

Diversité des lymphocytes T périphériques conventionnels

Nous avons regardé la diversité des chaînes V β du récepteur TCR par cytométrie en flux en utilisant les anticorps anti-clonotypes disponibles (table XII). On remarque que toutes les chaînes V β ne peuvent pas être étudiées.

Table XII : Matériel utilisé pour phénotypages des TCR V beta des lymphocytes

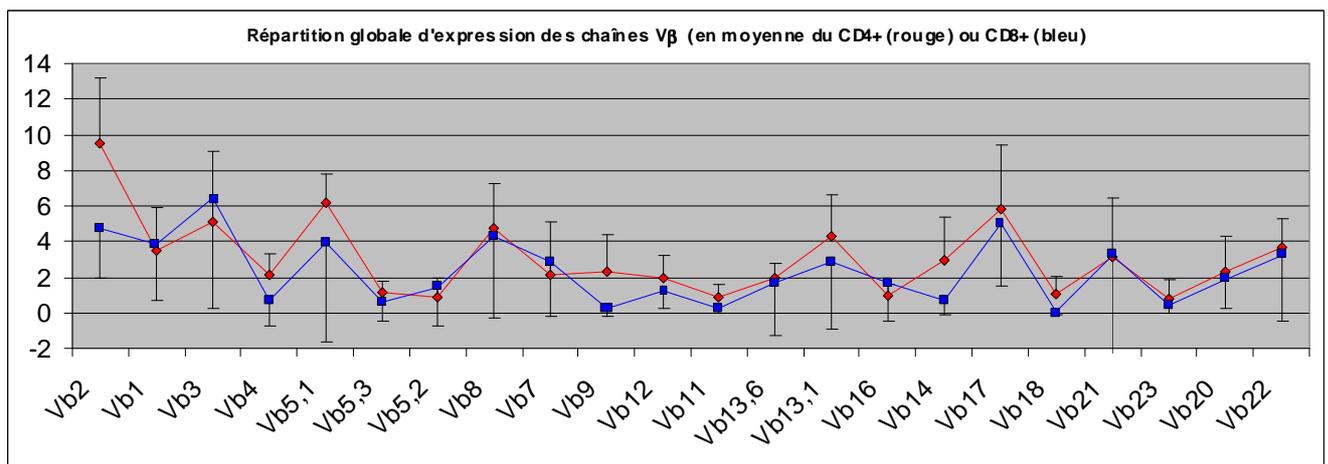
	Fluo	clone	Isotype	Fournisseur
Lymphocytes T CD4/CD8α en combinaisons TCR				
CD8 α	PE-TR	SFCI21thyD3		Beckman-Coulter
CD4	PE-Cy5	MT310		DakoCytomation
Lymphocytes TCR				
V β 1	PE	BL37.2		Beckman-Coulter
V β 2	FITC	MPB2D5		Beckman-Coulter
V β 3	FITC	CH92		Beckman-Coulter
V β 4	PE	WJF24		Beckman-Coulter
V β 5.1	FITC	IMMU157		Beckman-Coulter
V β 5.2	FITC	36213		Beckman-Coulter
V β 5.3	PE	3D11		Beckman-Coulter
V β 7	FITC	ZOE		Beckman-Coulter
V β 8.1 et 8.2	PE	56C5		Beckman-Coulter
V β 9	PE	FIN9		Beckman-Coulter
V β 11	PE	C21		Beckman-Coulter
V β 12	FITC	VER2.32.1		Beckman-Coulter
V β 13.1	PE	IMMU222		Beckman-Coulter
V β 13.6	FITC	JU-74		Beckman-Coulter
V β 14	PE	CAS1.1.3		Beckman-Coulter
V β 16	FITC	TAMAYA 1.2		Beckman-Coulter
V β 17	FITC	E17.5F3		Beckman-Coulter
V β 18	PE	BA62		Beckman-Coulter
V β 20	FITC	ELL 1.4		Beckman-Coulter
V β 21.3	FITC	IG125		Beckman-Coulter
V β 22	PE	IMMU 546		Beckman-Coulter
V β 23	PE	AF23		Beckman-Coulter

Parmi 29 patients testés, la plupart des V β était exprimée par les lymphocytes T CD4+ conventionnels (de 1 à 5%). Quelques chaînes étaient plus fortement exprimées (par exemple V β 2, V β 5.1, V β 17, V β 3

pouvant aller dans quelques cas à des taux de 10 à 40%). Par contre, sur les lymphocytes T CD8+, un grand nombre de chaînes V β n'était pas exprimé.

Même si la répartition des chaînes V β était très variable d'un donneur à l'autre, nous avons vérifié que la répartition de longueur des transcrits du fragment CDR3 des chaînes V β était bien polyclonale sur des lymphocytes T périphériques de donneurs de sang (fig 3.8).

Figure 3.8 : Les populations lymphocytaires T périphériques conventionnelles (CD4+ ou CD8+) sont hautement diverses et expriment tous les clonotypes V β (analyse sur 29 patients). La population T CD8+ est moins diverse que T CD4+.



9 - Lymphocytes T non conventionnels T CD4+ CD8dim.

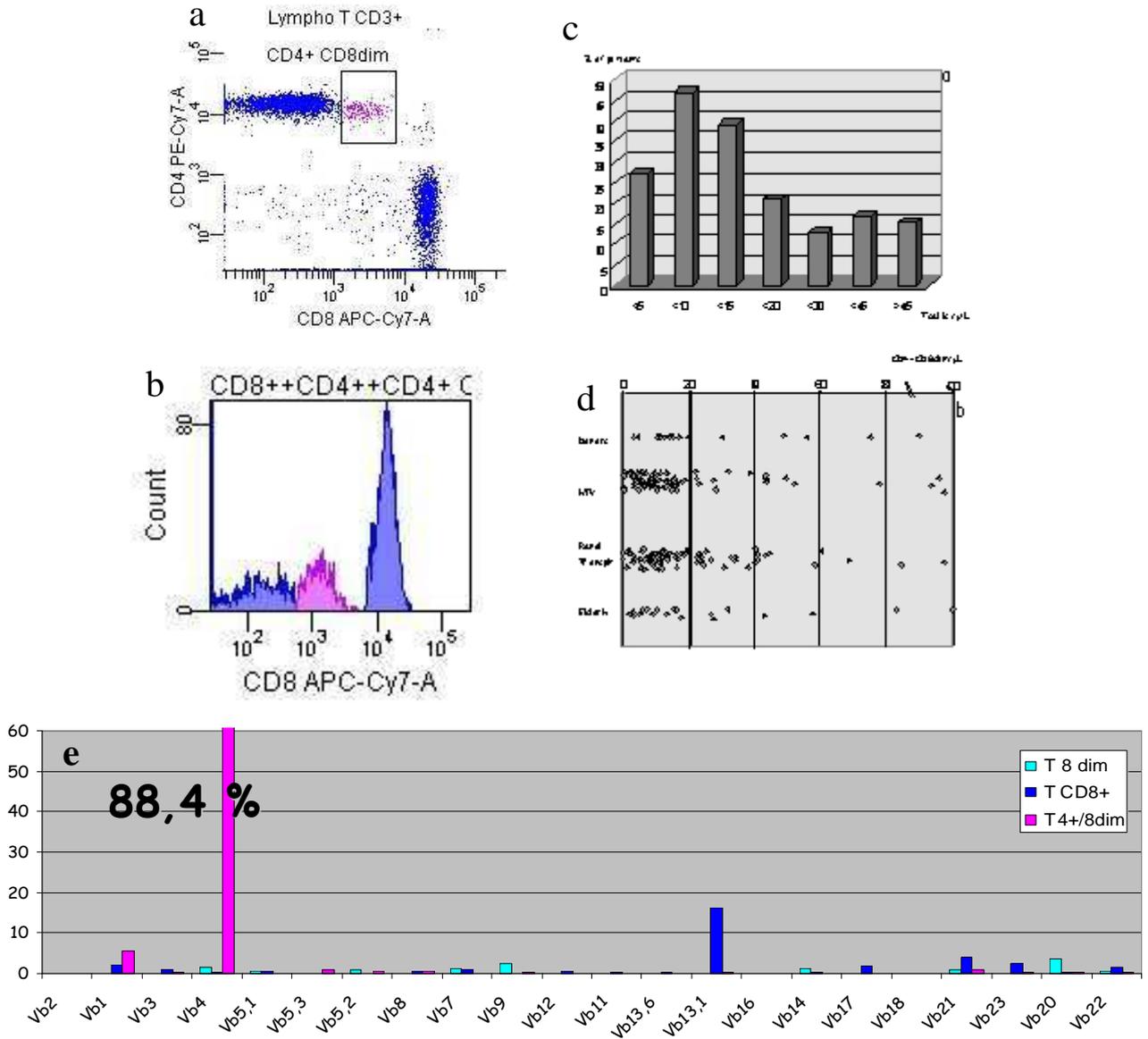
Chez certains patients, nous avons pu remarquer un double pic de distribution d'intensité de fluorescence du CD8 sur les lymphocytes T (fig 3.9). Le pic supplémentaire correspondait à une très nette diminution de l'intensité de fluorescence (médian 5.0 ± 4.1) comparée aux cellules conventionnelles (24.8 ± 5.4). En valeur absolue, cela correspondait à une diminution de la densité de surface des molécules CD8 qui étaient entre 11 000 et 17 000 molécules par cellule sur les lymphocytes à faible CD8 comparés aux lymphocytes conventionnels (96 000 à 128 000 molécules par cellule). Ces lymphocytes T (CD3 positif) CD8dim exprimaient également le CD4, à intensité comparable aux lymphocytes T CD4 et sont subséquemment nommés lymphocytes T CD4+ CD8dim.

La présence d'un groupe apparent de ces lymphocytes T CD4+ CD8dim était clairement observée chez les patients analysés en routine (38/156 patients VIH positifs ou transplantés rénaux). En quantifiant systématiquement la région correspondante, cette population était détectable dans tous les échantillons mais à des taux très variables (de 2 à 155 cellules par μL). La majorité (77%) était regroupée en dessous de 20 cellules par μl et plus difficilement identifiable. Ceci explique que la population ne soit initialement observée que chez certains patients (23%) mais sa définition était arbitraire, dépendante de la représentativité relative aux autres populations.

Nous avons testé des donneurs de sang en bonne santé. La distribution était à nouveau très hétérogène, la majorité des échantillons étant groupée au dessous de 20 cellules T CD4+ CD8dim/ μL . La population non conventionnelle apparaissait clairement chez 8/31 donneurs testés et correspondait à des valeurs $> 20 \text{ cell}/\mu\text{L}$. Nous avons donc choisi de définir cette valeur objective comme seuil «d'élévation» de la population T CD4+ CD8dim.

La fréquence observée chez les donneurs de sang (25.8%) était comparable à celle des patients (VIH+ : 19.2%) et transplantés rénaux (29.5%). Nous avons également analysé une cohorte de 21 patients âgés convalescents de plus de 70 ans : 7 patients (33.3%) avaient plus de 20 cellules par μl CD4+ CD8dim. La répartition des fréquences était significativement différente ($p = 0.037$, test du χ^2). Cependant, nous n'avons pas trouvé de corrélation avec l'âge.

Figure 3.9 : Population lymphocytaire T non conventionnelle CD4+CD8dim. La distribution de CD8 est trimodale (b). Le nombre de cellules est groupé au-dessous de 20 cells/ μ l sauf pour quelques patients et contrôles sains (c, d). La population lymphocytaire peut être limitée à un seul clonotype V β (e).



Nous avons cherché à caractériser ces lymphocytes T non conventionnels. Ces cellules n'exprimaient pas de marqueur précoce d'activation lymphocytaire (CD69). Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'expression de CD25 sur dix cas testés. Tous ces lymphocytes exprimaient l'isoforme $\alpha\beta$ du TCR. Par contre, la molécule CD8 était uniquement composée de la chaîne alpha (probablement isoforme homodimérique CD8aa).

La concentration des lymphocytes T CD4+ CD8dim dans le sang n'était pas corrélée à la concentration des lymphocytes T CD4+ ni des lymphocytes T CD8+. De même, nous n'avons pas trouvé de corrélation avec le taux de lymphocytes T $\gamma\delta$.

Dans certains cas, la population T CD4+ CD8dim semblait très homogène en terme de densité d'expression des marqueurs CD4 et CD8. Nous avons recherché si cela correspondait à une restriction clonale. Nous avons observé une très forte restriction de distribution des chaînes V β , les chaînes V β 2, V β 3, V β 13.1, V β 5.2 et V β 1 étant les plus fréquemment exprimées. Surtout, chez 26 et 29 patients, nous avons pu observer la prédominance d'une chaîne V β (de 18 à 94% des lymphocytes TCD4+CD8dim), suggérant que cette population soit composée d'un contingent monoclonal. Les chaînes les plus fréquemment observées étaient V β 8, V β 2, V β 13.1 ou V β 21. Dans les trois autres cas, nous avons observé un "trou phénotypique" avec une somme des nombres de chaînes V β observées inférieure à 20% suggérant qu'une des chaînes non testées puisse être largement prédominante.

Discussion :

Une telle population a déjà été occasionnellement rapportée dans la littérature (Ortolani, 1993 ; Warrington, 2001 ; Prince, 1994). Elle a également déjà été rapportée chez l'animal (Zuckermann, 1999). Nous avons démontré que cette population avait un phénotype (CD8aa) comme les lymphocytes intra-épithéliaux observés chez le rat (Imhof, 2000 ; Yamada, 1999 ; Helgeland, 1999). La consultation des antécédents de quelques dossiers nous permet de dire que cette symptomatologie reste généralement présente plusieurs années.

La signification immunologique de ces cellules dans le sang périphérique n'est pas encore clairement élucidée. Dans les conditions expérimentales, ces lymphocytes ont un profil fonctionnel de type TH1 (producteurs d'interleukine IL-2 et IFN γ) et peuvent avoir une activité cytotoxique (Yamada 1999, Richard 1992, Sala 1996, Suni 2001, Pittet 2000). Ils ont pu être impliqués dans une réponse anti-tumorale (Bacot 1991). Pour l'instant, nous n'avons pas retrouvé d'association avec un processus tumoral ou un état d'immuno-dépression.

Du point de vue ontogénique, ces lymphocytes ont un phénotype mature. Il est peu probable qu'ils correspondent à des thymocytes car l'activité thymique chez l'adulte est négligeable en dehors de conditions drastiques et les thymocytes expriment un phénotype immature (CD45RA, CD62L). De plus les doubles positifs sont largement minoritaires et expriment le CD4 et CD8 à intensités égales.

Inversement, il semblerait que des lymphocytes T CD4⁺ authentiques puissent dans certaines conditions, ré-exprimer en périphérie, de faibles taux de CD8 (Souni, 2001 ; Luhtala, 1997).

Il a été récemment proposé que la population CD4⁺CD8^{dim} pouvait être une transition entre un lymphocyte T initialement CD4⁺ qui se convertit en d'authentiques CD4⁻CD8⁺ dans le thymus (Bosselut 2003), un phénomène "trans-isotypique" en quelque sorte. Est-ce que ce phénomène est transposable dans les lymphocytes T périphériques ? Leur phénotype acquis CD8^{aa} suggère qu'ils aient été sollicités au niveau des muqueuses ou de la peau.

La raison pour laquelle ces lymphocytes ont eu besoin de l'expression de CD8, particulièrement l'isoforme $\alpha\alpha$ n'est pas claire. Ont-ils acquis une nouvelle capacité de reconnaissance d'antigène, peut-être non peptidique présenté par des molécules MHC non classiques ? Cette nouvelle spécificité est-elle due à une réaction croisée du récepteur TCR ou bien à l'expression d'un second récepteur d'expression différente ?

Nous avons montré que la distribution de ces lymphocytes non conventionnels était très restreinte. Les données expérimentales montrent qu'une expansion lymphocytaire réactionnelle est rapidement suivie d'une contraction, à moins d'une persistance active de l'antigène. Est-ce que la persistance de ce contingent lymphocytaire reflète une stimulation chronique par un antigène ? Il pourrait ainsi être le stigmate d'une sollicitation prolongée par exemple au niveau de l'appareil digestif (intestin, foie) et bronchique. Il est possible que la restriction à un clonotype puisse être due à une stimulation prolongée non pas par un peptide très spécifique mais un super-antigène commun à un isotype V β . Cependant, cette éventualité est peu probable ici car elle induirait plutôt une activation lymphocytaire (CD25⁺, CD69⁺) avec induction d'apoptose et perte du clonotype correspondant.

Un mécanisme alternatif pourrait être une autonomisation de la prolifération de ces lymphocytes comme elle est observée dans les leucémies lymphoïdes chroniques. Cette maladie peut en effet concerner des lymphocytes T dont le phénotype est alors mature, CD4 et/ou CD8, proche de celui que nous décrivons ici. Ce contingent représente-t-il alors une forme précoce ou lente d'un syndrome lympho-prolifératif ? Se pose alors le problème de la zone frontière entre les deux états et d'éventuels critères pronostiques.

Un phénotypage complémentaire (CD5, CD7, CD103, CD27, CD28...) pourrait permettre de mieux comparer les caractères phénotypiques de ces populations avec les phénotypes lymphomateux ou leucémiques. Une étude de suivi longitudinal de cohorte à long terme devrait permettre de répondre à cette question et éventuellement de déterminer les facteurs prédictifs.

Par analogie au syndrome de dysglobulinémie monoclonale de signification indéterminée, nous émettons l'hypothèse qu'une partie au moins de ces fractions lymphocytaires puisse éventuellement évoluer vers un syndrome lympho-prolifératif à plus ou moins long terme. Nous avons proposé de nommer cette entité "clonopathie oligoclonale de signification indéterminée" (OCUS). Nous avons choisi le terme oligoclonal car la prépondérance d'une chaîne V β ne suffit pas pour affirmer la vraie monoclonalité que nous n'avons pas pu pour l'instant confirmer par étude du transcrit. Le terme clonopathie a été également discuté car aucune signification pathologique clinique n'a encore été associée à ce phénomène. Il nous paraît donc, dans l'état actuel de nos connaissances, souhaitable de suivre l'évolution de cette entité chez les patients.

10 - Lymphocytes T non conventionnels T CD4dim CD8+.

Au cours d'une étude équivalente à la précédente, nous avons cherché à caractériser un phénotype non conventionnel observé sur des échantillons, plus rares, qui contenaient un contingent lymphocytaire T (CD3 positif) exprimant le CD4 à faible intensité.

Cette éventualité doit évidemment être différenciée de la présence de monocytes qui expriment du CD4 à faible intensité, mais n'expriment pas de CD3. Cette distinction est devenue facile avec les marquages multiples (CD3, CD4 et CD8) mais pouvait prêter à confusion dans les marquages simples ou doubles.

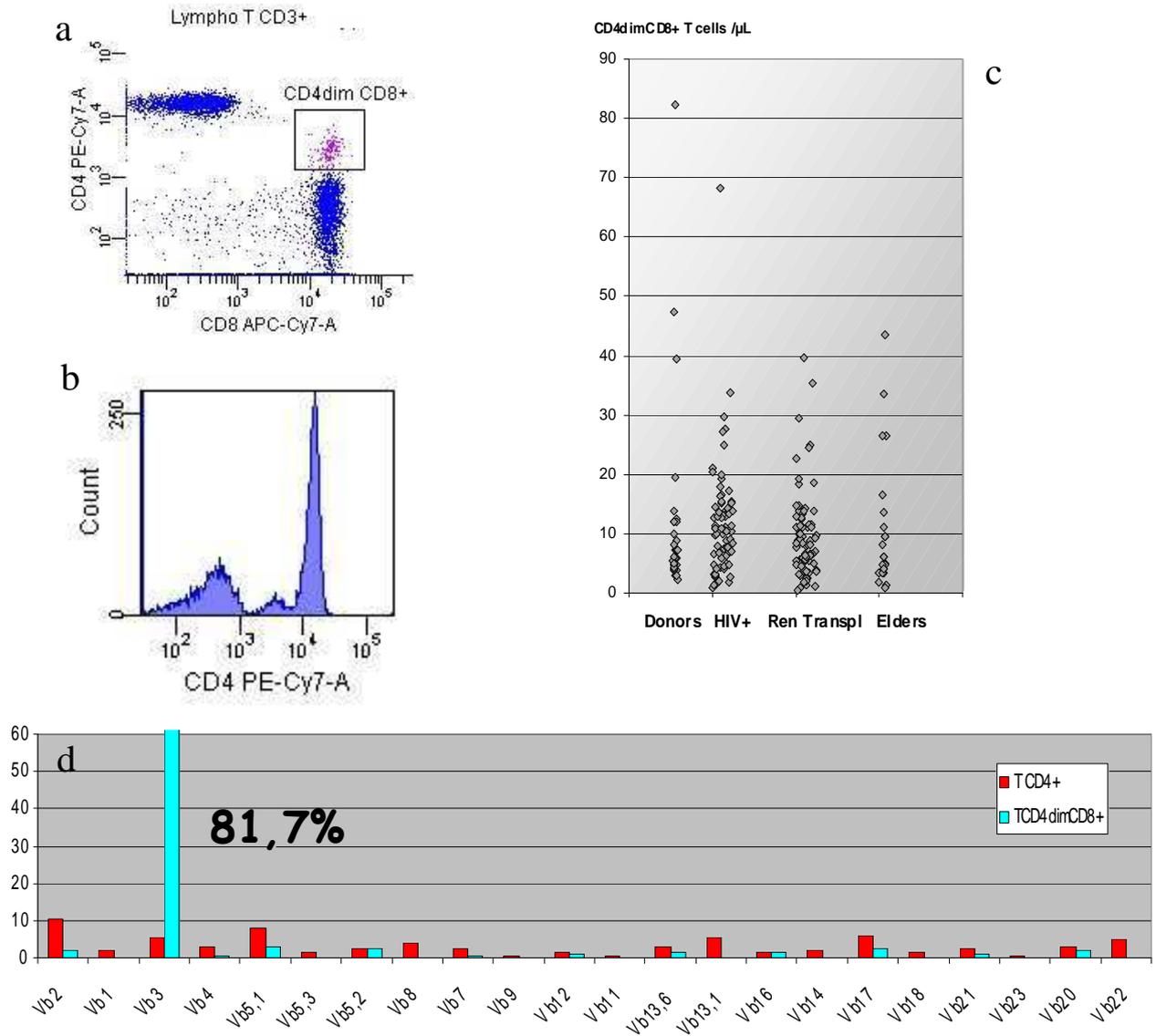
La diminution d'expression du CD4 est très significative puisqu'elle équivaut à une moyenne de fluorescence de 10.1 ± 3.5 comparée à 24.8 ± 5.4 pour les lymphocytes T CD4 conventionnels. Ces lymphocytes T CD4dim expriment toujours le CD8, à taux normal. Le CD8 était principalement de phénotype hétéro-dimérique (CD8 $\alpha\beta$). Nous les avons donc baptisés lymphocytes T CD4dimCD8+.

La présence de cette population est beaucoup moins fréquente que la population précédemment étudiée (CD4+ CD8dim). L'analyse systématique de la zone correspondante, sur une cohorte de 31 donneurs de sang, révélait que la population CD8+ CD4dim représentait en moyenne 0.6 % des lymphocytes T avec une large distribution entre échantillons (de 0.1 à 6.1 %). La majorité des échantillons avait moins de 20 cellules CD8+ CD4dim par microlitre (fig 3.10). Cependant, 3 échantillons (9.7 %) avaient une valeur supérieure à 20 cell/mL.

En analysant la même série de 78 patients VIH positifs, nous avons trouvé 8 cas (11 %) avec élévation de CD8+ CD4dim alors que nous n'avons trouvé que 6 cas (7.9 %) chez les 78 patients greffés rénaux. La fréquence était légèrement augmentée chez les patients de plus de 70 ans (4 sur 21 soit 19%).

Comme pour les T CD4+ CD8dim, ces lymphocytes T CD8+ CD4dim ne présentaient pas de signes d'activation (CD69 ; CD25).

Figure 3.10 : Population lymphocytaire T non conventionnelle CD4dimCD8+. La distribution de CD4 est trimodale (b). Le nombre de cellules est groupé au-dessous de 20 cells/ μ l sauf pour quelques patients et contrôles sains (c). La population lymphocytaire peut être limitée à un seul clonotype V β (d).



Nous avons analysé la diversité du répertoire TCR de ces populations. La distribution globale des clonotypes des T CD8⁺ CD4^{dim} était proche de celle des lymphocytes T CD8⁺ conventionnels suggérant qu'ils en étaient dérivés après acquisition de l'expression de faible taux de CD4. Cependant, ce phénomène n'a pas été démontré expérimentalement.

De plus, parmi 13 patients testés qui présentaient une population CD4^{dim} CD8⁺ nette et homogène, tous présentaient une prépondérance (40 et 94 % de la population) d'un seul clonotype. Ce clonotype n'était pas surexprimé dans les deux autres populations lymphocytaires conventionnelles (CD4⁺ ou CD8⁺). Les clonotypes prépondérants étaient généralement différents d'un patient à l'autre.

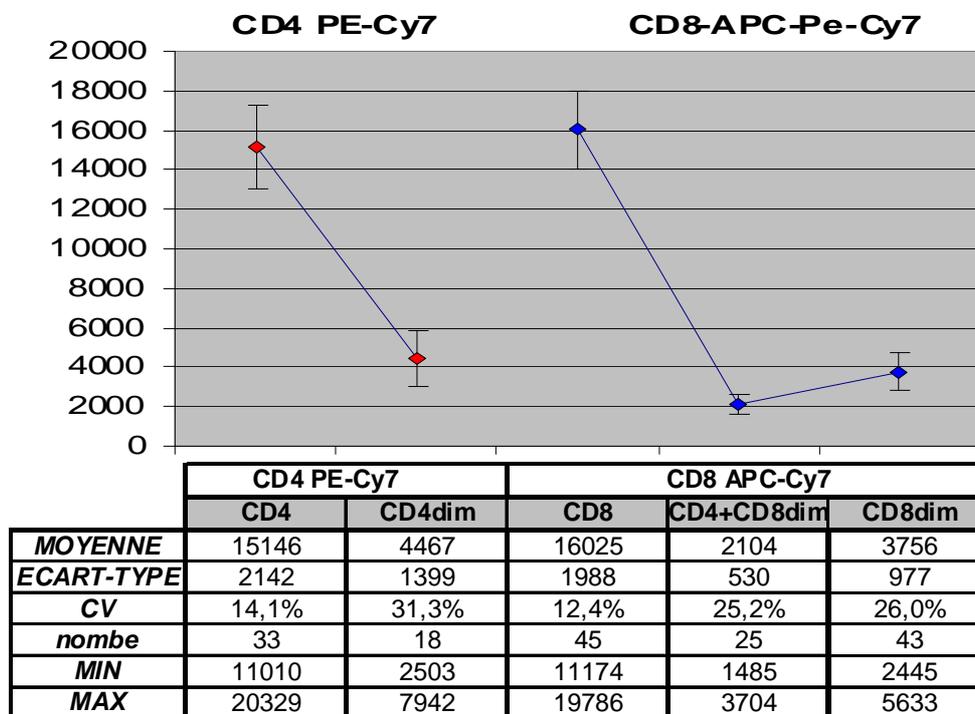
Ces populations lymphocytaires généralement minoritaires ont une distribution très variable d'un patient à l'autre et peuvent être fortement élevées chez certains patients suggérant une signification sémiologique. Le problème est identique au cas précédent. S'agit-il d'une prolifération réactionnelle à une infection systémique persistante ? Une association avec une infection virale chronique a été rapportée (Suni). Mais il est également possible que quelques uns de ces cas aient un (faible) potentiel lympho-prolifératif par leur caractère monoclonal et persistant, et le concept OCUS peut s'appliquer également à cette entité. Une étude de suivi longitudinale de ces patients dans des conditions très standardisées est nécessaire pour en évaluer le risque progressif.

11 – Expression différentielle de CD4/CD8 sur les lymphocytes T :

Nous avons analysé la densité d'expression des molécules CD4 et CD8. La fluorescence était très homogène entre échantillons pour un même type de marque (système FacsCanto, décrit dans la méthodologie). Il faut remarquer que les niveaux de fluorescence entre CD4 et CD8 ne sont pas ici comparables, s'agissant de différents fluorochromes et différents réglages de photomultiplicateurs.

On remarque (fig. 3.11) que chaque marqueur (CD4 et CD8) peut exprimer dans certains échantillons un pic d'intensité intermédiaire dont la valeur relative est $\frac{1}{4}$ pour le CD4 et $\frac{1}{8}$ pour le CD8. Nous nous sommes particulièrement intéressés à rechercher la signification de ces populations lymphocytaires qui expriment très partiellement des molécules essentielles pour leur fonction.

Figure 3.11 : Expression diminuée de CD4 (sur CD4+/CD4dim) et de CD8 (sur CD8+ et CD8dim) comparée aux niveaux d'expression conventionnelle.

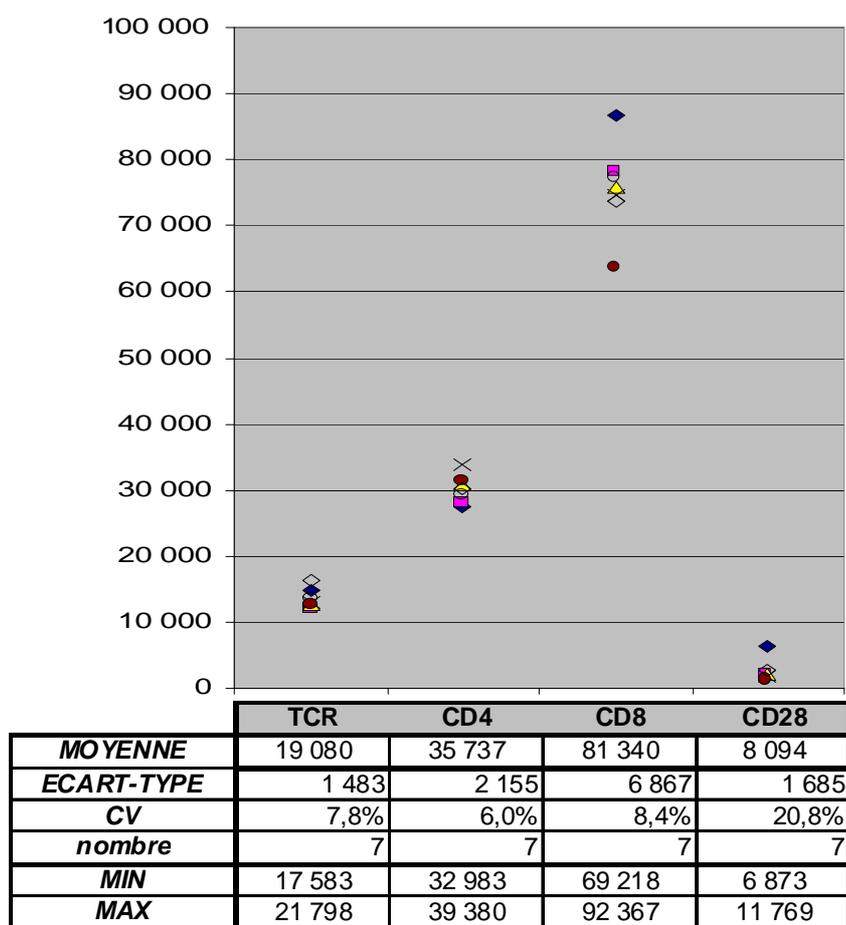


12 – Densités de CD4/CD8 sur les lymphocytes T :

Par méthode de quantification indirecte avec calibrage (Quifikit™), nous avons pu évaluer les densités de surface des molécules considérées (fig. 3.12).

Nous observons des taux comparables à la littérature avec de grandes différences entre les protéines analysées.

Figure 3.12 : Niveau d'expression des récepteurs membranaires en valeur absolue analysé par Quifikit sur 7 donneurs sains.



13 – Autres sous-populations Lymphocytaires T non conventionnelles :

L'analyse des dot-plots met en évidence d'autres phénotypes qui restent à explorer.

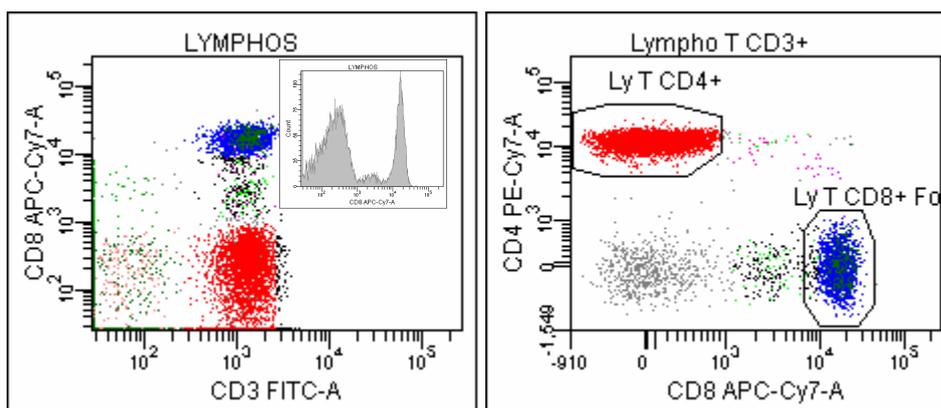
Lymphocytes T CD8dim :

Il existe d'authentiques lymphocytes T CD8 qui n'expriment pas de CD4 et expriment le CD8 en intensité faible (fig 3.13). Le CD8 est de la forme homodimérique ($CD8\alpha\alpha$) et correspond en fait à une partie des lymphocytes T $CD8\alpha\alpha$ dont la majorité exprime le $CD8\alpha$ à intensité habituelle.

Nos résultats préliminaires montrent que ces lymphocytes sont de phénotypes matures, non activés et peuvent être restreints en clonotype. Ils peuvent exprimer le CD56.

Leur signification n'est pas encore connue. Il ne s'agit pas d'effet d'activation qui s'accompagne d'une baisse d'expression membranaire de CD4/CD8 mais également de CD3 (d'expression normale ici) et de façon très transitoire (48-72 heures).

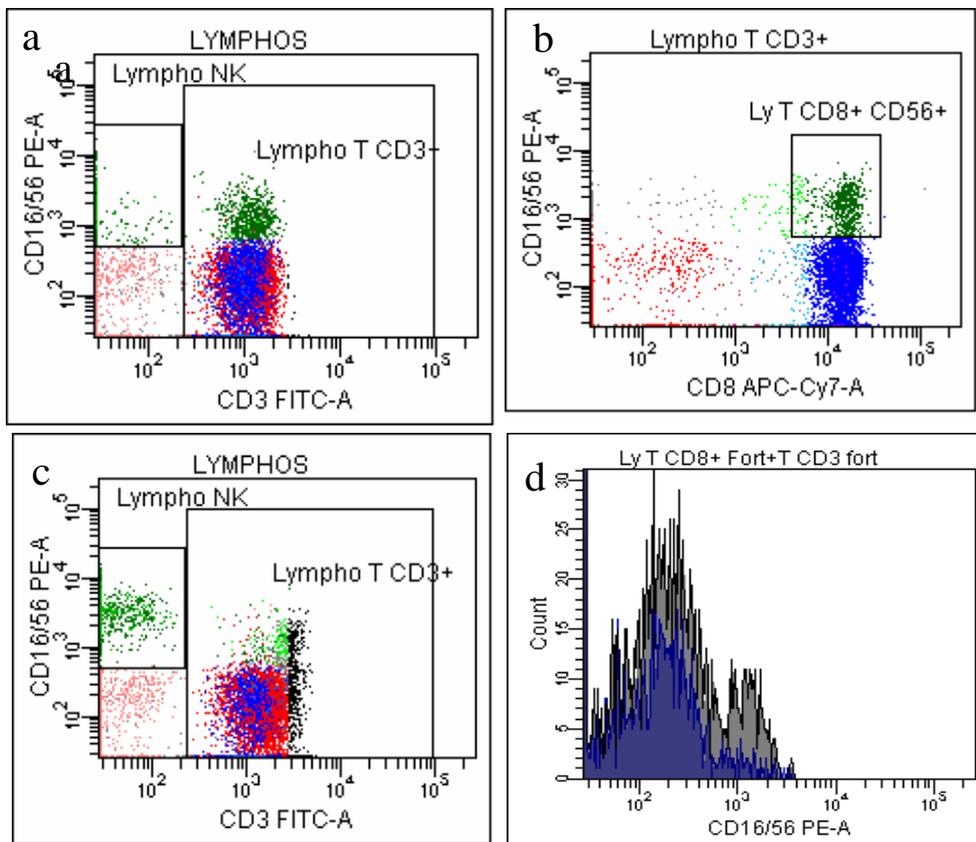
Figure 3.13 : Population lymphocytaire T CD8dim ($CD4^+$).



Lymphocytes T CD8CD56+ :

Une fraction (très variable entre patients) de lymphocytes T exprime le CD56. Ils sont toujours de type T CD8+ (fig 3.14). Ces lymphocytes peuvent avoir une signification de cytotoxicité. Ils sont facilement identifiables et quantifiables en cytométrie 5/6 couleurs et devraient faire l'objet d'études cliniques pour en définir la signification clinique.

Figure 3.14 : Population lymphocytaire T CD56+ (a) souvent CD8 (b). Ils peuvent être également CD3 fort ; T $\gamma\delta$ (c) ou CD8dim (b,d).



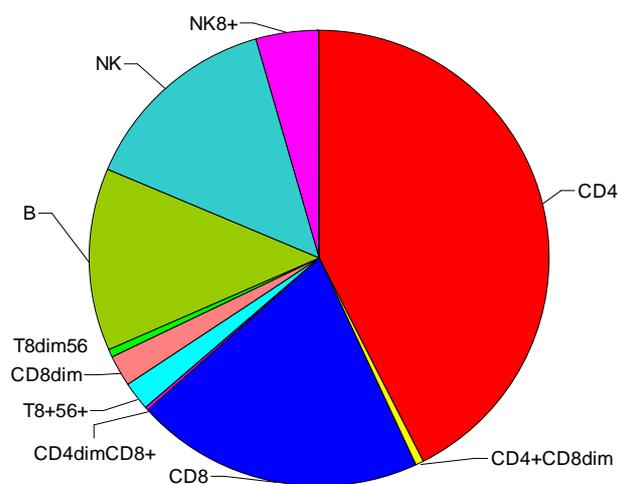
14 – Répartition habituelle des sous populations lymphocytaires T :

Nous avons pu établir des valeurs de référence des différentes populations décrites dans ce travail sur un échantillon de donneurs de sang (en bonne santé).

Nous confirmons la prépondérance des lymphocytes T CD4+ dans le sang périphérique (fig 3.15). Nous remarquons également que les moyennes de populations non conventionnelles (T CD4+CD8dim, T CD4dimCD8+) sont inférieures à 20 cells / μ L ($15^{\pm 20}$ et $11^{\pm 14}$ cell/ μ l en moyenne ± 1 écart-type). Certains sujets (sains) ont des valeurs élevées : maximum 152 et 87 respectivement).

Le nombre de lymphocytes T CD8dim est plus important ($53^{\pm 30}$ Cell/ μ L). De même, le nombre de lymphocytes T CD8+ CD56+ est relativement important ($51^{\pm 46}$ Cell/ μ L) surtout pour les lymphocytes T CD8dim ($17^{\pm 15}$ Cell/ μ L). Les extrêmes sont également très importants.

Figure 3.15 : Nombre (cell/ μ L) de lymphocytes périphériques chez 97 donneurs de sang.



numéro	CD3/ μ L	CD4	CD4+CD8dim	CD8	CD4dimCD8+	T8+56+	CD8dim	T8dim56	B	NK	NK8+
moyenne	1826	1120	15	529	11	51	53	17	342	372	120
ecart type	570	343	20	235	14	46	30	15	171	185	65
min	815	467	1	147	1	4	11	2	101	96	19
max	4426	2436	152	1634	87	248	180	93	1186	1112	310