

## Caractéristiques des lymphocytes T Non Conventionnels

### Lymphocytes intra-épithéliaux :

Les lymphocytes T appartiennent à deux compartiments, différant par leur ontogénèse et leur distribution tissulaire. Les lymphocytes conventionnels, systémiques, naviguent entre les territoires immunitaires secondaires (rate et ganglions) et constituent la majorité des lymphocytes périphériques. Les lymphocytes intra-épithéliaux sont dédiés aux muqueuses. Ils sont minoritaires dans le sang périphérique mais sont responsables de la protection de toute l'interface entre l'organisme et l'extérieur, qui comporte de très grandes surfaces. Ils ont une origine thymique très brève et complètent leur ontogénèse et sélection dans les territoires immunitaires associés aux muqueuses (MALST) surtout intestinaux (GALT) dans les plaques de Peyer (Guy-Grand 1991, Cruz 1998, Helgeland 1999, Lefrançois 1995, Marquez 2000).

### Lymphocytes T $\gamma\delta$ :

Si les lymphocytes T  $\alpha\beta$ , conventionnels, dichotomisés dans les deux sous-groupes CD4 et CD8, forment la grande majorité des lymphocytes T circulants, ils ne sont pas exclusifs. Il existe, en effet d'autres populations qui sont moins nombreuses et moins connues.

Les lymphocytes T gamma, delta (T $\gamma\delta$ ) sont d'authentiques lymphocytes T qui expriment le CD2 et le CD3 mais leur récepteur spécifique d'antigène est constitué d'une chaîne gamma et d'une chaîne delta (TCR $\gamma\delta$ ). Le récepteur T comprend une partie hyper variable composée de deux éléments VD (chaîne  $\gamma$ ) ou trois éléments VDJ (chaîne  $\delta$ ) (Table IV) dont les combinaisons permettent de constituer une diversité encore plus étendue que pour les T $\alpha\beta$  (M Davis 1988).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  se distinguent des T $\alpha\beta$  par de nombreux aspects (Bluestone 1995). Les lymphocytes T $\gamma\delta$  ont un parcours ontogénique particulier. En effet, s'ils ont un passage obligatoire par le thymus dans les phases très précoces (Helgeland 1997, McVay 1998) avec constitution de la diversité (Galagher 2001) et sélection négative (Dent 1990), ils quittent très rapidement le thymus pour aller continuer leur maturation dans les sites lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT). Les lymphocytes T $\gamma\delta$  semblent particulièrement dédiés à l'immunité de la peau et des muqueuses

notamment intestinales et broncho-pulmonaires (Ferrick 2000, Beagley 1998, Bagriacik 2000). Ils ne représentent qu'une petite fraction (<5 %) des T périphériques mais, du fait de leurs tropismes tissulaires (Di Liberto 2000), leur nombre total dans l'organisme pourrait être aussi important que celui des lymphocytes T $\alpha\beta$ , encore que ceci ne soit pas clairement documenté.

Si leur diversité est potentiellement très grande, ils semblent avoir des fonctions et des distributions dans l'organismes très restreintes selon leurs isotypes. En effet, plusieurs études chez l'adulte ont montré que la répartition des isoformes T $\gamma\delta$  était restreinte selon les compartiments bien que quelques ambiguïtés persistent dans la littérature, dues à un problème de nomenclature (Lefranc 1999). Les isotypes T $\gamma$ 2 $\delta$ 2 (Chen 2003) ou T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 (Parker 1990, Di Libero 1997, Dechanet 1999, De rosa 2001) ou encore  $\gamma$ 1 (Hviid 2000) par exemple, sont très nettement majoritaires dans le sang périphérique alors que les T $\gamma$ 5 $\delta$ 1 prédominent dans la peau et les T $\gamma$ 6 $\delta$ 1 au niveau des muqueuses intestinales ou utérines et les T $\gamma$ 4 $\delta$ 1 dans les tissus lymphoïdes secondaires (ganglions, rate -Carding, 2002-). L'intestin pourrait constituer leur sanctuaire (Lin 1999). Les T $\gamma$ 9 $\delta$ 2 peuvent être l'objet de lymphome nasal (Oyoshi, 2003).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  reconnaissent des déterminants antigéniques présentés par des molécules du MHC mais seulement les groupes "non classiques", ubiquitaires comme le CD1, le MIC-a, le MIC-b...- (Chien 2000, Morita 2003-). Ces molécules MHC "non classiques" présentent des antigènes non peptidiques, mais des particules antigéniques de type phospholipidique ou glycolipidique (Julien 1997, Kato 2001). Ces groupes ne sont pas polymorphiques et les lymphocytes T $\gamma\delta$  n'ont qu'une très faible restriction du groupe MHC (Carding 2002, Chen 2003, Hviid 2000) ce qui les place à la frontière entre l'immunité spécifique (cognitive) et l'immunité non-spécifique (innée).

Les T $\gamma$ 1 reconnaissent plus volontiers les molécules MHC de type MICA ou MICB, ainsi que les molécules HLA A2 et A24 et CD1c. Les T $\gamma$ - $\delta$ 2 reconnaissent des antigènes de stress présentés par les molécules de type HLA DRW53 comme l'Heat Shock Protein (HSP) 65 des mycobactéries (Mak 1998) ou encore des toxines (toxine tétanique, ou toxine du staphylocoque -SEA-) et le palmidronate (Carding 2002).

Classiquement, la plupart des lymphocytes  $\gamma\delta$  n'expriment ni CD4 ni CD8 et ils constituent la majorité des lymphocytes T circulants double négatifs (DN). Une petite fraction des lymphocytes T  $\gamma\delta$  peut cependant exprimer le CD8 (Straube. 2000 ; De Paoli 1991). Ces derniers pourraient avoir un développement ontogénique particulier avec une persistance plus longue dans le thymus (Bagriacik 2000). Le CD8 serait alors impliqué dans l'interaction avec la molécule de MHC non classique (Carding 2002, Hviid 2000, Kawahshima 2003, Gao 2000).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  semblent jouer un rôle essentiel dans l'immunité (Ziegler 2004) notamment contre des micro-organismes à croissance intra-cellulaire tels que les mycobactéries, les borrellia, Francisella Tularensis ou encore les salmonella (Pellegrin 1999, Moore 2000, Jason 2000, Mogues 2001, Kawashima 2003, Chen 2003, Szereday 2003). Par exemple, les antigènes du BCG peuvent induire une forte prolifération des lymphocytes T $\gamma$ 2  $\delta$ 2, très rapidement (Dieli 2003).

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont une importante capacité d'activité cytotoxique (Dieli 2001). Ils pourraient jouer un rôle dans l'immunité anti-virale (Lehner 2000, Gougeon 2000, Lafarge 2001, Celine 2001, Mathiot 2001, Martini 2002, Poccia 2002) et notamment contre le virus du SIDA (Kabelitz 2001, Pellegrin 1999, Sindhu 2003) et anti-parasitaire (De paoli 1992, Troye-Blomberg 1999). Il a également été démontré qu'ils avaient une activité anti-tumorale (Girardi 2001, Kato 2001, Chen 2001, Kobayashi 2001, Ferrarini 2002, Lopez 2002), augmentée par l'action de Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$  - Suzuki 1999-). D'ailleurs, une augmentation des lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans le sang périphérique a été montrée chez des patients qui étaient porteurs d'un lymphome (Mc Clanahan 1999). Ils peuvent avoir une réactivité auto-immune contre la molécule de stress T70 (HSP70).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$  possèdent également une activité immuno-régulatrice (Egan 2000, O'Brien 2000), essentiellement en faveur de la cytotoxicité (proche de l'activité Th1 -Kabelitz 2001, Agrata 2001-). Ils ont une grosse capacité de production de l'Interféron gamma (IFN $\gamma$ ), du TNF $\alpha$  et de chimiokines (Chen 2003). Ils sont également sensibles aux chimiokines, exprimant des récepteurs tels que CXCR3 ; CXCR4 et CCR5 (Glatzel 2002, Meisner).

Ils semblent particulièrement impliqués dans la réponse immune des muqueuses (Dieli 1997, Davies 2004) et notamment des bronches (Salerno 1998, Lahn 1999). Les T $\gamma\delta$  pourraient participer à la protection de la peau contre les staphylocoques (Holne 2003) et prévenir l'inflammation cutanéomuqueuse sous l'action de produits bactériens de la flore intestinale (Falk 1993, Mac Donald 2001) et les réactions allergiques (Schramm 2000). Inversement, dans certaines circonstances, ils peuvent avoir une activité de type Th2. Au cours de l'infection à mycobactéries tuberculosis, ils peuvent produire de l'IL-10 (Rojas 1999). Ils pourraient aussi jouer un rôle dans des syndromes inflammatoires comme l'asthme (Mak 1998, Schramm 2000). Des souris déplétées en T $\gamma\delta$  produisent moins de médiateurs de l'allergie immédiate (IgE, IL-5 – Mak 1998 -). Les T $\gamma\delta$  intra-hépatiques seraient de gros producteurs d'IL-4 (Gerber 1999).

La quantité de lymphocytes T $\gamma\delta$  dans le sang périphérique est très variable chez les patients (Chen 2003) sans que leur signification sémiologique ne soit éclaircie. Cependant, il est maintenant bien démontré qu'ils ont un rôle immuno-pathologique dans certaines maladies notamment auto-immunes (Ichikawa 1991, Olive 1994, Robak 1999, Yin 2000) et particulièrement le diabète (Kretowski 1999,

Steele 2000) ou dans des maladies liées aux bronches notamment l'asthme (Zuany-Amorim 1998, Mc Clanahan, 1999, Schramm 2000).

L'activation des lymphocytes T $\gamma\delta$  peut être observée en absence d'antigène (Fahrer 2000, Meisner ) et induite par des substances moléculaires associées aux pathogènes (PAMS) par l'intermédiaire des toll like receptors (TLR) de groupe 3 ou 9 ou encore du CD36 (Hegdes 2005). L'activation par un antigène est très rapide (débutant dès 4 à 6 jours et induit une expansion clonale très forte (plus de 200 fois) et très prolongée (pouvant persister plus de 7 mois) (Chen 2003). Ainsi, en période d'activation, le lymphocyte T $\gamma\delta$  spécifique d'un antigène peut représenter plus de la moitié (de 48 à 90%) des lymphocytes T $\gamma\delta$  circulants (Chen 2003).

Les T $\gamma\delta$  ont, semble t-il, le même développement phénotypique que les T $\alpha\beta$  avec des états naïfs (CD45 RA+, CD62L+ CD7+, CD27+ -Dieli 2003-). Après rencontre de l'antigène, ils peuvent acquérir un phénotype mémoire, soit effecteur (CD45RA-, CD27-, CD62L- ; CCR7-) avec faible capacité de prolifération et mémoire central (CD103+, CD45 RA+ et CD7+ à forte capacité de prolifération (Chen 2003, De Rosa 2004).

Les T  $\gamma\delta$  ont également des rôles importants dans des fonctions non immunologiques comme l'embryogenèse et l'homéostasie tissulaire. En fait, il semble que les T $\gamma\delta$  soient produits par vagues au moment de l'embryogenèse avec une première production des T $\gamma$ 5 à la 14<sup>e</sup> semaine chez la souris qui migrent dans la peau, suivis des T $\gamma$ 6 dont le maximum est à la 16<sup>e</sup> semaine et qui migrent vers le poumon, les voies aériennes et le thymus. Plus tard, vers la 19<sup>e</sup> semaine, les T $\gamma$ 4 apparaissent et migrent vers le poumon, les ganglions et le sang périphérique. Enfin, sont produits des T $\gamma$ 1 dont la production maximale se trouve au moment de la naissance. Plus récemment, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  ont également été impliqués dans la régulation des mécanismes de cicatrisation épithéliale (Jameson 2002) et dans l'homéostasie de la peau (Jahn 1999, Born 2002, Komano 1995).

## **Lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ :**

Si la plupart des lymphocytes T conventionnels TCR $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> expriment l'isoforme hétérodimérique ( $\alpha\beta$ ) du CD8, une petite fraction de la population exprime une forme homodimérique comprenant deux chaînes CD8 $\alpha$ . Ces lymphocytes sont subséquentement nommés T CD8 $\alpha\alpha$ . Le CD8 $\alpha\alpha$  peut, comme le CD8 $\alpha\beta$  se lier à la molécule MHC classe 1 (Garcia 1996, Renard 1996, Cho 2001) mais avec une affinité différent. Mais leurs ligands préférentiels semblent être des molécules du complexe MHC non classique (ex Qa2 chez la souris), pour lesquels la chaîne CD8 $\beta$  ne semble pas requise (Janeway 1994, Renard 1996, Das 2000). En effet, les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$  gardent la capacité de se développer chez les souris qui n'ont pas de complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (MHC classe 1) comme par exemple, les souris déficitaires en  $\beta 2$  microglobuline (Cheroutre 1995, Gapin 1999, Das 1999, Kronenberg 2005).

Les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$  partagent de nombreuses propriétés fonctionnelles avec les lymphocytes T $\gamma\delta$ . Ils complètent leur maturation dans le MALT (Sun 1997) après un court passage dans le thymus (Dunon 1999, Bagriacik 2000) où ils subissent une sélection (Leishman 2002). Une origine est aussi possible par conversion de T CD8 $\alpha\beta$  conventionnels (Konno 2002). Ce phénomène est contradictoire avec la possibilité de filiation de CD8 $\alpha\alpha$  vers CD8 $\alpha\beta$  au cours de la thymopoïese (Carrasco 1999). Ils ont un fort tropisme muqueux et sont considérés comme faisant partie des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL - Luhtala 1997, Dunon 1999, Imhof 2000-). Ils auraient une diversité très restreinte au sein de l'épithélium intestinal (Helgeleand 1999 chez le rat). Ils sont également richement représentés dans l'épithélium cutané (Spetz 1996).

Les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$  auraient plutôt une activité immuno-régulatrice de type Th1 (Yoshukai 1999). Ils ont été impliqués dans la pathogénie des colites inflammatoires (modèle porcin ; Waters 2001). Mais ils peuvent également exprimer des signes de cytotoxicité (CD56<sup>+</sup> : Arcaro 2001, Kern 1999)

Le CD8 $\alpha\alpha$  peut également être exprimé à la surface des T $\gamma\delta$  et également des lymphocytes NK. La signification physiologique de ces isotypes n'est pas clairement établie (Straub 2001).

## **Lymphocytes T CD56+ :**

Certains lymphocytes peuvent exprimer le CD56, une molécule d'adhérence (NCAM) qui est caractéristique des lymphocytes NK (CD3-).

Le CD 56 peut être exprimé par d'authentiques T conventionnels (CD3+, TCR  $\alpha\beta$ ) qui sont toujours CD8+ mais également par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Arcaro 2001, Kern 1999). Son expression pourrait refléter une activité cytotoxique (Pittet, 2000).

La fraction de lymphocytes T exprimant le CD56 est très variable entre patients et sa signification sémiologique n'est pas connue.

## **Lymphocytes TNK :**

Récemment, il a été montré qu'une catégorie très particulière d'authentiques lymphocytes T (CD2+ ; CD3+) exprimant le récepteur TCR  $\alpha\beta$  avait un phénotype (CD56+) et une activité cytotoxique proche des cellules NK (CD3-CD16+CD56+). Ils peuvent exprimer le CD4 mais généralement expriment le CD8 (isoforme CD8 $\alpha\alpha$ ) ou aucun des deux (DN) (Apostolou 2001). Ils ont un phénotype mature (CD45RO). Il peut également exister des TNK de type T $\gamma\delta$ . Chez la souris, ils expriment un marqueur de NK spécifique : NK1.1 dont l'expression peut être acquise sous activation (Eberl 2000, Assarsson 2000, Skold 2000). Les lymphocytes T NK (Jim 1998 ; Morrison 1999) expriment généralement une seule isoforme de chaîne (invariante) du TCR V $\alpha$ 24- JaQ chez l'homme ; V $\alpha$ 14J $\alpha$ 281 chez la souris (Exley 1997 ; Lee 2002). Au même titre que chaque isoforme TCR, les TNK représentent une très faible proportion de T $\alpha\beta$  circulants (moins de 3%).

Les lymphocytes TNK ne reconnaissent qu'une catégorie d'antigène glycolipidique  $\alpha$ Galactosyl-Céramide ( $\alpha$ Gal-Cer -Crowe 2003, Yang 2003) présenté par des molécules MHC non classiques CD1d (Exley 1997, Lee 2002, Gapin 2001). Ils ont une très forte activité cytotoxique et expriment des récepteurs membranaires caractéristiques des lymphocytes NKR impliqués dans la cytotoxicité anti-tumorale (Cui 1997, Godfrey 2000). Ils sont particulièrement nombreux dans le foie (Eberl, Assarson, Skold). Les NK auraient également une activité immuno-régulatrice étant de gros producteurs de cytokines telles que IL-4 et IFN $\gamma$  mais surtout IL-10 et TGF $\beta$  (Jiang 2004)

## **Lymphocytes T reg :**

Si les lymphocytes T CD4 sont associés à la fonction amplificatrice de la réponse immune, il existe une minorité de cellules T qui ont une activité régulatrice, inhibant la réponse lymphocytaire T de façon spécifique. Plusieurs phénotypes ont été décrits. La majorité est de type T CD4+ exprimant le CD25 comme les lymphocytes activés mais de façon plus spécifique le facteur nucléaire FoxP3. Ils sont nommés Treg. Le CD25 n'est que le reflet de l'état d'activation des Treg comme pour les autres cellules et il existe des Treg CD25- (qui expriment le FoxP3) (Jiang 2004).

Les Treg ont une origine thymique (Coutinho 2005).

Des lymphocytes T CD8 (CD25+, CD28-, Foxp3+) peuvent avoir une activité inhibitrice. Les cas décrits (Brimmer 2005) exprimaient un TCR V $\beta$ 5.1. Ils n'expriment pas un phénotype « mature » (CD28-) mais peuvent exprimer son ligand alternatif (CTLA-4) qui aurait une activité inhibitrice (Vlad 2005). Ils peuvent être associés aux muqueuses (IEL) et reconnaître un antigène présenté par une molécule MHC non classique (CD1d) (Brimmer 2005). L'isoforme CD8 n'était pas précisée. Dans le contexte auto-immun, les Treg CD8+ reconnaîtraient des peptides spécifiques du TCR, présentés par des molécules HLA-1b non classiques (HLA-E) qui seraient exprimées sous formes hétéro-dimérique (MHC +  $\beta$ 2-microglobuline que sur les lymphocytes T activés, B et cellules dendritiques (Sarantopoulos 2004). Notons que la molécule HLA-E monomérique est exprimée de façon ubiquitaire et est un ligand naturel du récepteur NKG2A protégeant la cellule d'une cytotoxicité non spécifique par les NK ou T CD8+.

Les NK-T ont une activité Treg par leur production de IL-4, IL-10 et TGF $\beta$ , notamment sur les réponses de type Th1. Leur rôle protecteur de maladies auto-immunes a été montré dans des modèles de diabète (souris NOD) ou encéphalite allergique (revue par Jiang 2004)

Plusieurs mécanismes permettent l'activité régulatrice (Table VIII) : Une trop forte affinité du TCR pour le ligand spécifique induit le suicide (apoptose) de la cellule effectrice. Les Treg exprimeraient le CTLA-4 (CD152 ; molécule inhibitrice, induisant anergie/tolérance) en remplacement du CD28 activateur au cours de la reconnaissance. Une moindre expression ou inhibition de molécules co-activatrices (ex : le CD40L) réduirait également considérablement l'activité auxiliaire du lymphocyte T CD4+ sur la réponse des lymphocytes B (production d'anticorps) ou l'activation de la cellule dendritique (expression de ligand co-activateurs comme le CD80 et CD86). Enfin, les lymphocytes T CD4+ peuvent acquérir la capacité de production de cytokines régulatrices IL-10 et IL-4 (type Tr1) ou TGF $\beta$  (nommées type Th3) fortement inhibitrices de la réponse immunitaire contrairement à IL-2, IFN $\gamma$  (Th1) ou IL-4, IL-5 (Th2) habituellement impliqués dans les réponses efficaces (revue par Jiang 2004).

**Table VIII** : Lymphocytes à activité régulatrices (d'après Jiang et col 2004)

	Cible	MHC	Spécificité	Immunité	mécanisme	fonction
T CD4+CD25+	T, APC	MHC II	non	primaire	contact	auto-immunité allogreffe; pathogènes
T CD4+CD25-	T, B, APC	MHC II	non <sup>(2 ?)</sup>	primaire	cytokines	Auto-immunité
T CD8+	T activés	HLA-E	self peptide "AMAPRTL"LL" TCR peptides <sup>(1)</sup>	secondaire	cytotoxicité	self-tolérance
T CD8+CD28-	APC	MHC Ia	?	primaire	ligands accessoires	auto-immunité
NKT	T activés APC Tumeurs	CD1d	αGalCer	innée	cytokines cytotoxicité	anti-tumeurs régule Th1

(1) I cohen et col 2004 : Treg anti-idiotypes

(2) I cohen et col 2004 : Treg anti-ergotypes

Cohen et col J Clin Invest 2004; 114; 1227-1232.

Jiang H et Chees L. J Clin Invest 2004; 114; 1198-1208..

Les lymphocytes T régulateurs font l'objet d'une littérature très abondante bien que leur caractérisation ne soit pas univoque. Leur rôle dans la limitation de la réponse immunitaire est facile à concevoir. Ils peuvent avoir une activité directe sur les lymphocytes effecteurs, par contact cellulaire ou par production d'IL-10 / TGFβ. Mais ils peuvent également avoir une activité sur les cellules présentatrices d'antigène et induire la production de T CD8 Treg (Vlad 2005) par production de CD40 ou IL-10 au cours de la coopération inter-cellulaire.

Comme pour les immunoglobulines, il est possible d'évoquer une régulation anti-idiotypique. Les lymphocytes Treg anti-idiotypiques (CD4+) reconnaîtraient des motifs spécifiques de TCR, et induiraient des T CD8+ sensibilisés contre des peptides présentés par des molécules MHC non classiques telles que HLA-E (Qa-1 chez la souris). Ils pourraient être de grande utilité pour l'immunothérapie des maladies auto-immunes comme cela a été montré dans l'encéphalopathie auto-immune expérimentale de la souris (Revue par I Cohen 2004).

Cependant, tous les Treg ne sont pas anti-idiotypiques et des Treg restreints à un état fonctionnel (ie ; état d'activation..) ont été décrits (Cohen 2004). Ces Treg anti-ergotypiques (Anti-erg) ont également été démontrés dans le même modèle auto-immun où seuls les lymphocytes activés se montrent pathogènes.

## **Syndromes lymphoprolifératifs :**

La prolifération d'un clone lymphocytaire induite par un antigène ne devrait qu'être transitoire. Des lymphocytes T matures peuvent faire l'objet de prolifération inadaptée et persistante, indépendante d'une stimulation antigénique (Barlett 1999 ; Drénou 2002 ; Kim 2005). Ces syndromes prolifératifs sont assez fréquents et leur incidence semble augmenter. Ils sont généralement accompagnés d'une lymphocytose circulante, parfois d'une neutropénie et de signes généraux (adénopathies, splénomégalie, altération de l'état général..) mais les formes cliniquement frustrées et biologiquement stables sont fréquentes. Le caractère monoclonal est souvent considéré comme synonyme de tumoral. Les syndromes lympho-prolifératifs T ne représentent qu'une petite minorité (moins de 10%) des leucémies lymphoïdes chroniques dont la majorité concerne des lymphocytes B.

Les syndromes prolifératifs à lymphocyte T font l'objet de différentes classifications comme celle de l'OMS selon leurs caractères morphologiques et immuno-phénotypiques. Ils peuvent être divisés en deux formes : leucémies et lymphomes (table IX).

Les leucémies peuvent être regroupées en 4 entités :

- 1 - la leucémie pro-lymphocytaire est rare et d'évolution lente ;
- 2 - la leucémie à grands lymphocytes granuleux (LGL) d'évolution lente également. La lymphocytose est modérée, il peut y avoir une neutropénie ; quelques formes peuvent co-exprimer le CD4 et le CD8 (Sala ).
- 3 - la leucémie de l'adulte à cellules T (ATCL) qui peut avoir une forme clinique de leucémie aiguë et qui est généralement associée aux infections à virus HTLV I.
- 4 - La leucémie agressive à NK (CD3-CD16+CD56+) ne concerne pas les lymphocytes T.

Il existe également une forme aiguë : la leucémie lymphoblastique est rare et concerne des lymphocytes à un stade très immature. Elle est très agressive et ne concerne pas les lymphocytes qui nous intéressent dans la présente étude.

**Table IX :** Classification des syndromes lymphoprolifératifs à Lymphocytes T à partir de la classification de l’OMS

LYMPHO-PROLIFERATION T ou NK	CD2/CD3	TCR	CD4	CD8	CD5	CD7	CD56	CD25	CD30	
<b>Leucémie (dissiminée)</b>										
Leucémie pro lymphocytaire T	+	$\alpha\beta$	+	-	+	-	-		-	25%4+/8+
Leucémie Grands Lymphocytes granuleux (LGL)	+	$\alpha\beta$	-	+	+	+	+		-	
Leucémie à Lymphocytes T de l'adulte (ATCL)	+		+	-	+	-	-	+	-	CD25+
Leucémie agressive à NK	2+/3e+/-		-	-	-	+	+		-	CD95 ; EBV
<b>Formes cutanées</b>										
Sézary / Mycosis Fungoïde	+	$\alpha\beta$	+	-	+	-	-		-	rare $\gamma\delta$
Panniculite sous cutanée	+	25% $\gamma\delta$	-	-	-	-	+si $\gamma\delta$	60%	40%	
Angiocentrique (granulome centro-facial)	+		+	-	+	-	-		-	
L Papule lymphomatoïde					-		-		+/-	
<b>Lymphomes associés aux muqueuses (MALT)</b>										
Intestinal (+/- entéropathie)	+	$\alpha\beta$	-	+/-	-	+	-		parfois	CD103
Hépatosphérique	+	$\gamma\delta$	-	-	-	+	+		-	
Nasal	2+/3e+/-		-	-	-	+	+		-	
Granulomateuse Lymphomatoïde pulmonaire									-	
<b>Lymphomes ganglionnaires</b>										
Angio-immunoblastique	+	$\alpha\beta$	+	-	+	+/-	-		-	
Périphérique non spécifique	+/-	$\alpha\beta$	+	-	+	+/-	-		+/-	EMA+
<b>Lymphomes Anaplastique à grandes cellules</b>										
Ganglionnaire	+/-		+	-	+	-	-	+	+	CD71+, EMA+
Cutané	+		+	-	+	-	-	+	+	CD71+
<b>Lymphomes lymphoblastiques</b>										
Lymphoblastique NK			-	-	+	-	+			

Les Lymphomes à lymphocytes T peuvent avoir différents tropismes tissulaires.

### 1- Lymphomes cutanés

- Le mycosis fungoïde et le syndrome de Sézary (plus évolué avec cellules circulantes) sont les deux aspects d'une maladie cutanée pouvant s'accompagner assez tardivement d'adénopathie.
- Le lymphome T sous-cutané (type panniculite) est observé chez l'adulte. Il est souvent agressif et a un plus grand risque de récurrence que les lymphomes à lymphocytes T.
- Le lymphome angiocentrique est rare en Europe. Il peut atteindre la face (granulome centro-facial).
- Les papules lymphoïdes

### 2 – Lymphomes associés aux muqueuses (MALT):

- Lymphome intestinal à cellules T, peut être agressif et s'accompagner de signes fonctionnels intestinaux voire de perforation. Ils peuvent compliquer une intolérance au gluten avec syndrome chronique de mal absorption. Ils expriment fréquemment le CD103 - molécules d'adressage vers les muqueuses.

- Lymphome T hépatosplénique essentiellement de T  $\gamma\delta$  ; CD56+;
- Lymphome nasal
- Granulomatose lymphomatoïde pulmonaire.

### 3 – Lymphomes ganglionnaires :

- Le lymphome angio-immunoblastiques (AILT) est souvent agressif avec polyadénopathie, altération de l'état général, fièvre nocturne et hypergammaglobulinémie polyclonale.
- Le lymphome T périphérique non spécifique à cellules T comporte des phénotypes souvent inclassables.

4 - Le lymphome anaplasique à grandes cellules (ganglionnaire ou cutané) est formé de cellules très indifférenciées très différentes de celles qui nous intéressent dans cette étude. Elles expriment le CD25 et CD30.

Du point de vue immunophénotypique, toutes les cellules impliquées dans le syndrome prolifératif à forme mature ont en commun l'expression des marqueurs de lymphocytes matures (CD2, CD3). Le CD3 peut ne pas être détecté à la membrane, mais être présent dans le cytoplasme. La plupart exprime le CD7 sauf le lymphome T périphérique et l'ATCL et les formes cutanées. Les leucémies lymphoïdes chroniques pro-lymphocytaires, les lymphomes cutanés, les AILD et les lymphomes à cellules T de l'adulte expriment le CD5. Le CD7 n'est plus exprimé dans les formes cutanées et les formes ganglionnaires non spécifiques (Reinhold, 1997).

La grande majorité des syndromes lympho-prolifératifs T sont de type CD4+, surtout la leucémie à pro-lymphocytes et les lymphomes cutanés et ganglionnaires. Ils peuvent co-exprimer le CD4 et le CD8 et avoir une activité de type Th2 pour certains cas rares des lymphomes périphériques et des lymphomes T cutanés (Echchakir, 2000 ; Airo 1995). Les formes T CD8+ sont plus rares : LLC LGL, lymphome à cellules T périphérique. Les lymphomes associés aux muqueuses sont le plus souvent double négatifs (CD4-CD8-).

Certains peuvent exprimer le CD56 (lymphome angiocentrique, et LGL –Wong 2003 ; Oshimi, 2003-) et une grande partie des LGL peut concerner des cellules CD3- (NK CD3-CD56+).

De même, la plupart des syndromes lympho-prolifératifs T expriment un récepteur TCR  $\alpha\beta$  mature (réarrangement complet). Mais, des syndromes lympho-prolifératifs à lymphocytes T  $\gamma\delta$  peuvent être observés dans les lymphomes T périphériques et les lymphomes T des muqueuses.

Les lymphomes T associés aux muqueuses expriment le CD103 qui est la molécule d'adhérence spécifique du tissu lymphoïde associée aux muqueuses (Belhadj 2003). Les leucémies anaplasiques à grandes cellules expriment le CD30.

Chacun des marqueurs peut être exprimé à des taux inférieurs aux taux observés sur les cellules T matures normales. Dans les syndromes lympho-prolifératifs, les lymphocytes pathologiques peuvent exprimer un phénotype mémoire (CD45 RO, CD27-, CD28-), soit effecteur (CCR7-, CD62L-) soit central (CCR7+, CD62 L+). Ils peuvent également exprimer des marqueurs d'activation (CD25, HLA-DR, CD122). Les syndromes lympho-prolifératifs à lymphocytes T  $\gamma\delta$  expriment le CD3 membranaires à forte intensité.

Les lymphocytes T pathologiques ont donc un phénotype tout à fait normal en immuno-marquage par cytométrie (Bartlett, 1999). Les critères qui permettent d'affirmer un syndrome lympho-prolifératif comportent la lymphocytose (supérieur à 5 Giga/Litre pendant plus de 6 mois) et des aspects cytologiques morphologiques avec un nucléole très apparent. La symptomatologie biologique s'accompagne de signes cliniques tels que l'altération de l'état général, adénopathie, splénomégalie.

Il n'existe pas de cause connue pouvant être à l'origine des syndromes lympho-prolifératifs T en dehors des infections à virus HTLV1 qui sont fréquentes en Asie notamment au Japon, mais également dans les Caraïbes, l'Afrique noire et l'Amérique centrale et qui expliquent la forte incidence des lymphomes T dans ces régions. Une augmentation de risque a été rapportée dans les infections à VIH ou EBV (pouvant être de type T). Cependant, l'apparition d'un syndrome lymphoprolifératif périphérique peut être associée à une stimulation lymphocytaire T chronique comme celle observée dans les infections chroniques, dans les intolérances digestives au gluten avec syndrome chronique de mal absorption (entéropathie - Palacio, 1998 ; Wright 1997-) ou encore la polyarthrite rhumatoïde. Ces syndromes lympho-prolifératifs ne sont pas caractérisés par une spécificité ou une isoforme  $\beta$  particulière.

De façon intéressante, un lymphome (à lymphocyte B) a clairement été associé à l'infection chronique gastrique par *helicobacter pylori*. Le traitement de l'infection pouvant s'accompagner d'une régression du syndrome lymphoprolifératif (Isacson 1999). D'autres lymphomes peuvent être associés avec des virus tels que Hépatite C, Herpes HHV6 ou 8 sans que la relation de causalité ait été clairement établie.

# Résultats

L'analyse quotidienne des lymphocytes périphériques humains par cytométrie en flux selon la méthode que nous avons décrite et en suivant les procédures de standardisation permet d'observer de façon hautement reproductible des sous-populations lymphocytaires T autres que les deux conventionnelles CD4+ et CD8+, en tenant compte de l'intensité de fluorescence de chaque marqueur et de leurs différentes combinaisons.

Nous avons commencé ce travail, en cherchant à standardiser les procédures en accord avec les méthodes internationales et nous avons confronté nos résultats dans le cadre de contrôles de qualités internationaux.

- Nous avons ensuite étudié la signification des variations d'intensité du CD45 pour la reconnaissance des populations leucocytaires.

- Ensuite, nous avons étudié les variations d'intensité de CD3 sur les sous-populations lymphocytaires T.

- La partie essentielle du travail a porté sur l'identification et la caractérisation de populations lymphocytaires T (CD45+ CD3+) qui expriment, de façon non conventionnelle pour des cellules périphériques, le CD4 et le CD8. Nous en avons identifié deux sous-types bien distincts du point de vue phénotypique et probablement fonctionnel. Ces définitions doivent prendre en compte l'intensité d'expression de CD4 et CD8.

- Il reste encore des sous-populations lymphocytaires T que nous n'avons pas complètement caractérisées et que nous citons simplement : les lymphocytes T exprimant le CD8 de façon réduite ou des lymphocytes T exprimant le CD56.