Blood*. 2009;113(13):3027-3030.
- 154 Speckmann C, Lehmborg K, Albert MH, et al. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) deficiency: the spectrum of presenting manifestations beyond hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin Immunol*. 2013;149(1):133-141.
- 155 Kuehn HS, Caminha I, Niemela JE, et al. FAS haploinsufficiency is a common disease mechanism in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Immunol*. 2011;186(10):6035-6043.
- 156 Poppema S. Et al. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leukemia & lymphoma*. 2004
- ¹⁵⁷ Chadburn A, Said J, Gratzinger D, et al. HHV8/KSHV-Positive Lymphoproliferative Disorders and the Spectrum of Plasmablastic and Plasma Cell Neoplasms: 2015 SH/EAHP Workshop Report-Part 3. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(2):171-187.
- ¹⁵⁸ Fajgenbaum DC, van Rhee F, Nabel CS. HHV-8-negative, idiopathic multicentric Castleman disease: novel insights into biology, pathogenesis, and therapy. *Blood*. 2014;123(19):2924-2933.
- 159 Nabel CS, Sameroff S, Shilling D, et al. Virome capture sequencing does not identify active viral infection in unicentric and idiopathic multicentric Castleman disease. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218660.
- 160 Sbihi Z, Dossier A, Boutboul D, et al. iNKT and memory B-cell alterations in HHV-8 multicentric Castleman disease. *Blood*. 2017;129(7):855-865.
- 161 Li Z, Lan X, Li C, et al. Recurrent PDGFRB mutations in unicentric Castleman disease. *Leukemia*. 2019;33(4):1035-1038.
- 162 Daniel R. Matson, MD, PhD, Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome: An Overview , *Arch Pathol Lab Med* (2020) 144 (2): 245–251
- 163 Boggio E, Clemente N, Mondino A, et al. IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes. *Blood*. 2014;123(8):1178-1186.
- 164 Neven B, Bruneau J, Stolzenberg MC, et al. Defective anti-polysaccharide response and splenic marginal zone disorganization in ALPS patients. *Blood*. 2014;124(10):1597-1609.
- 165 Oliveira JB, Bidère N, Niemela JE, et al. NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 ; 104 (21) : 8953-8958.
- 166 Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, et al. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*. 2002;419(6905):395-399.
- 167 TA Fleisher, JB Oliveira Autoimmune lymphoproliferative syndrome.. *Primary Immunodeficiency Diseases books*. 2013
- 168 Thommen DS, Schreiner J, Müller P, et al. Progression of Lung Cancer Is Associated with Increased Dysfunction of T Cells Defined by Coexpression of Multiple Inhibitory Receptors. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(12):1344-1355.
- 169 Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, et al. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol*. 2003;23(5):385-400.
- 170 Lee WI, Huang JL, Yeh KW, et al. Clinical features and genetic analysis of Taiwanese patients with the hyper IgM syndrome phenotype. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 ; 32 (9) : 1010-1016.
- 171 Latourelle JC, Sun M, Lew MF, et al. The Gly2019Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's

disease: the GenePD study. *BMC Med.* 2008;6:32.

172 Milner JD, Vogel TP, Forbes L, et al. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood.* 2015;125(4):591-599.

173 Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood.* 2011;118(22):5741-5751.

174 Bride KL, Vincent T, Smith-Whitley K, et al. Sirolimus is effective in relapsed/refractory autoimmune cytopenias: results of a prospective multi-institutional trial. *Blood.* 2016;127(1):17-28.

175 Dowdell KC, Niemela JE, Price S, et al. Somatic FAS mutations are common in patients with genetically undefined autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood.* 2010;115(25):5164-5169.

176 Rieux-Laucat F. What's up in the ALPS. *Curr Opin Immunol.* 2017;49:79-86.

177 Tourrel-Cuzin C, Gausseres B, Principe de la cytométrie en flux et du tri cellulaire, Unité de Biologie fonctionnelle et adaptative - CNRS UMR 8251. Université de Paris Diderot. 2020

SERMENT DE GALIEN

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

- ❖ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

Résumé

Les lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta (CD3+CD4-CD8- $\alpha\beta$ +) ou « LTDN $\alpha\beta$ » sont une sous-population hétérogène de lymphocytes très faiblement représentés dans la circulation sanguine des sujets sains (<1 % des lymphocytes totaux). Peu de données existent dans la littérature sur leurs rôles physiologiques et pathologiques. Isoler et caractériser chez l'homme en 2005 dans les syndromes lymphoprolifératifs auto-immuns « ALPS » ainsi que dans beaucoup d'autres étiologies. Notre travail avait comme objectif de faire un point sur les connaissances actuelles des LTDN $\alpha\beta$ et d'identifier les étiologies associées à leurs augmentations. Pour commencer, les origines des LTDN $\alpha\beta$ circulants sont soit thymiques naïves ou extra thymique mature effecteur ou régulateur. Dans la littérature les LTDN $\alpha\beta$ naïfs et effecteurs sont décrits comme dérivant principalement des lymphocytes T CD8+ par un mécanisme récemment identifié de régulation négative de l'expression de la molécule CD8. Cependant, les LTDN $\alpha\beta$ peuvent également dériver de lymphocytes TCD4+ à fonction régulatrice dont le mécanisme de génération est actuellement méconnu.

En nous basant sur les critères diagnostics de l'ALPS, nous avons réalisé une étude rétrospective sur plus de 52 000 immunophénotypages T/B/NK du 4 janvier 2016 au 2 mai 2020 au sein de notre laboratoire nous avons identifié un groupe de 40 patients dont la moyenne d'âge était de 37 ans répondants au critère immunophénotypique de l'ALPS avec des lymphocytes T doubles négatifs > à 12 % des lymphocytes totaux avec des lymphocytes T doubles négatifs alpha bêta > à 1,5 % des lymphocytes totaux. Ceci est donc une situation très rare (<0,1% des demandes d'immunophénotypage). Parmi ces patients seulement 3 présentaient un ALPS vrai. La très grande majorité des cas étaient associée à d'autres étiologies impliquant une activation réactionnelle du système immunitaires (transplantation d'organes, auto-immunité, ou une hémopathie). A noter, que 5 patients présentaient un véritable lymphome de phénotype LTDN $\alpha\beta$. L'exploration de la clonalité T a permis de confirmer cette monoclonalité.

Ces augmentations de LTDN $\alpha\beta$ (au-delà de 0,05 G/l) sont rarement rencontrés en routine (<0,08% des immunophénotypages), mais par leur rareté peuvent poser des problèmes d'interprétation et de conduite à tenir aux biologistes. Nos données associées à celles de la littérature suggèrent la nécessité d'une confrontation des données clinico-biologiques, Ainsi une meilleure connaissance de ces étiologies peut aider le biologiste immunophénotypeur à la fois dans leur rôle de validation biologique des examens et de consultant en biologie pour guider le clinicien dans l'interprétation de ces situations rares de mise en évidence d'une augmentation LTDN $\alpha\beta$.

Mots clés :

TCR $\alpha\beta$, Syndrome lymphoprolifératif auto-immun, Fas, lymphocytes T doubles négatifs $\alpha\beta$, lupus érythémateux disséminé, maladie auto-immune, transplantation d'organe, lymphome T.