

MEMOIRE

DU DIPLÔME D'ETUDES SPECIALISEES

De Biologie Médicale

Soutenu le 12 octobre 2016

par M^{elle} Marie ROELENS

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

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

TITRE

**DE LA VERSATILITÉ DES CELLULES DE SÉZARY
CIRCULANTES ET RÉSIDENTES**

JURY

Président : Pr Salima HACEIN-BEY

Membres : Dr Hélène MOINS-TEISSERENC

Pr. Antoine TOUBERT

Pr. Armand BENSUSSAN

Pr Martine BAGOT

RESUME

Le syndrome de Sézary est un lymphome T cutané leucémisé. Le marqueur CD158k/KIR3DL2, récemment validé par mon équipe pour identifier les cellules de Sézary (CS), nous a permis de suivre immunologiquement ces patients. Contrairement à la littérature, nous rapportons une hétérogénéité intra- et inter-individuelle, avec l'ensemble des profils de maturation possibles pour les CS circulantes, alors que celles de la peau sont de phénotypes plus matures, exclusivement mémoires. Des populations de description récente ont été observées, de type TSCM (« T stem cell memory ») dans le sang, et T résidente mémoire dans la peau. Nous retrouvons une expression différentielle entre les deux sites, de récepteurs de chimiokines et d'interleukines connus pour être impliqués dans la maladie. L'exploration de cette diversité phénotypique, et des interactions entre les compartiments sanguins et cutanés, pourrait permettre de définir la cible cellulaire la plus pertinente pour les immunothérapies du futur.

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord vivement le Docteur Hélène Moins-Teisserenc pour m'avoir proposé ce sujet, à la suite de mon Master 2, proche de mes attentes. Je la remercie d'avoir accepté la direction de mon travail de thèse, et m'avoir suivie avec attention et enthousiasme depuis bientôt deux ans.

Je souhaite également remercier Madame le Professeur Salima Hacein-Bey d'avoir accepté de présider ma soutenance.

Je remercie le Professeur Antoine Toubert, le Professeur Martine Bagot et le Professeur Armand Bensussan pour avoir suivi mon projet tout au long de son avancement, et accepté de faire partie des membres du jury. Je remercie en particulier le Pr Antoine Toubert pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, et le Pr Martine Bagot pour avoir permis la réalisation de ce projet. Ce travail est le fruit d'une collaboration étroite entre les acteurs hospitaliers et les unités de recherche, et je me souviendrai de nos moments d'échange.

Un grand merci à toute l'équipe INSERM pour son accueil chaleureux, sa sympathie et sa bonne humeur. Merci notamment à Laurence Homyrda pour m'avoir assistée techniquement et régulièrement soutenue, et à Joana Felix pour m'avoir initiée à la cytométrie en flux et avoir répondu à mes nombreuses questions. Merci    Emmanuel Clave pour ses conseils avisés. Merci    Corinne, Alain, Ghislaine et Isabelle pour leur écoute et leur aide technique.

Merci à mes co-internes, en particulier les deux Anne-Sophie, Rathana, Clara, Solmaz, Sarah, avec qui j'ai partagé ces quatre années riches en expériences, et avec certains, tant échangé. Merci aussi aux nombreuses équipes hospitalières dans lesquelles je suis passée, qui ont su me transmettre leur passion et m'initier à la recherche. Je garderai de bons souvenirs de mon internat.

Je remercie mon ami depuis les bancs de la faculté, Jean-Meidi, qui a su répondre à mes doutes et m'encourager à aller jusqu'au bout de mes projets.

Merci    Léonard pour son assistance informatique, et surtout pour avoir été à mes côtés en toutes circonstances, sa constance durant plus de deux années vécues à distance.

Merci enfin à ma famille,    mes parents, pour leur soutien depuis toujours, et leur intérêt pour mes études.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

TABLEAUX, FIGURES, ANNEXES

ABBREVIATIONS

PARTIE A : INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE	1
A.1. Point sur les connaissances.....	1
A.1.1 Présentation de la maladie de Sézary	1
A.1.2. Traitements.....	2
A.1.3. Critères diagnostiques.....	3
A.1.4. Classification clinique et pronostic de la maladie	6
A.1.5. Diagnostic différentiel.....	8
A.1.6. Apport de la biologie : caractérisation des CS à l'aide de la molécule KIR3DL2 / CD158k ...	9
A.1.7. Éléments de physiopathologie et caractéristiques immunologiques du syndrome de Sézary	12
A.2. Problématiques du projet	18
A.2.1 Observations récentes de mon équipe	18
A.2.2. Objectif du travail de thèse.....	20
PARTIE B : MATERIELS ET METHODES.....	21
B.1 Cohortes de patients	21
B.2. Donneurs sains	22
B.3. Constitution de la banque de PBMC congelées (<i>pour cohorte 2</i>)	22
B.4. Extraction cellulaire à partir d'une biopsie cutanée (<i>pour cohorte 3</i>)	23
B.5. Numération et immunophénotypages lymphocytaires.....	23
B.6. Statistiques.....	26
PARTIE C : RÉSULTATS.....	27
C.1. Détection des cellules de Sézary	27
C.2. Répartition des populations Sézary naïves / mémoires.....	30
C.2.1. Étude des CS circulantes (<i>cohortes 1 et 2</i>)	30
C.2.2. Étude des CS cutanées (<i>cohorte 3</i>).....	36
C.2.3. Cas particulier de patient complexe.....	38
C.2.4. Suivi longitudinal des CS circulantes	40
C.2.5. Populations Sézary résidentes mémoires	44
C.3. Expression par les CS des récepteurs de recrutement vers la peau	46

C.4. Expression des marqueurs d'activation et des récepteurs de cytokines	48
PARTIE D : DISCUSSION.....	51
PARTIE E : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	56
ANNEXES.....	58
BIBLIOGRAPHIE	66

TABLEAUX, FIGURES, ANNEXES

Tableaux

Tableau 1 Stadification clinique et pronostic des lymphomes T cutanés de type MF/SS	7
Tableau 2 Classification des CTCL par l'OMS et l'ISCL	8
Tableau 3 Caractéristiques des trois cohortes de patients.....	22
Tableau 4 Plan de marquage sur sang réalisé en routine au laboratoire d'Immunologie cellulaire (<i>cohorte 1</i>).....	23
Tableau 5 Plan de marquage sur PBMC congelées/décongelées (<i>cohorte 2</i>).	23
Tableau 6 Plan de marquage sur sang et peau (<i>cohorte 3</i>).	24
Tableau 7 Répartition des populations CS naïves / mémoires sur 3 échantillons cutanés sains	37
Tableau 8 Répartition phénotypique des sous-populations de CS circulantes de MOTM35	39
Tableau 9 Récepteurs de chimiokines / sélectines étudiés et leurs ligands	46

Figures

Figure 1 Aspects cliniques évocateurs de la maladie de Sézary	1
Figure 2 Observation d'un frottis sanguin montrant 5 cellules de Sézary	3
Figure 3 Immunohistochimie d'une lésion cutanée de SS.	6
Figure 4 Structure homodimérique de KIR3DL2/CD158k, et modèle connu de transduction du signal par les lymphocytes NK	10
Figure 5 Comparaison de la numération des CS par CMF, cytomorphologie et analyse du répertoire TCR, sur une cohorte de 32 patients Sézary.....	11
Figure 6 Distribution des familles du TCRV β au sein des lymphocytes triés CD4 ⁺ CD158k ⁺ et résiduels CD4 ⁺ CD158k ^{neg}	12
Figure 7 Structure de la peau et types de cellules immunitaires présents.....	15
Figure 8 Schéma montrant quelques molécules et voies de signalisation dérégulées dans la cellule de Sézary	17
Figure 9 Représentation schématique de la maturation périphérique lymphocytaire T, et marqueurs associés.....	19
Figure 10 Exemple de patient présentant une association de CS centrales mémoires et naïves.....	19
Figure 11 Mise en évidence en CMF des différents types naïfs / mémoires de lymphocytes T CD4 ⁺ chez un sujet sain	20
Figure 12 Phénomène de chevauchement de spectres d'émission et principe de compensation à partir de tubes monomarqués	25
Figure 13 Schéma de la structure des récepteurs aux interleukines 2, 7 et 15	26
Figure 14 Stratégie de fenêtrage des CS sanguines au laboratoire d'Immunologie de routine (<i>cohorte 1</i>).....	27
Figure 15 Corrélation entre les fenêtrages des CS T CD158k ⁺ réalisés sur sang frais et PBMC congelées.....	28

Figure 16 Exemple de vérification de la correspondance entre les cellules CD158k ⁺ et le marquage avec l'anticorps anti-Vβ22, correspondant au clone malin identifié dans le sang et la peau.....	29
Figure 17 Stratégie de fenêtrage des CS dans la peau.....	29
Figure 18 Phénotypes naïfs/mémoires des CS CD4 ⁺ CD158k ⁺ circulantes chez les patients de l' « étude sang frais » (<i>cohorte 1</i>).	30
Figure 19 Phénotypes naïfs/mémoires des CS circulantes chez les patients de l'étude « PBMC congelées » (<i>cohorte 2</i>).	31
Figure 20 Exemples de patients présentant quasi exclusivement des CS de phénotype naïf, ou TSCM dans le sang.	32
Figure 21 Exemples de patient présentant des CS sanguines quasi exclusivement de phénotype TCM, ou une association TCM-naïves.....	33
Figure 22 Phénotypes naïfs / mémoires des CS et des T CD4 ⁺ CD158k ⁻ résiduels chez les patients de l' « étude PBMC congelées » (<i>cohorte 2</i>).	35
Figure 23 Répartition des populations CS naïves / mémoires dans le sang et la peau des patients biopsiés (<i>cohorte 3</i>).	37
Figure 24 Exemple représentatif de marquage dans la peau (MOTM35).....	37
Figure 26 Evolution du phénotype des CS circulantes chez MOTM35	41
Figure 27 Evolution du phénotype des CS circulantes chez ULMG41.....	43
Figure 28 Expression des marqueurs de TRM.....	44
Figure 29 Exemple d'expression des marqueurs de TRM par les lymphocytes T CD4 ⁺ dans la peau saine	45
Figure 30 Expression des récepteurs des molécules d'écotaxie vers la peau.....	47
Figure 31 Expression des marqueurs d'activation et récepteurs d'interleukines.....	50
Figure 32 Schéma récapitulatif des états de maturation lymphocytaires T correspondant aux phénotypes des CS du sang et de la peau.	54

Annexes

Annexe 1 Protocoles techniques.....	58
Annexe 2 Cohorte 1 « étude Sang frais » - Numération des CS circulantes, pourcentages de cellules CD26 ⁻ et CD7 ⁻ parmi les lymphocytes T CD158k ⁻ , et sous-populations lymphocytaires T CD158k ⁺ et T CD4 ⁺ CD158k ⁻ en fonction de leur état de maturation naïf / mémoire	58
Annexe 3 Cohorte 2 « étude PBMC congelées » - Caractéristiques cliniques des patients.....	58
Annexe 4 Cohorte 2 « étude PBMC congelées » - Pourcentages des sous-populations lymphocytaires Sézary et T CD4 ⁺ CD158k ⁻ en fonction de leur état de maturation naïf / mémoire	58
Annexe 5 Cohorte 3 « étude Sang/peau » - Pourcentages des sous-populations lymphocytaires Sézary dans le sang et la peau en fonction de leur état de maturation naïf / mémoire.....	58
Annexe 6 Cohorte 1 « étude Sang frais » - Suivi longitudinal des CS circulantes chez 21 patients issus de la cohorte 1.....	58
Annexe 7 - Sujets sains - Valeurs de référence établies chez 29 donneurs sains sur PBMC congelées, et valeurs obtenues sur des échantillons cutanés frais de 3 donneurs sains.	58

ABREVIATIONS

CMF : Cytométrie en flux

CS : Cellule de Sézary

CTCL : Lymphomes T cutanés (Cutaneous T-Cell Lymphomas)

EFS : Etablissement Français du Sang

HLA : *Human Leukocyte Antigen*

ISCL : *International Society for Cutaneous Lymphomas*

KIR : Famille de récepteurs *Killer Cell Ig-like Receptor*

LT : Lymphocytes T

MF : Mycosis fongoïde

PBMC : Cellules périphériques sanguines lympho-monocytaires (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

SS : Syndrome de Sézary

TCM : T centrale mémoire

TCR : *T Cell Receptor*, récepteur T à l'antigène

TEM : T effectrice mémoire

TEMRA : T effectrice mémoire terminale

TN : T naïve

TRM : *Tissue-Resident Memory* (cellules T résidentes tissulaires à long terme)

TSCM : *T stem cell memory*

TTM : T transitionnelle mémoire

PARTIE A : INTRODUCTION ET PROBLEMATIQUE

A.1. Point sur les connaissances

A.1.1 Présentation de la maladie de Sézary

- Clinique :

Le syndrome de Sézary (SS) a été pour la première fois décrit par Albert Sézary en 1938. C'est une forme rare, disséminée et agressive de lymphome T cutané (CTCL pour *cutaneous T cell-lymphoma*), groupe hétérogène de maladies, essentiellement représenté par le mycosis fongoïde (MF), d'évolution généralement indolente, et le SS (Willemze et al., 2005).

La présentation clinique de la maladie de Sézary regroupe typiquement la triade suivante : une érythrodermie exfoliante généralisée, un prurit et des adénopathies périphériques disséminées. La présence de plaques érythémateuses fixes, particulièrement aux zones protégées de la lumière est évocatrice. Elle peut s'associer à une alopecie, un ectropion (éversion du bord libre de la paupière), une kératodermie palmoplantaire, et une onychodystrophie. De plus le SS est une forme leucémique de CTCL, caractérisée par la présence de lymphocytes atypiques clonaux appelés cellules de Sézary (CS), circulant dans le sang et également présents au niveau des lésions cutanées.



Figure 1 Aspects cliniques évocateurs de la maladie de Sézary : érythrodermie squameuse sèche, onychodystrophie et kératodermie palmaire (tiré de dermis.net)

○ **Epidémiologie :**

Ce cancer est une maladie rare, avec une incidence annuelle de 1/10 000 000, et représente 3% des lymphomes T cutanés. Il affecte plus souvent les hommes (Sex-ratio 2/1), au cours de la cinquième décennie de vie (données Orphanet).

A.1.2. Traitements

En première intention, un traitement par photophérèse extracorporelle (PEC) peut être combiné à de faibles doses de méthotrexate, de bexarotène et d'interféron alpha. La PEC est un traitement immunomodulateur de mécanisme mal élucidé, qui consiste en la collecte des leucocytes circulants, leur exposition à un agent photoactif (tel le 8-méthoxypsoralène) puis à un rayonnement UV-A, avant leur réinjection. Dans les cas avancés ou non répondeurs, une chimiothérapie à base de doxorubicine liposomale, gemcitabine ou alemtuzumab, voire une polychimiothérapie (CHOP) peut être considérée. Le traitement n'est que palliatif, avec un effet souvent transitoire. Des traitements locaux peuvent être associés, tels que la radiothérapie, la PUVAthérapie (photochimiothérapie), la chimiothérapie (chlorméthine, carmustine) et/ou la corticothérapie sur les lésions cutanées. En cas de récurrence, le traitement peut avoir recours à une électrothérapie cutanée totale et exceptionnellement une intensification par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (Devata et Wilcox, 2016).

Récemment de nouvelles thérapies ont été introduites :

- Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) : ils modulent l'expression génique et entraînent *in vitro* l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose de certaines lignées tumorales. Deux drogues ont été introduites pour le traitement des lymphomes T, la romidepsine (Istodax®) et le vorinostat (Zolinza®).
- Les immunothérapies ciblées :
 - Brentuximab Vedotin (Adcetris®) : anticorps monoclonal anti-CD30 conjugué à une drogue anti-microtubule, le monométhyl auristatin E, et actif sur les CTCL CD30⁺, les CS pouvant surexprimer cet antigène (Duvic et al., 2015).
 - Mogamulizumab (Poteligeo®) : IgG1 monoclonale humanisée anti-CCR4, avec une région Fc défucosylée, qui a montré des résultats encourageants dans le CTCL réfractaire/en rechute (Remer et al., 2014).

A.1.3. Critères diagnostiques

Les nouvelles techniques d'immunophénotypage et de biologie moléculaire ont fait évoluer les critères diagnostiques, initialement basés sur la morphologie des CS et l'étude des populations T CD4⁺ et CD8⁺ sanguines et de leur ratio. Ces critères, plus ou moins discriminants selon les cohortes de patients étudiées, ne montrent cependant jamais une spécificité totale, notamment pour ce qui est de différencier le SS du MF (Willemze et al., 1983).

○ Cytomorphologie :

Les CS sont des lymphocytes de taille variable, avec un noyau caractéristique, irrégulier et incisé en coup d'angle, d'aspect cérébriforme, décrits en 1961 par Taswell et Winkelmann en 1961. La chromatine est assez dense, et le rapport nucléo-cytoplasmique élevé. L'analyse du frottis sanguin reste cependant dépendante de l'expertise de son examinateur.

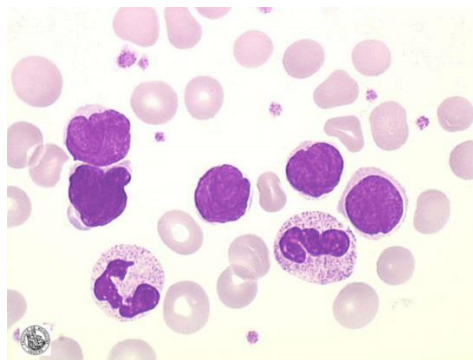


Figure 2 Observation d'un frottis sanguin (X100) coloré au May-Grünwald-Giemsa montrant 5 cellules de Sézary. (Site internet du laboratoire d'Hématologie cellulaire du CHU d'Angers : Hematocell.fr)

○ Etude de la clonalité :

La mise en évidence de la clonalité des CS est basée sur l'étude du TCR (*T Cell Receptor*) avec analyse du répertoire T, par Southern blot ou PCR. L'analyse des réarrangements de la chaîne γ à l'échelle génomique est la plus usitée avec séparation des produits PCR (PCR-DGGE pour *denaturing gradient gel electrophoresis*, ou GeneScan) (Wood et al., 1994). En cas de prolifération clonale, toutes les cellules issues d'un clone T porteront le même TCR, donc le même réarrangement génique entre les segments V, D, et J. Ainsi l'existence d'un clone T identique majoritaire dans la peau et le sang est un argument fort pour le diagnostic.

Il peut également être repéré en cytométrie en flux (CMF) parmi la population lymphocytaire à l'aide d'un anticorps anti-V β (dirigé contre le domaine variable de la chaîne β du TCR) spécifique, mais l'identification de clones par cette technique pose le problème du défaut d'anticorps disponibles couvrant tout le répertoire VDJ β , et parfois de clones V β non reconnus par l'anticorps spécifique commercialisé, possiblement à cause de variations épitopiques au sein d'une même famille V β (Langerak et al., 2001).

○ **Immunophénotypage :**

Les CS ont été décrites comme des lymphocytes T (LT) matures CD2⁺CD3⁺CD5⁺, habituellement CD4⁺CD8^{neg} avec un TCR de type $\alpha\beta$. Chez les patients atteints, on a souvent une augmentation de la population CD4⁺ avec un rapport CD4/CD8 supérieur à 10 (Bernengo et al., 2001).

Les CS se caractérisent également par certaines aberrations phénotypiques, en particulier la perte d'expression de marqueurs pan-lymphocytaires :

– Perte d'expression du CD7 :

Cette anomalie est communément rapportée. CD7 est une protéine membre de la famille des immunoglobulines, et joue notamment un rôle de molécule de costimulation du TCR. Toutefois, dans l'étude de Dummer et al. (1999), des cellules tumorales ont été identifiées aussi bien dans les T CD4⁺CD7⁺ que les T CD4⁺CD7^{neg}, ce qui suggère que cette population n'est pas le reflet du clone circulant.

– Perte d'expression du CD26 :

CD26 est une protéase membranaire (dipeptidyl-peptidase IV), impliquée dans l'activation cellulaire et exprimée par les T mémoires et helpers. L'association du phénotype CD4⁺CD26^{neg} avec la population clonale T dominante semble être beaucoup plus forte que la perte d'expression de CD7 (Steinhoff et al., 2009).

– Perte d'expression d'autres marqueurs pan-lymphocytaires :

Plus rarement, les CS peuvent avoir un phénotype CD8⁺CD4^{neg} ou CD8⁺CD4⁺ et/ou présenter une perte d'expression des molécules CD2, CD3, et/ou CD5, partielle ou totale (Jones et al., 2001).

○ **Critères biologiques diagnostiques :**

Les critères diagnostiques internationaux admis par la Société Internationale des Lymphomes Cutanés (ISCL), depuis 2002, pour le SS correspondent au stade d'atteinte sanguine B2 (leucémique – voir *tableau 1*) et sont les suivants (Olsen et al., 2007) :

- La mise en évidence d'un clone cellulaire T sanguin détecté par analyse du TCR, en Southern Blot ou PCR (ce clone pouvant être retrouvé dans le sang, la peau et les ganglions), ou la mise en évidence d'un clone T tumoral présentant des anomalies chromosomiques (non spécifiques),
et soit
- Un chiffre absolu d'au moins 1000 CS par mm³ de sang,
ou
- Un rapport lymphocytaire T CD4⁺/T CD8⁺ supérieur à 10 avec augmentation du nombre de lymphocytes circulants, et/ou une perte d'expression aberrante des marqueurs pan-cellulaires T en CMF (≥40% de T CD4⁺ CD7^{neg} ou ≥30% de T CD4⁺ CD26^{neg}).

○ **Anatomo-pathologie :**

Des biopsies cutanées doivent être prélevées au diagnostic, pour étude histologique et recherche de clonalité T par PCR. Dans le SS, on observe un infiltrat monomorphe de lymphocytes atypiques au noyau incisuré, en bandes sous-épidermique (margination lymphocytaire le long de la jonction dermo-épidermique), ou en localisation périvasculaire. Cet infiltrat se caractérise par une perte d'expression de CD7 et un ratio CD4/CD8 augmenté. L'épidermotropisme, mis en évidence par la présence de lymphocytes atypiques intraépidermiques ou micro-abcès de Pautrier, est très évocateur du SS mais peut être absent (Klemke et al., 2015).

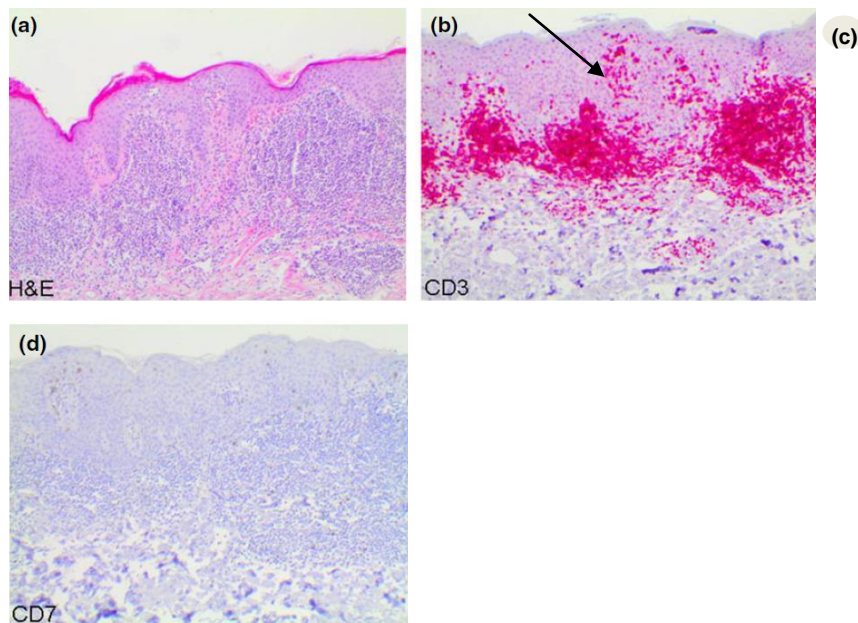


Figure 3 Immunohistochimie d'une lésion cutanée de SS, a) Coloration à l'hématoxyline-éosine montrant un dense infiltrat dermique à épidermotropisme marqué, b) Marquage CD3 mettant en évidence le fort épidermotropisme lymphocytaire, avec début de formation d'abcès de Pautrier (flèche), c) Marquage CD7 montrant la perte d'expression par les cellules malignes (d'après Klemke et al.).

A.1.4. Classification clinique et pronostic de la maladie

Pour les CTCL de type MF/SS, le stade TNMB (pour « Tumor », « Node », « Metastasis » et « Blood ») est défini par la clinique, la biologie, les éventuels examens d'imagerie et biopsies ganglionnaires. Le tableau 1 regroupe ces éléments. La classification clinique des lymphomes T cutanés repose ainsi sur les atteintes cutanées, ganglionnaires, viscérales et sanguines. La maladie est considérée comme à un stade avancé à partir du stade IIB (Scarisbrick et al., 2015). La survie globale à 5 ans est indiquée en fonction du stade, la principale cause de décès étant infectieuse, liée à l'état d'immunodépression.

Stades TNMB		Classification révisée ISCL / EORTC ¹				
T : atteinte cutanée (Tumor)						
T1	Macules érythémateuses (<i>patches</i>), papules ou plaques < 10 % de la surface corporelle (T1a : macules seules ; T1b : plaques ± macules)					
T2	Macules, papules ou plaques > 10 % de la surface corporelle : (T2a : macules seules ; T2b : plaques ± macules)					
T3	Une ou plusieurs tumeurs (définie par une taille > à 1 cm)					
T4	Érythrodermie confluent sur > 80 % de la surface corporelle					
N : statut ganglionnaire (Node)						
N0	Pas d'adénopathie périphérique palpable					
N1	Adénopathie périphérique palpable, histologie anormale mais pas ou peu de lymphocytes anormaux (Dutch grade 1 ou NCI LN0-2) (N1a : pas de clone ; N1b : clone +)					
N2	Adénopathie périphérique palpable, histologie montrant des agrégats de CS avec persistance de l'architecture normale (Dutch grade 2 ou NCI LN3) (N2a : pas de clone ; N2b : clone +)					
N3	Adénopathie périphérique palpable, histologie montrant la perte partielle ou totale de l'architecture ganglionnaire avec infiltration diffuse par des CS (Dutch grade 3-4 ou NCI LN4), clone ±					
Nx	Adénopathie périphérique palpable, pas d'histologie de confirmation					
M : statut viscéral (Metastasis)						
M0	Pas d'atteinte viscérale					
M1	Atteinte viscérale (à documenter histologiquement)					
B : atteinte sanguine (Blood)						
B0	< 5 % de CS circulantes (B0a : pas de clone ; B0b : clone +)					
B1	> 5 % de CS circulantes mais < 1G/L (B1a : pas de clone ; B1b : clone +)					
B2	Charge tumorale sanguine importante : clone T majoritaire et CS > 1G/L ou critères immunophénotypiques de l'ISCL					
Soit la stadification¹:		T	N	M	B	Survie globale à 5 ans^{2,3}
IA	Plaques infiltrées ou non < 10 % surface corporelle	1	0	0	0-1	94%
IB	Plaques infiltrées ou non > 10 % surface corporelle	2	0	0	0-1	84%
IIA	Plaques infiltrées ou non avec adénopathie périphérique palpable, histologiquement non spécifique	1-2	1-2	0	0-1	78%
IIB	Tumeurs	3	0-2	0	0-1	57%
IIIA	Érythrodermie sans envahissement sanguin	4	0-2	0	0	60%
IIIB	Érythrodermie avec envahissement sanguin limité	4	0-2	0	1	56%
IVA1	Envahissement sanguin important sans adénopathie spécifique	1-4	0-2	0	2	48%
IVA2	Adénopathie spécifique	1-4	3	0	0-2	33%
IVB	Atteinte viscérale	1-4	0-3	1	0-2	39%

Tableau 1 Stadification clinique et pronostic des lymphomes T cutanés de type MF/SS (1. Olsen et al., 2007 ; 2. Agar et al., 2010 ; 3. Scarisbrick et al., 2015) (EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer ; ISCL : International society for cutaneous lymphoma)..

A.1.5. Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel du SS se fera avec :

- Le mycosis fongoïde (MF) : Le SS présente de nombreux points communs avec le MF, qui se caractérise également par une prolifération monoclonale de LT atypiques dans la peau et les ganglions, mais sans envahissement sanguin ou limité (critères B0-B1 de l'ISCL). Le MF représente 50% des lymphomes cutanés mais est d'évolution plus indolente et de meilleur pronostic que le SS. Cliniquement, l'aspect est souvent comparable au stade de plaques ou d'érythrodermie, ce qui rend le diagnostic différentiel difficile. De plus, jusqu'à 20% des MF peuvent évoluer vers une érythrodermie généralisée avec un envahissement ganglionnaire et même jusqu'au SS. La frontière MF/SS reste floue et est encore aujourd'hui un point de débat : ces pathologies sont-elles distinctes, d'origines différentes, ou bien le SS peut-il résulter d'une évolution sanguine agressive du MF comme le suggère Hurabielle et al. (2016) ?
- Les autres formes de lymphomes T cutanés primitifs, regroupés dans le tableau 2 ;
- Les autres causes d'érythrodermie non tumorales : médicamenteuses, infectieuses, inflammatoires, dermatologiques (psoriasis, eczéma, dermatite atopique, pityriasis rubra pilaire...), ou bien idiopathiques.

Lymphomes T indolents

Mycosis fongoïde

Variants de MF : MF folliculotrope, Lymphome pagétoïde, MF granulomateux

Lymphome anaplasique à grandes cellules CD30+

Papulose lymphomatoïde

Lymphome sous-cutané à type de panniculite

Lymphome T pléomorphe à petites et moyennes cellules

Lymphomes T agressifs

Syndrome de Sézary

Lymphome T/NK de type nasal

Lymphome primitif cutané T CD8+

Lymphome primitif cutané T $\gamma\delta$

Lymphome cutané primitif à cellules T périphériques

Tableau 2 Classification des CTCL par l'OMS et l'ISCL (Willemze et al., 2005)

Les critères clinico-biologiques de l'ISCL ne permettent pas de caractériser de façon universelle la maladie de Sézary et le diagnostic peut être difficile, surtout lorsque l'envahissement tumoral sanguin est faible ou ne répond pas aux critères immunophénotypiques classiques. Jusqu'à récemment, une définition des CS à l'aide de la perte des marqueurs phénotypiques cités ci-dessus ne permettait pas de les quantifier de manière univoque. Dans ce contexte, le diagnostic biologique ainsi que le suivi de routine reposait essentiellement sur l'expertise du cytologiste lors de l'examen des frottis sanguins. Par ailleurs, l'étude de la clonalité en biologie moléculaire ne permet pas de préjuger du caractère tumoral ou réactionnel du clone, une restriction du répertoire TCR avec des profils oligoclonaux et l'émergence de clones réactionnels étant courant dans le SS (Ortonne et al., 2006a), ou simplement en contextes bénins.

Depuis une quinzaine d'années, un nouveau marqueur de CS en CMF a été identifié, et récemment son utilisation a été validée à l'hôpital Saint-Louis pour l'identification en routine des CS.

A.1.6. Apport de la biologie : caractérisation des CS à l'aide de la molécule KIR3DL2 / CD158k

La collaboration à l'hôpital Saint-Louis entre l'unité INSERM U1160 (Institut Universitaire d'Hématologie), le département de Dermatologie et l'unité INSERM U976 (Institut de la peau), a permis de valider la molécule KIR3DL2, aussi dénommée CD158k, en tant que marqueur pour l'identification des CS (anticorps monoclonal anti-KIR3DL2/CD158k développé par la firme Innate Pharma à Marseille).

Cette molécule est membre de la famille des « Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors » (KIRs), récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK (*Natural Killer*), reconnaissant les molécules HLA (*Human Leukocyte Antigen*) de classe I (Pende et al., 1996). L'absence d'interaction des KIRs avec le HLA du soi déclenche l'activité cytotoxique NK. Elle est également retrouvée à la surface d'une population très minoritaire de lymphocytes T CD8⁺ circulants. Sa fonction à la surface des CS est encore mal connue.

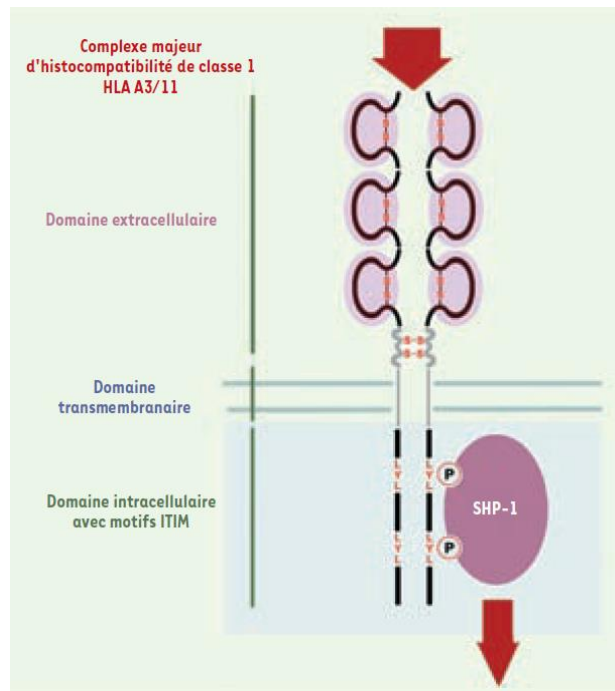


Figure 4 Structure homodimérique de KIR3DL2/CD158k, et modèle connu de transduction du signal par les lymphocytes NK (tiré de Ortonne et al., 2006b). Après engagement avec les molécules HLA de classe I, les résidus tyrosine portés par les motifs ITIM de la portion intracellulaire du récepteur sont phosphorylés et recrutent la phosphatase cytosolique SHP-1.

Au début des années 2000, parmi la famille des KIRs, seule la molécule KIR3DL2/CD158k a été retrouvée sur des lignées cellulaires de SS et sur les lymphocytes T sanguins et cutanés de patients à l'aide de divers anticorps monoclonaux, en CMF, en immunohistochimie, et les transcrits ont été séquencés (Bagot et al., 2001). Leur amplification en rt-PCR a ainsi permis de distinguer les SS des cas d'érythrodermie inflammatoire (Ortonne et al., 2008).

En 2010, Bouaziz et al. ont trouvé que pour évaluer la masse tumorale sanguine dans le SS, la valeur absolue du nombre de cellules $CD3^+CD158k^+$ est plus sensible que la celle du nombre de CS détectées en cytomorphologie. Dans l'étude publiée dans le « Journal of Investigative Dermatology », l'utilisation de l'anticorps anti-CD158k a été optimisée, afin d'identifier et de caractériser les CS en CMF (Moins-Teisserenc et al., 2015). La fiabilité de ce marqueur pour le diagnostic de SS dans une étude prospective incluant 64 patients ayant un lymphome T cutané ou une érythrodermie inflammatoire a été démontrée. Son utilisation au diagnostic permet de pallier le manque de sensibilité et de spécificité de l'absence de protéines membranaires (CD7, CD26), la difficulté de l'identification cytomorphologique des CS, et résout le problème de non disponibilité de certains anti- $V\beta$. Il permettrait de distinguer les clones tumoraux et réactionnels éventuels (Ortonne et al., 2006a). La corrélation entre ces différents marqueurs diagnostiques biologiques est exposée sur la

figure 5. La clonalité des cellules T CD158k⁺ a été de plus montrée par étude en technique Immunoscope du répertoire lymphocytaire T en biologie moléculaire, sur cellules triées (fig 6).

L'anti-CD158k est à présent employé en routine dans le Laboratoire d'Immunologie et d'Histocompatibilité (Hôpital Saint-Louis) pour identifier et suivre les patients SS. Par sa facilité d'utilisation en CMF, il va permettre de caractériser plus finement ces CS.

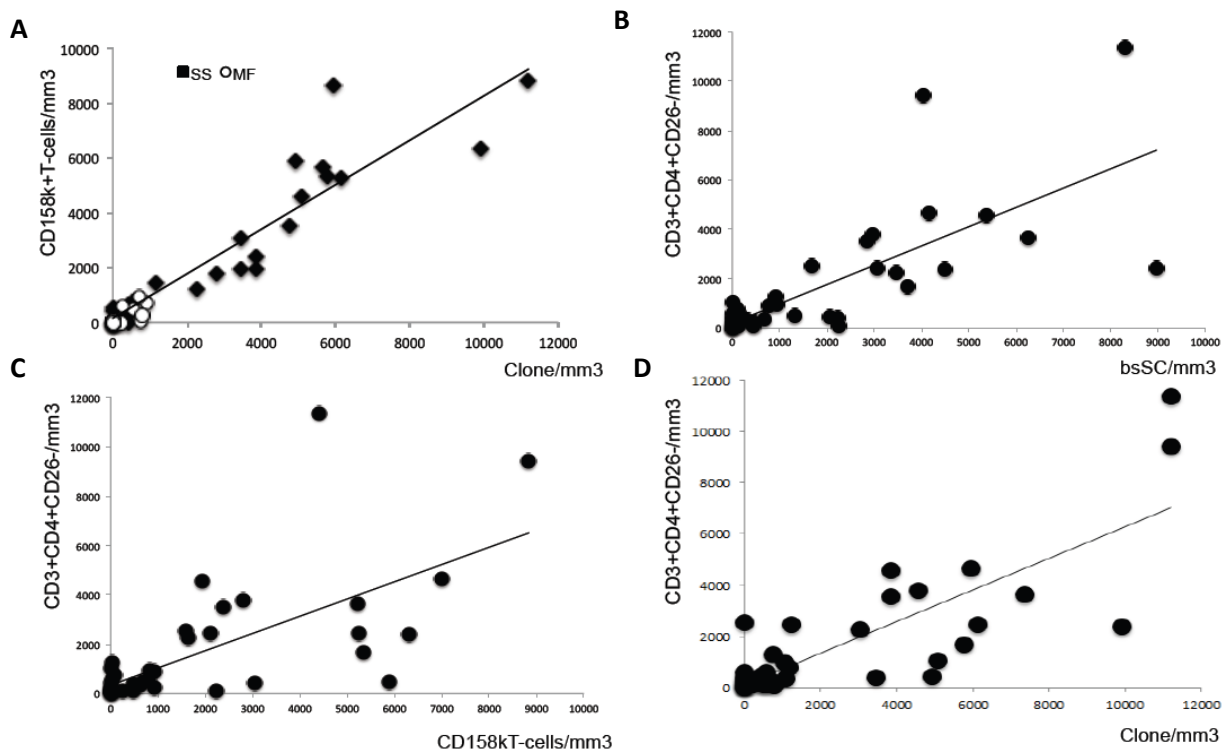


Figure 5 Comparaison de la numération des CS par CMF, cytomorphologie et analyse du répertoire TCR (tiré de Moins-Teisserenc et al., 2015), sur une cohorte de 32 patients Sézary.

A. Corrélation du chiffre de cellules T CD158k⁺ avec la valeur absolue du clone calculée à partir du chiffre de lymphocytes T CD3⁺ totaux et du pourcentage du clone dominant retrouvée par analyse du répertoire du TCR en biologie moléculaire. Corrélation entre le chiffre de cellules CD3+CD4+CD26- en cytométrie en flux et **(B.)** le compte des CS identifiées sur le frottis sanguin (bsSC), **(C.)** le compte de cellules T CD158k+, et **(D.)** la valeur absolue du clone identifié en biologie moléculaire.

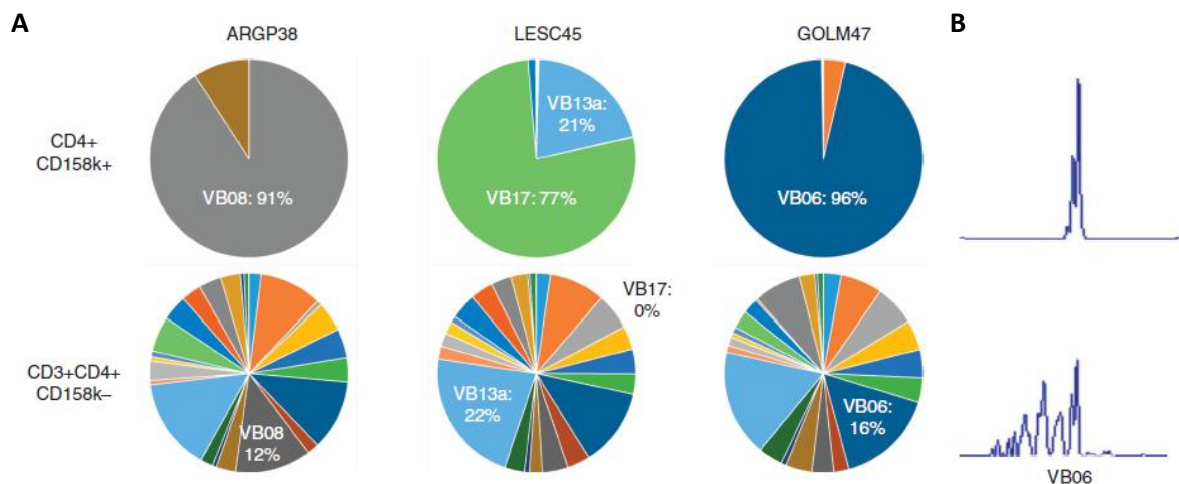


Figure 6 A. Distribution des familles du TCRV β au sein des lymphocytes triés CD4+CD158k+ et résiduels CD4+CD158k- chez trois patients (ARGP38, LESC45 et GOLM47). **B.** L'analyse de la taille des régions CDR3 de la famille V β 6 prédominante chez le patient GOLM47 montre un profil monoclonal chez la population T CD4+CD158k+, et polyclonale chez les T résiduels CD4+CD158k- (Moins-Teisserenc et al., 2015).

A.1.7. Éléments de physiopathologie et caractéristiques immunologiques du syndrome de Sézary

Malgré de nombreux travaux impliquant l'étude de facteurs génétiques, viraux, environnementaux et de signalisations cellulaires, la physiopathologie des lymphomes cutanés est plutôt mal connue. Nous allons tout d'abord rappeler des éléments d'immunologie fondamentale concernant la lignée lymphocytaire T, dont sont issues les CS (même si leur origine sanguine ou cutanée reste encore indéterminée aujourd'hui), avant d'aborder l'état actuel des connaissances sur ces cellules tumorales.

○ LT circulants et de la peau en physiologie humaine

A la sortie du thymus, les cellules T sont dites naïves (TN). Elles sont passées par des étapes successives thymiques de sélections positive et négative, et expriment en théorie un TCR d'une spécificité antigénique donnée, non auto-réactif et restreint par un allèle HLA du soi. La rencontre avec un antigène reconnu par ce TCR déclenche une cascade d'activation de voies de signalisation, qui permet au LT de proliférer et de se différencier en cellules effectrices, la majorité migrant vers les tissus périphériques et les sites de la réaction inflammatoire, grâce à des gradients de chimiokines (famille de cytokines aux propriétés chimiotactiques, contrôlant la migration cellulaire et plus globalement la réponse immunitaire). En contexte aigu, seule une petite partie du pool survit suite à la clairance de l'antigène, constituant une mémoire à long terme (Santana et Esquivel-Guadarrama, 2006).

On observe ainsi dans le sang différents états de différenciation des LT, étudiés en CMF par des marqueurs de surface tels que CD45RA et CD45RO, CCR7, et CD27 (*fig 9*). L'étude phénotypique des LT a été complétée par d'autres caractéristiques comme la longueur des télomères (corrélé au potentiel de division cellulaire et à la longévité de la lignée), leur capacité différentielle à produire des cytokines et/ou leur capacité cytotoxique.

CD45RA et CD45RO sont deux isoformes de la molécule CD45, exprimée sur toutes les cellules hématopoïétiques, et de rôle mal connu. CCR7 est un récepteur de chimiokine, molécule d'écotaxie (*homing*) vers les ganglions lymphatiques, alors que CD27, membre de la superfamille des récepteurs au *tumor necrosis factor* (TNF), est une molécule de costimulation exprimée par les cellules T naïves et dont l'expression est perdue au cours de la différenciation.

Les TN sont CD45RA⁺CD45RO^{neg} et CCR7⁺CD27⁺, ce qui leur permet de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. Après activation, on observe une forte production d'interleukine 2 (IL-2), témoin de leur multiplication rapide. Parmi les T mémoires CD45RA^{neg}CD45RO⁺, on distingue les T centrales mémoires (TCM) CCR7⁺CD27⁺, capables de maintenir la mémoire à long terme dans les ganglions, et les T effectrices mémoires (TEM) CCR7^{neg}CD27^{neg}, doués de fonctions effectrices rapides aux sites périphériques. En relation avec ces fonctions, les TCM produisent après activation de fortes concentrations d'IL-2, alors que les TEM sécrètent surtout de l'IL-4, IL-5 et IFN γ , et expriment fortement des intégrines et récepteurs de chimiokines, leur permettant de migrer vers les sites inflammatoires. Les TEM sont les cellules T pourvues des télomères les plus courts. Les T transitionnelles mémoires (TTM) CCR7^{neg}CD27⁺ sont des cellules intermédiaires entre ces deux types. Enfin, les T effectrices mémoires dites terminales (TEMRA) expriment CD45RA à nouveau et des marqueurs de sénescence. Elles présentent de faibles capacités prolifératives et fonctionnelles (Mahnke et al., 2013).

Il existe différents types de lymphocytes T CD4⁺ matures effecteurs :

- Th1 : Lymphocyte T *helper* de type 1, caractérisé par les cytokines qu'il produit (IL-2, IFN γ , TNF), impliqué notamment dans l'activation des macrophages, et l'élimination des pathogènes intracellulaires.
- Th2 : Lymphocyte T *helper* de type 2 (production d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-25), impliqué dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B et la production de certaines sous-classes d'anticorps, d'où son rôle clé dans l'immunité humorale et l'élimination de pathogènes extracellulaires.

- Th17 : Lymphocyte T *helper* de type 17 (production d'IL-17, IL-22, IL-8, IL-6), jouant un rôle dans l'activation de l'immunité innée et l'inflammation.
- Treg : Lymphocyte T régulateur, cellule T CD4⁺ qui inhibe les réponses T et participe au contrôle de la réponse immunitaire. On distingue les Treg induits, qui se différencient en périphérie à partir de T CD4⁺ conventionnels naïfs sous l'influence d'un environnement cytokinique immunorégulateur (TGFβ, IL-10), des Treg naturels dont la différenciation a lieu directement au niveau thymique. Les Treg se caractérisent par leur phénotype CD25⁺CD127^{low} et l'expression du facteur de transcription Foxp3.

Le tropisme des lymphocytes vers la peau est déterminé par l'expression de récepteurs de chimiokines, tels CCR4, CCR10, CCR6 ou CCR8, qui les y attire par présence d'un gradient de chimiokine dans le milieu, certaines étant plus fortement sécrétées lors de la réponse inflammatoire tissulaire. Dans un second temps, l'extravasation de lymphocytes circulants vers la peau nécessite la présence de ligands de sélectines comme CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*), qui va permettre le *rolling* des leucocytes à la surface endothéliale, avant immobilisation par interaction forte avec des intégrines, puis enfin diapédèse vers le tissu cutané (Tan et al., 2015). Comme l'illustre la figure 7, la plupart des LT de la peau saine sont de type T CD4⁺ conventionnels ou Treg, et se localisent dans les régions périvasculaires du derme. L'infiltrat épidermique est moins riche, majoritairement constitué de CD8⁺ « tissue-resident memory » (TRM). Dans la peau, les LT présentent des caractéristiques distinctes de ceux de la circulation sanguine : la plupart expriment CD45RO et des marqueurs de phénotype mémoire. Des populations T portant un TCR de type γδ, sont également retrouvées dans le derme et l'épiderme (Mueller et al., 2014).

Les TRM, principalement CD8⁺, sont de caractérisation récente. Ces cellules résident dans des tissus périphériques variés dont la peau, et ne recirculent pas vers le sang ni la lymphe. Elles expriment CD69 et CD103. CD69 est une lectine de type C également exprimée par les LT circulants activés mais très transitoirement. Son expression est concomitante avec la régulation négative du récepteur 1 au sphingoside-1-phosphate (S1P1), ce qui pourrait permettre la rétention précoce des TRM dans les tissus périphériques. CD103 (intégrine αE), semble intervenir plus tardivement dans la rétention à long terme des TRM. Ce dernier marqueur est surtout connu pour être exprimé par les lymphocytes intra-épithéliaux de la muqueuse intestinale. L'origine cellulaire des TRM reste mal connue (Gebhardt et al., 2013).

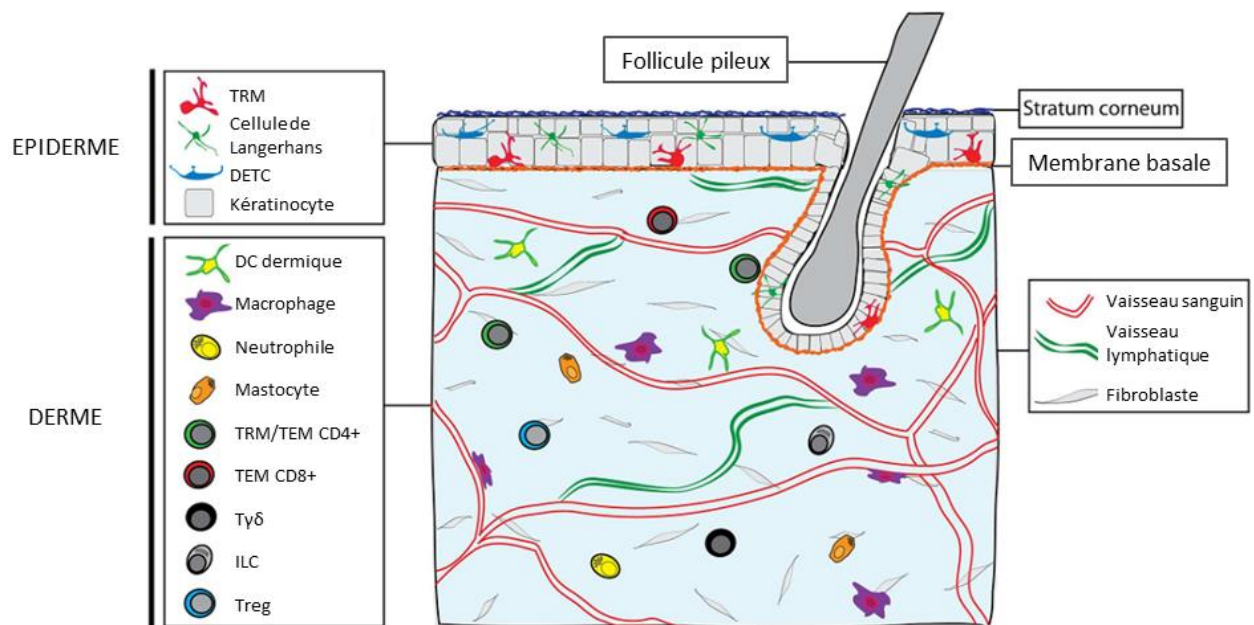


Figure 7 Structure de la peau et types de cellules immunitaires présents, montrant dans le derme la présence de T CD4+ effecteurs ou résidents mémoires, et dans l'épiderme la présence de T CD8+ résidents mémoires (DETC : dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cell, DC : dendritic cell, ILC : innate lymphoid cell) (adapté de Mueller et al., 2014)

○ **Données de la littérature sur les CS circulantes et de la peau**

L'origine de la prolifération cancéreuse de ces lymphocytes et leur persistance dans la peau est aujourd'hui mal connue, et probablement multifactorielle. Une large étude internationale, « The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project », a étudié les associations épidémiologiques dans divers lymphomes non hodgkiniens, dont 324 cas de MF/SS. Il en ressort comme facteurs de risque principaux (odds ratio entre 2 et 9) une histoire familiale de myélome multiple, des antécédents personnels de certaines pathologies auto-immunes (lupus, sclérodémie systémique) ou d'eczéma (ce dernier pourrait être une erreur diagnostique ou les prémices d'un CTCL débutant), ainsi que certains modes d'exercice professionnel (peintre, agriculteur) (Morton et al., 2014).

Sur le plan immunologique, les patients présentent un déséquilibre cytokinique en faveur de la balance Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) (Miyagaki et Sugaya, 2014). Elle s'accompagne chez certains d'une augmentation du chiffre d'éosinophiles et du taux d'IgE sériques. On observe également une restriction du répertoire du TCR (Yawalkar et al., 2003). Tous ces facteurs immunologiques peuvent expliquer l'immunodépression présente chez ces patients à un stade avancé, avec une forte mortalité infectieuse. Toutefois, il a été également décrit des profils de type Th1 (Yagi et al., 1996) et Treg (Krejsgaard et al., 2012), montrant que les CS constituent un groupe phénotypiquement et fonctionnellement hétérogène. L'IL-7 est un facteur de croissance des CS et dans la majorité des

lymphomes T cutanés on retrouve l'expression du récepteur pour l'IL-7. L'IL-2 et l'IL-15 seraient également des facteurs de croissance pour les cellules tumorales T. Enfin, les cellules tumorales produisent des quantités importantes de TGF- β , cytokine immunosuppressive.

Le tropisme vers la peau des cellules malignes est dû à l'expression de récepteurs de molécules d'écotaxie vers la peau spécifiques, comme CCR4, CCR10, CLA ou encore CXCR3. L'activation de ces récepteurs engendre de plus un signal de survie pour la cellule (Ferenczi et al., 2002; Miyagaki et Sugaya, 2014). L'analyse immunohistochimique des CS cutanées montre une prolifération accrue (fort marquage Ki67) avec une forte expression de PD-1 (Klemke et al., 2015).

Les techniques de biologie moléculaire ont trouvé parmi les CS de nombreuses instabilités génétiques pouvant être à l'origine de la transformation cellulaire. La mutation ou la modification épigénétique de gènes impliqués dans les voies d'activation oncogénique est fréquemment rencontrée, et concerne des oncogènes (tels *CDKN2A*, *TWIST1*), des gènes suppresseurs de tumeurs (tels *TP53*, *PTEN*), impliqués dans la signalisation cellulaire (tels *CARD11*, *PLCG1*, *FAS*, *CCR4*), ou encore dans le remodelage chromatinien (*ARID1A*, *DNMT3A*, *MLL3*, *TET2*) (Chevret et Merlio, 2016).

Sur le plan cellulaire, curieusement, les CS issues du sang prolifèrent mal *in vitro*, mais montrent en revanche une remarquable résistance à l'apoptose (Bagot et Bensussan, 2006). Elle peut s'expliquer par le dérèglement de multiples cascades de signalisation impliquées dans la croissance et la régulation cellulaire (Nicolay et al., 2016), comme :

- Une activation constitutive des voies NF- κ B, MAPK et Stat3 (Kiel et al., 2015) ;
- Une dérégulation de la signalisation du TCR et par conséquent de l'AICD (« Activation-Induced Cell Death »), qui correspond à l'induction de l'apoptose des LT déjà activés, par nouvelle stimulation du TCR lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire. KIR3DL2 participerait à l'inhibition de cette voie (Thonnart et al., 2014). Elle passe également par des récepteurs de mort cellulaire, dont Fas qui est fréquemment sous-exprimé par les CS (Jones et al., 2010). De plus, la signalisation Fas/Fas-ligand en elle-même semble altérée (Esmailzadeh et al., 2015) ;
- Une insensibilité des CS CD7^{neg} à la galectine 1, sélectine déclenchant l'apoptose (Rappl et al., 2002) ;
- Une altération de protéines clés du cycle cellulaire, avec par exemple l'expression aberrante ou augmentée du facteur de transcription TOX, qui régule négativement les gènes codant

pour des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (Huang et al., 2015), ou encore des mutations de *CDKN2A*.

Enfin, l'origine sanguine ou cutanée initiale de la transformation maligne reste inconnue.

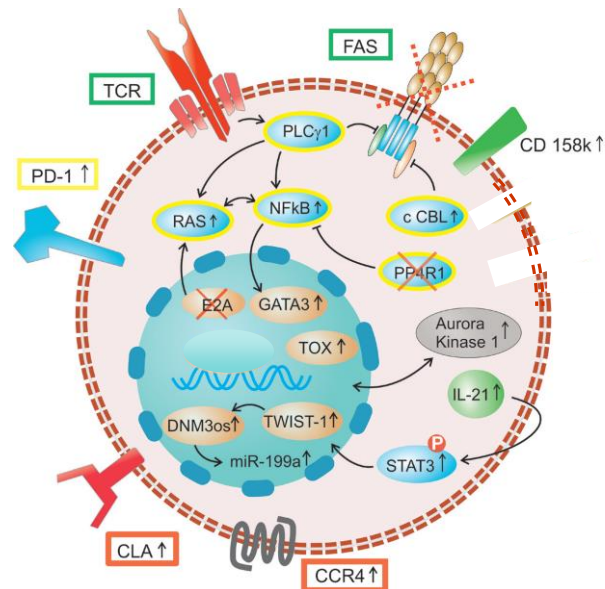


Figure 8 Schéma montrant quelques molécules et voies de signalisation dérégulées dans la CS (adapté de Nicolay et al., 2016) : récepteur TCR et sa molécule de costimulation négative PD-1, avec en aval les voies NF- κ B et MAPK ; voie de l'AICD Fas/FasL avec surexpression de la c-CBL E3 ubiquitin ligase et de CD158k/KIR3DL2 ; Aurora-kinase 1 contrôlant la division cellulaire ; molécules de *homing* CLA et CCR4 ; facteurs de transcription STAT3 (boucle d'activation autocrine par l'IL-21), TOX, TWIST-1 (induisant DNM3 et la transcription du miR199 impliqué dans de multiples voies d'activation oncogéniques).

A.2. Problématiques du projet

A.2.1 Observations récentes de mon équipe

- **Hétérogénéité naïve/mémoire des CS**

Il était communément admis que les CS circulantes et de la peau, identifiées par leur clonalité de la chaîne V β du TCR, présentent habituellement un phénotype T central mémoire (TCM) CCR7⁺CD27⁺ (Campbell et al., 2010; Clark et al., 2011) alors que les cellules du MF étaient traditionnellement décrites comme étant de phénotype effecteur mémoire (CCR7⁻CD27⁻). De cette observation a émergé l'hypothèse que ces CS auraient la capacité de re-circuler dans le sang à partir de la peau grâce à l'expression de CCR7 (migration vers le ganglion), par opposition aux cellules du MF, de localisation strictement cutanée.

Néanmoins, mon équipe a pour la première fois rapporté, en étudiant les marqueurs CD45RA, CCR7 et CD27 chez 32 patients atteints de SS, une grande hétérogénéité inter- et intra-individuelles des CS circulantes CD158k⁺ (Moins-Teisserenc et al., 2015), qui peuvent adopter tous les phénotypes possibles, de la T naïve à la T effectrice terminale. Un exemple de profil mixte chez un patient est présenté sur la figure 10.

Mon travail de thèse a consisté à caractériser de manière plus précise cette diversité phénotypique. La présence de CS de phénotype naïf étant relativement surprenante, je me suis intéressée à une population T mémoire de description récente, les T « *Stem cell memory* » (TSCM). Ces cellules, qui correspondent à des LT tout nouvellement mémoires, sont douées de capacités d'auto-renouvellement et multipotentes, pouvant générer tous les sous-types T mémoires et effecteurs *in vitro*. Leur profil d'expression génique les place en termes de différenciation entre les TN et les TCM (fig.9). Après stimulation non spécifique du TCR par des anticorps anti-CD3/CD28, elles présentent une capacité deux fois plus grande à maintenir leur phénotype, en comparaison aux TCM (Gattinoni et al., 2011). Ces cellules se différencient phénotypiquement des cellules naïves (CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺) par l'expression additionnelle de la molécule CD95 (récepteur Fas) (fig.11), que nous avons voulu étudier chez les populations de CS. Elles représentent 1-2% des T CD4⁺ chez le sujet sain.

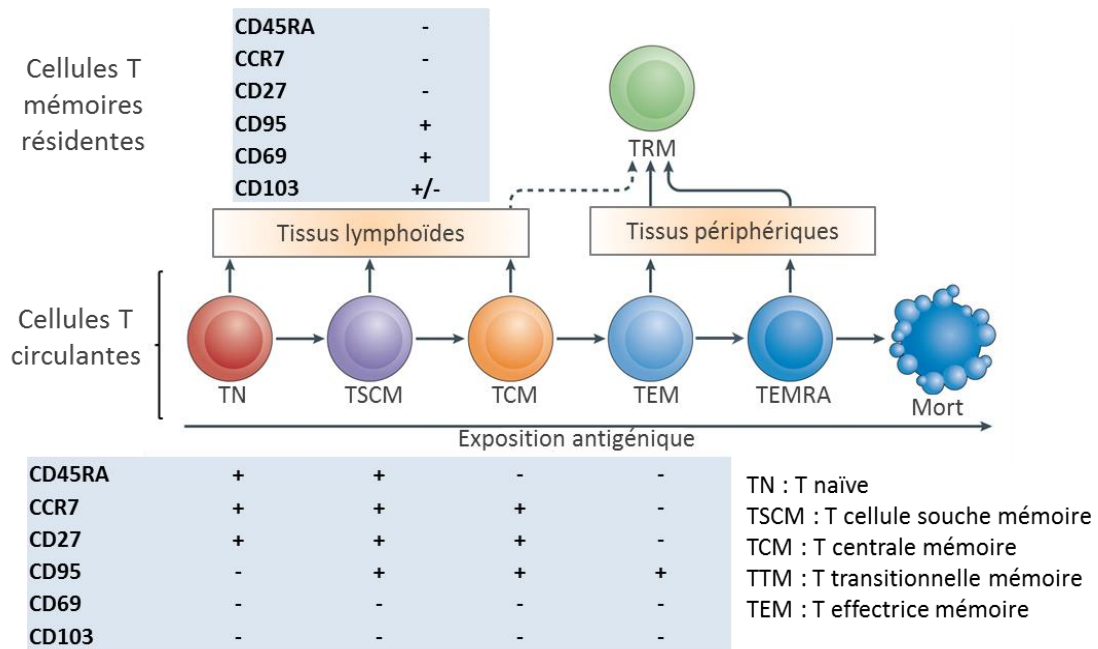


Figure 9 Représentation schématique de la maturation périphérique lymphocytaire T, et marqueurs associés (adapté de Farber et al., 2014)

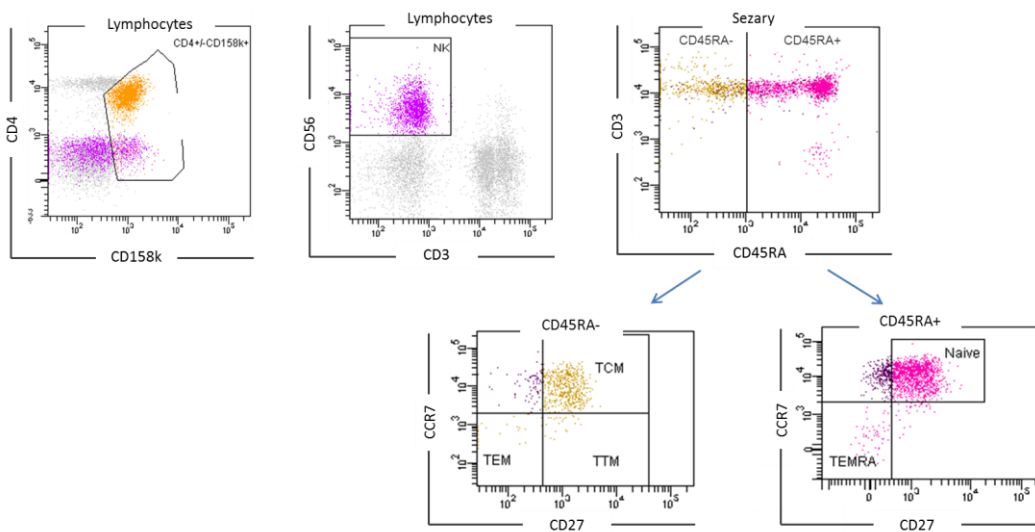


Figure 10 Exemple de patient présentant une association de CS centrales mémoires et naïves

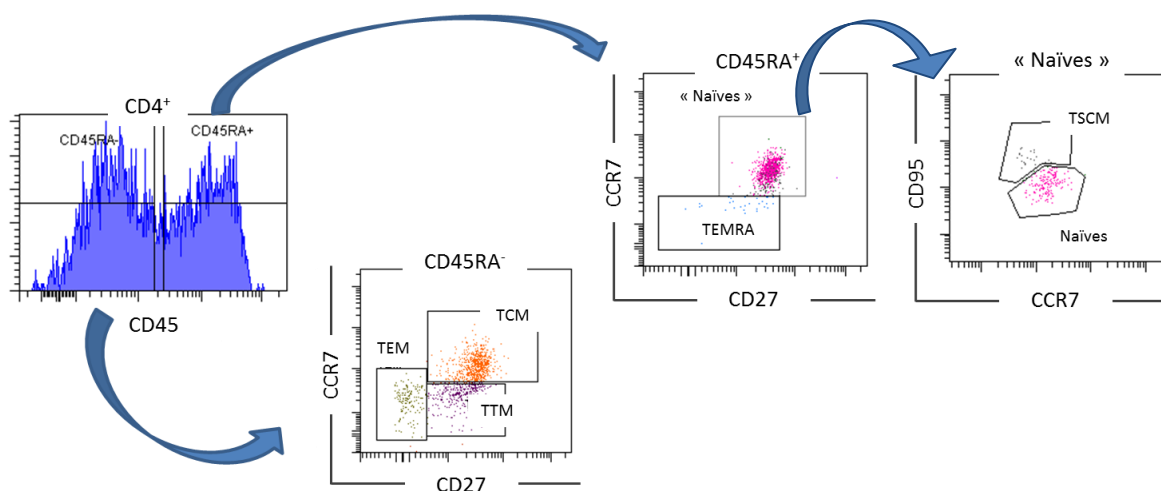


Figure 11 Mise en évidence en CMF des différents types naïfs / mémoires de lymphocytes T CD4+ chez un sujet sain, en particulier des TSCM, qui sont distinctes des cellules naïves vraies par l'expression de CD95

A.2.2. Objectif du travail de thèse

Les mécanismes cellulaires et moléculaires gouvernant les relations entre les localisations cutanées et sanguines des CS, le ou les origine(s) même du clone tumoral ne sont toujours pas connus dans la maladie de Sézary. L'objectif de ce travail et plus globalement du projet de mon équipe est d'apprécier la signification des hétérogénéités intra- et inter-individuelles des CS, ainsi que la relation entre les compartiments sanguins et cutanés, avec la perspective de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires pathogéniques.

Nous nous proposons dans ce travail de thèse d'approfondir l'étude de la diversité phénotypique des CS, sur l'ensemble de la cohorte de l'hôpital Saint-Louis dans le sang, et dans un deuxième temps en comparant les cellules malignes circulantes avec celles de la peau, chez des patients présentant des profils divers. Nous voulons déterminer si les types de CS caractérisés dans le sang sont en miroir de ceux présents dans la peau, et s'ils évoluent dans le temps au cours du suivi de la maladie. Nous nous attacherons à l'expression des marqueurs de différenciation précédemment décrits, mais également d'activation, ainsi qu'à l'expression des récepteurs de chimiokines et d'interleukines connus pour intervenir dans le processus pathologique du SS. Pour chaque prélèvement, les cellules malignes et la contrepartie des lymphocytes « normaux » résiduels seront étudiés.

PARTIE B : MATERIELS ET METHODES

B.1 Cohortes de patients

Il s'agit d'une étude à la fois rétrospective et prospective. Depuis mars 2014, en collaboration avec le service de Dermatologie de l'Hôpital Saint-Louis (Pr Martine Bagot) nous avons suivi ou posé le diagnostic de SS chez plus de 150 patients avec la constitution d'une banque de cellules lymphomonocytaires sanguines (PBMC) congelées déclarée, représentant plus de 500 prélèvements. Le recueil des échantillons est conditionné par la signature d'un consentement éclairé par les patients.

Les résultats découlent de l'analyse de 3 cohortes, la première cohorte représente l'ensemble des patients Sézary depuis 2014 ayant bénéficiés de prélèvements analysés en routine. Les deux autres cohortes sont plus restrictives, et comprennent certains d'entre eux, dont j'ai pu approfondir l'analyse phénotypique, soit parce que du matériel congelé était disponible, soit parce que le patient a été prélevé au cours de mon internat à l'hôpital Saint-Louis. Le critère positif de sélection est un nombre de CS sanguines connu significatif les mois précédents ($>200/\text{mm}^3$), afin de pouvoir étudier confortablement leurs caractéristiques phénotypiques. Les cohortes sont définies comme suit :

1. Cohorte « étude sang frais » : prélèvements analysés dans les 48h suivant la ponction sanguine, au laboratoire hospitalier d'Immunologie,
2. Cohorte « étude PBMC congelées » : prélèvements traités comme expliqué en B.3 pour constituer la banque de PBMC congelées, et décongelées le jour de l'analyse pour analyse rétrospective,
3. Cohorte « étude sang/peau » : Des prélèvements sanguins et cutanés (au punch de 4 mm) ont été réalisés le même jour, afin d'étudier en parallèle les CS circulantes et celles infiltrant l'épiderme et le derme. Ils ont été traités frais, le jour même.

Les détails sont donnés dans le tableau 3 et l'annexe 2.

	1. Etude Sang frais	2. Etude PBMC congelées	3. Etude Sang/Peau
Etat de l'échantillon traité	Frais	Congelé	Frais
N	52	34	16
Sexe	- 24 hommes - 28 femmes	- 16 hommes - 18 femmes	- 8 hommes - 8 femmes
Âge	66 (29-88)	68 (30-88)	68 (30-88)
Stade clinique au prélèvement	- IIB (2) - IIIB (1) - IVA1 (45) - IVA2 (3) - IVB (1)	- IV A2 (1) - IV A1 (31) - IIB (2)	- IV A1 (15) - II B (1)
Nombre de lignes de traitement au prélèvement	3 (0-14) 9 au diagnostic	2 (0-13) 4 au diagnostic	2 (1-9)

Tableau 3 Caractéristiques des trois cohortes de patients

B.2. Donneurs sains

Nous avons réalisé des immunophénotypages selon le plan de marquage du tableau 5 chez 31 donneurs sains de l'EFS (Hôpital Saint-Louis), sur ampoules de PBMCs congelées.

Trois échantillons cutanés d'individus « sains », issus de déchets de chirurgie esthétique (Hôpital Saint-Louis, service du Pr Mimoun, via le Dr A. Marie-Cardine, INSERM U976), ont également été étudiés (plan de marquage sur *tab.6*).

B.3. Constitution de la banque de PBMC congelées (pour cohorte 2)

Les prélèvements sanguins (sur EDTA) ont été traités de la manière suivante :

- Numération directe des populations lymphocytaires,
- Isolement sur gradient de densité (Ficoll) des PBMC,
- Stockage des cellules dans un milieu contenant 90% de sérum de veau fœtal et 10% de DMSO à -195°C (azote liquide).

Le protocole de décongélation est donné dans l'annexe 1A.

B.4. Extraction cellulaire à partir d'une biopsie cutanée (pour cohorte 3)

La biopsie fraîche est fragmentée au scalpel puis soumise à une digestion enzymatique à la collagénase de type II dans du milieu RPMI 1640, pendant 30 min à 37°C. Le produit de digestion est lavé puis filtré afin d'obtenir la suspension cellulaire. Le protocole détaillé est donné dans l'annexe 1B.

B.5. Numération et immunophénotypes lymphocytaires

- **Numération (cohorte 1) :**

La numération des lymphocytes est réalisée dans le Laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Hôpital Saint-Louis, sur sang frais lysé, non lavé, à l'aide du système Trucount® (BD Biosciences) et des anticorps anti-CD45 Percp, anti-CD3 FITC, anti-CD4 APC et anti-CD8 PE.

- **Plans de marquage :**

Voici les plans de marquage des immunophénotypes réalisés pour les trois cohortes :

Cohorte 1 « Sang frais »

Fluorochromes	FITC	PE	PerCp	PeCy7	APC	APC-H7	V450 BV421	V500
1- Panel Sézary	CD26	CD158k	CD8	CD56	CD7	CD14	CD3	CD4
2- Maturation	CD3	CD158k	CD8	CD56	CD45RA	CD27	CCR7	CD4

Tableau 4 Plan de marquage sur sang frais réalisé en routine au laboratoire d'Immunologie cellulaire. Les anticorps ont été fournis par BD Biosciences, sauf anti-CD158k (Innate Pharma)

Cohorte 2 « PBMC congelées »

Fluorochromes	FITC	PE	PerCp	PeCy7	APC	APC-H7	V450 BV421	V500
1- Maturation	CD95	CD158k	CD25	PD-1	CD45RA	CD27	CCR7	CD4
2- Tropisme	CLA	CD158k	CCR6	CCR4	CXCR3	/	CCR10	CD4
3- IL-R	CD215	CD158k	CD127	CD69	CD122	CD25	CD103	CD4

Tableau 5 Plan de marquage sur PBMC congelées/décongelées. Les anticorps ont été fournis par BD Biosciences, sauf anti-CD103 (BioLegend), anti-CD215 (Novus Biological) et anti-CD158k (Innate Pharma).

Cohorte 3 « Sang/Peau »

Fluorochromes	FITC	PE	PerCp	PeCy7	APC	APC-H7	V450 BV421	V500
1- Vβ	Vβ	CD158k	CD69	CD103	CD45	CD4	CD3	Viab
2- Maturation	CD95	CD158k	CD4	CD45	CD45RA	CD27	CCR7	Viab
3- Tropisme	CLA	CD158k	CCR4	CCR6	CXCR3	CD4	CCR10	Viab
4- IL-R	CD215	CD158k	PD-1	CD127	CD25	CD4	CD3	Viab

Tableau 6 Plan de marquage sur sang et peau.

Le marquage Vβ est réalisé lorsque que nous connaissons la spécificité du clone malin. Pour la peau, un marqueur de viabilité cellulaire permet d'exclure les cellules mortes suite au processus d'extraction cellulaire. Les anticorps ont été fournis par BD Biosciences, sauf CD103 (BioLegend), CD215 (Novus Biological), CD158k (Innate Pharma), et le Fixable Viability Dye utilisé pour les prélèvements cutanés ("Viab" ; eBioscience).

Le protocole de marquage est donné en annexes 1C et D. L'acquisition des données se fait sur cytomètre FACSCanto™ II (BD Biosciences) et avec le logiciel FACSDiva™ (BD Biosciences).

- **Mise au point :**

Notre cytomètre FACSCanto™ II (BD Biosciences) comporte 3 lasers et nous pouvons travailler avec 8 couleurs. Un phénomène courant et redouté en cytométrie est le chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes utilisés (« spillover »). Dans ce cas la fluorescence d'un fluorochrome A va être perçue et contaminer le signal du détecteur du fluorochrome B. Cet artefact peut être corrigé par compensation mathématique des signaux.

Le réglage des compensations des signaux donnés par les différents fluorochromes a été réalisé grâce à une série de monomarquages (un seul anticorps par tube), et un témoin « cellules seules » afin d'évaluer l'auto-fluorescence des cellules.

Des tubes FMO (« Fluorescence Minus One »), comportant tous les anticorps sauf un, ont permis de fixer le seuil de positivité. Dans la peau, en raison de la faible quantité de matériel, seuls les FMO des marqueurs complexes ont été réalisés : CCR7, CD27, CD95, CD25. Un exemple de FMO est montré pour l'anticorps anti-CD95-FITC sur la figure 20B.

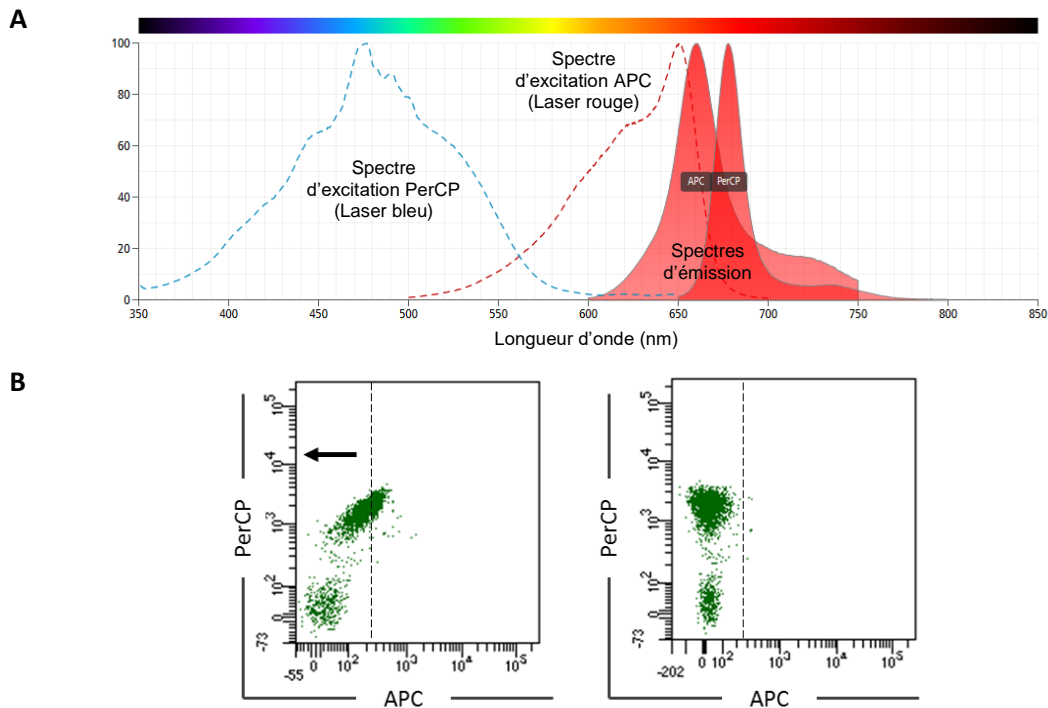


Figure 12 Phénomène de chevauchement de spectres d'émission (BD Spectrum Viewer) **(A)** et principe de compensation à partir de tubes monomarqués (à gauche : non compensé, la fluorescence du PerCP contamine le signal du détecteur pour l'APC ; à droite : après compensation) **(B)**, exemple pour les fluorochromes APC et PerCP

○ **Analyse :**

L'analyse a été réalisée sur le logiciel FACSDiva™ (BD Biosciences).

Le tube « Vβ » du tableau 6 contrôle la correspondance de la population T CD4⁺CD158k⁺ au clone malin Vβ préalablement identifié chez certains patients, lorsque l'anticorps monoclonal est disponible.

L'état de maturation des LT est ensuite analysé dans le tube « Maturation », grâce aux marqueurs CD45RA, CCR7, CD27 et CD95 comme précédemment évoqué (*fig.4*). Nous pouvons ainsi distinguer les populations connues dans la littérature : TN, TSCM, TCM, TTM, TEM et TEMRA. CD69 et CD103 (tube 1) permettent de caractériser les TRM, qui sont CCR7^{neg}CD69⁺CD103^{+/-} (Gebhardt et al., 2013).

Le tube « Tropicisme » permet d'explorer l'expression de récepteurs de chimiokines impliqués dans le tropisme des LT vers la peau : CCR4, CCR10, CXCR3, CCR6, ainsi que le ligand de sélectine CLA.

Le tube « IL-R » s'intéresse aux récepteurs des principales interleukines (IL) impliquées dans la croissance des CS : IL-2, IL-7 et IL-15. Le récepteur à l'IL-2 (IL-2R) est constitué de deux à trois chaînes:

α (CD25), β (CD122 commune à IL-15R) et la chaîne γ commune (γ_c , CD132). Le LT au repos exprime un récepteur composé des chaînes β et γ , fixant l'IL-2 avec une faible affinité, tandis que l'association avec la chaîne α après activation permet à la cellule de répondre à de très faibles doses d'IL-2. Le récepteur à l'IL-15 est formé des chaînes α (CD215), β (CD122), et γ_c , et celui à l'IL-7 d'une chaîne α (CD127) et de γ_c (fig.13).

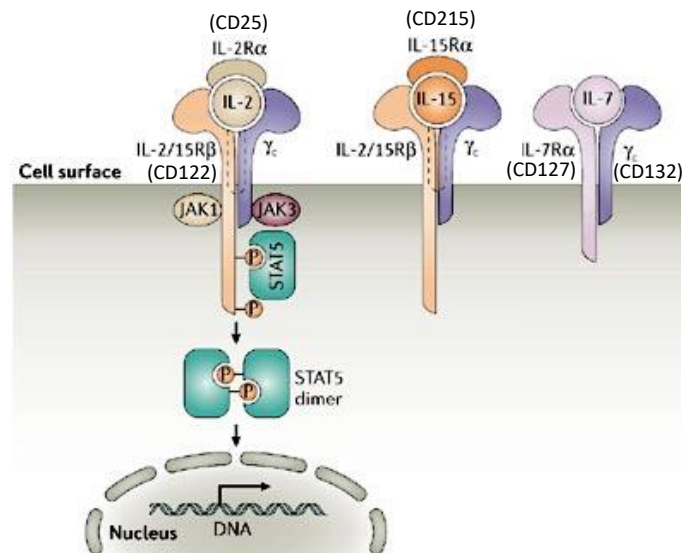


Figure 13 Schéma de la structure des récepteurs aux interleukines 2, 7 et 15 (IL-2R, IL-7R et IL-15R) (adapté de Waldmann et al., 2006)

Ce dernier tube permet également l'étude de marqueurs d'activation tardifs, CD25 et PD-1.

B.6. Statistiques

Le nombre de patients étudiés étant inférieur à 20 dans l'étude comparative sang/peau (cohorte 3), et les distributions ne suivant pas une loi normale pour les cohortes 1 et 2, nous avons eu recours à des tests non paramétriques appariés pour leur analyse : tests de Wilcoxon pour échantillons liés, afin de comparer chez un même patient les prélèvements sanguin et cutané, ou bien les CS sanguines par rapport aux T CD4⁺ CD158k⁻ résiduels. Pour confronter les valeurs des T CD4⁺ CD158k⁻ aux T CD4⁺ de sujets sains, nous avons employé le test de Mann-Whitney (non paramétrique pour échantillons indépendants).

Les graphes et l'analyse statistique ont été réalisés sur le logiciel Prism® ; sont indiquées les médianes pour l'étude comparative sang/peau (cohorte 3) et les moyennes pour l'étude sanguine (cohortes 1 et 2). Les différences significatives entre deux échantillons appariés sont signalées par les symboles * (p<0,05), ** (p<0,01), *** (p<0,001) et **** (p<0,0001).

PARTIE C : RÉSULTATS

C.1. Détection des cellules de Sézary

Les CS ont été définies comme la population lymphocytaire $CD4^{+/-}CD158k^{+}$.

J'ai comparé mes propres immunophénotypages sur PBMC congelées (*cohorte 2*), avec ceux du laboratoire de routine réalisés sur sang frais (*cohorte 1*). En effet, certains antigènes peuvent être altérés lors des processus de congélation / décongélation, et les niveaux d'expression peuvent ainsi apparaître modifiés ou faussement nuls.

La plan de marquage employé en routine pour discriminer les CS est également plus complet (*tableau 4*). Le tube 1 (« Panel Sézary ») permet de cibler les LT $CD3^{+}CD4^{+/-}$, avec exclusion des monocytes $CD14^{+}$, lymphocytes T $CD8^{+}$, et NK $CD56^{+}$ et/ou $CD16^{+}$ (*fig. 14*).

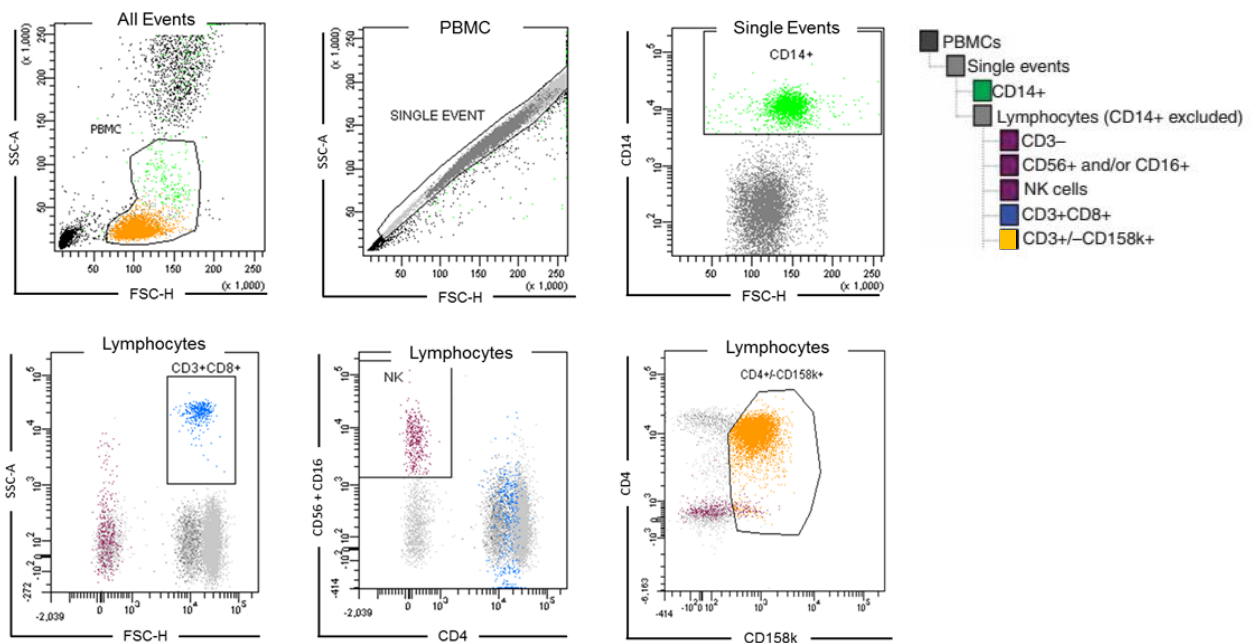


Figure 14 Stratégie de fenêtrage des CS sanguines au laboratoire d'Immunologie de routine (cohorte 1).

Les lymphocytes sont repérés dans la fenêtre granulosité SSC (*Side Scattered Light*) / taille FSC (*Forward Scattered Light*). Puis les doublets (hors de la fenêtre « Single Events » du graphe FSC-A (*Area*) / FSC-H (*Height*)) et les monocytes $CD14^{+}$ sont exclus.

Dans un second temps, parmi les lymphocytes, les T $CD8^{+}$ et les cellules NK ($CD16^{+}$ et/ou $CD56^{+}$) sont exclus.

Enfin on isole sur la population restante les lymphocytes T $CD4^{+/-}CD158k^{+}$.

Entre la technique sur sang frais et sur matériel congelé, les phénotypes naïfs / mémoires sont comparables et les pourcentages retrouvés de T CD4⁺CD158k⁺ sont corrélés ($p < 0,05$, test de corrélation de Spearman) (fig.15). Pour les antigènes CXCR3, CCR10, CD25, en revanche, les marquages étaient altérés sur PBMC décongelées, et ne sont donc pas présentés dans ce mémoire.

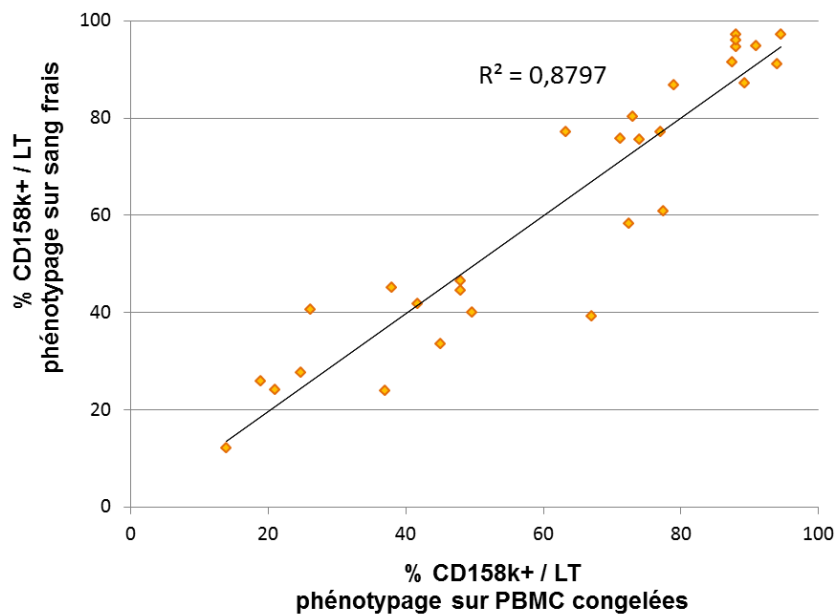


Figure 15 Corrélation entre les fenêtrages des CS T CD158k⁺ réalisés sur sang frais et PBMC congelées

Nous avons aussi vérifié la concordance entre les CS ainsi individualisées et le clone V β ⁺ précédemment caractérisé chez le patient au diagnostic par l'équipe INSERM U976, lorsque l'anticorps anti-V β était disponible. Les CS négatives pour un des deux marqueurs sont rares (<5%) (fig.16A).

Dans la peau, le milieu est plus complexe, comme illustré par le graphe FSC/SSC montrant tous les événements acquis (*All Events*), sur la figure 17. Elle montre la stratégie de fenêtrage adoptée, utilisant un anticorps anti-CD45 (spécifique des cellules hématopoïétiques) et un marqueur de viabilité cellulaire. La richesse en CS est très variable selon les patients.

Le marquage CD158k chez des patients Sézary a déjà été employé pour mettre en évidence les cellules tumorales cutanées (Ortonne et al., 2006a). Il a néanmoins été retrouvé positif chez une sous-population T CD4⁺ de la peau saine (Sako et al., 2014). Nous avons vérifié la concordance entre

le marquage CD158k sur les T CD4⁺ avec l'identification du clone en CMF à l'aide de l'anticorps anti-Vβ correspondant, lorsque celui-ci était connu dans le sang et disponible, soit chez 6 des 16 patients. Sur la figure 16B, on remarque que les lymphocytes CD4⁺ CD158k⁺ correspondent quasiment tous au clone Vβ précédemment mis en évidence dans le sang circulant.

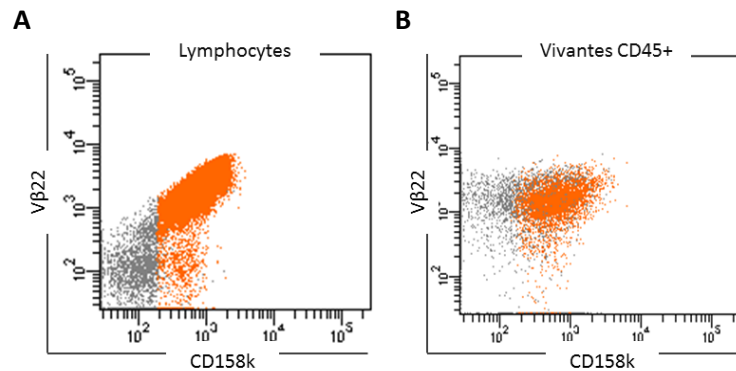


Figure 16 Exemple de vérification de la correspondance entre les cellules CD158k⁺ et le marquage avec l'anticorps anti-Vβ22, correspondant au clone malin identifié dans le sang (A) et la peau (B) (MOTM35). Respectivement 0,6% et 4% des T CD158k⁺ sont Vβ22⁺.

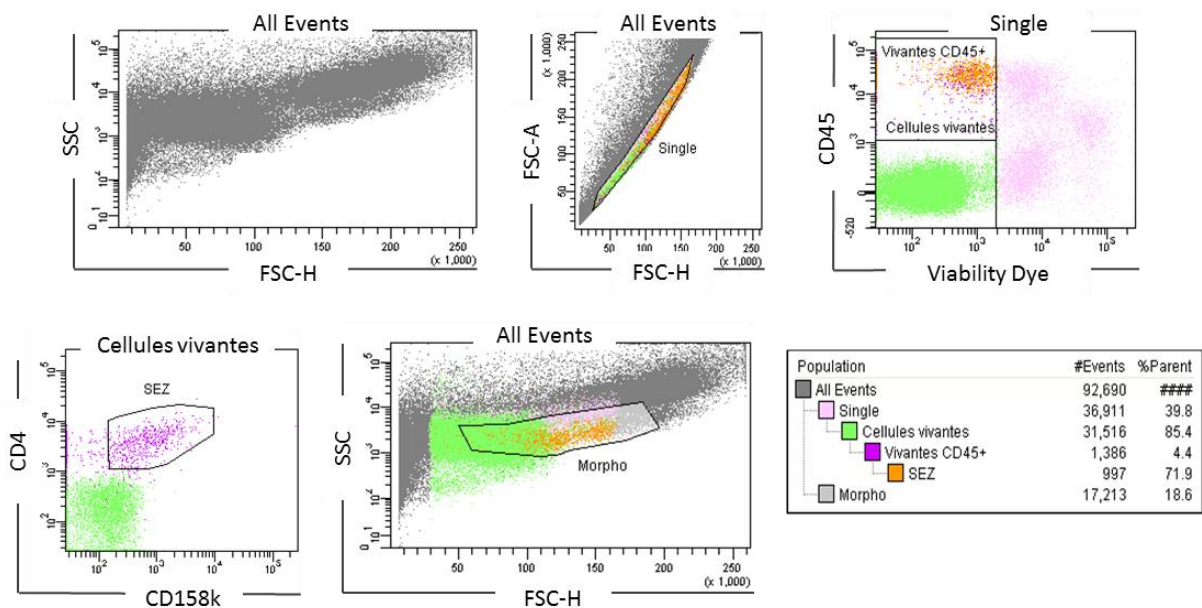


Figure 17 Stratégie de fenêtrage des CS dans la peau.

Dans la peau, les doublets hors de la fenêtre « Single » sont éliminés, puis le graphe CD45/Viability Dye permet de repérer les cellules vivantes (qui ne fixent pas le marqueur de viabilité) et CD45⁺ (cellules hématopoïétiques). Parmi les cellules vivantes, on met en évidence les CS CD158k⁺, qui sont bien CD45⁺, et nous pouvons définir une fenêtre "Morpho" sur le graphe initial FSC/SSC.

Les CS identifiées par le marqueur CD158k seront identifiées en orange sur les figures Diva™ présentées par la suite, et les lymphocytes T CD4⁺ résiduels CD158k^{neg} à priori non tumoraux en vert. Les valeurs obtenues chez les sujets sains sont renseignées dans l'annexe 7.

C.2. Répartition des populations Sézary naïves / mémoires

C.2.1. Étude des CS circulantes

C.2.1.1 Cohorte 1 sur sang frais

Chez les 52 patients suivis au laboratoire de routine, 58% ont un phénotype de maturation homogène, correspondant soit à des TCM, soit à un profil CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺ qualifié de « pseudo-TN » (*fig 18A*). La seconde moitié des patients de la cohorte présente une association de deux à quatre phénotypes (arbitrairement pris en compte si correspondant à plus de 10% de l'ensemble des CS), le plus fréquemment TCM + « pseudo-TN », mais les TTM, TEM et TEMRA sont également représentés (*fig 18B*). Les résultats détaillés sont regroupés dans l'annexe 2.

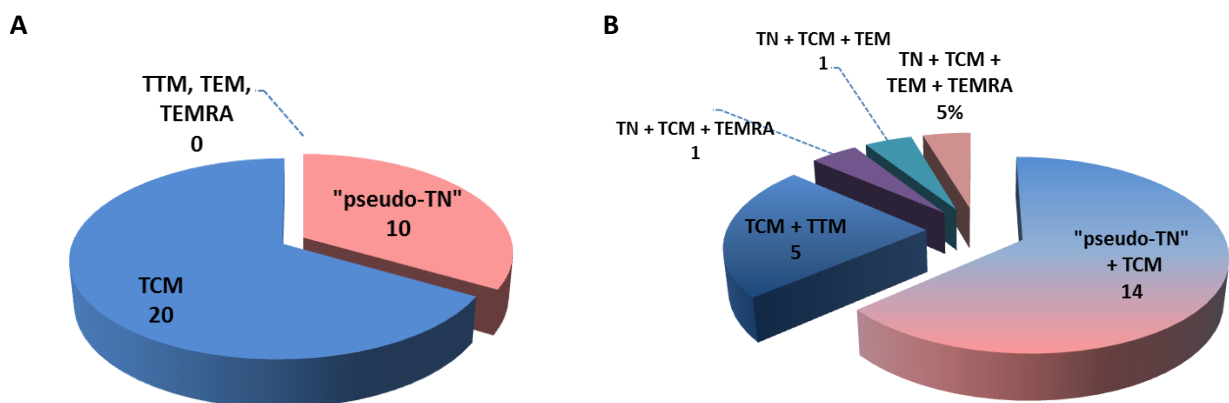


Figure 18 Phénotypes naïfs/mémoires des CS CD4⁺ CD158k⁺ circulantes chez les patients de l' « étude sang frais ». Seules les populations > 10% sont prises en compte sur cette représentation graphique. (A) 30 patients présentent un seul type de CS, alors que (B) 22 ont plusieurs types de CS associés.

C.2.1.1 Cohorte 2 sur PBMC congelées

Suite à la mise en évidence chez certains patients de CS de type « pseudo-TN », et à la description récente dans la littérature des TSCM, nous avons repris les immunophénotypages lymphocytaires

sanguins de 34 de ces patients, pour lesquels nous disposons d'ampoules de PBMC congelées, en complétant le panel avec l'anticorps anti-CD95 (tube « Maturation », détaillé dans le *tab.5*).

Les résultats sont présentés sur la figure 19 et les données regroupées dans l'annexe 4. Chez trois patients plus de 90% des CS expriment CD45RA, et ont soit un phénotype de T naïfs ($CCR7^+CD27^+CD95^{neg}$) pour deux d'entre eux, soit de TSCM ($CCR7^+CD27^+CD95^+$) (*fig.19A* et *20B*) chez un patient. En additionnant les cas compris dans des profils mixtes (*fig.19B*), 5 patients présentent des CS de type TSCM, soit près de 15% de cette cohorte.

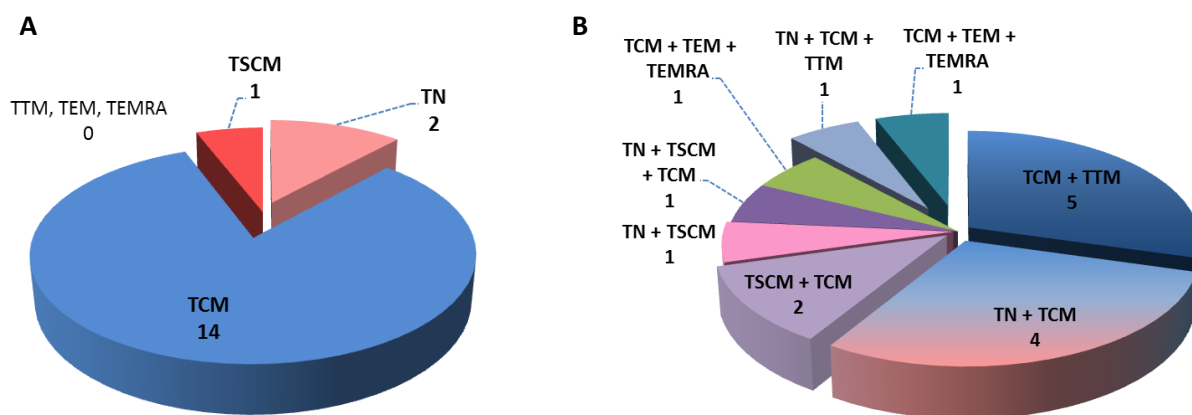


Figure 19 Phénotypes naïfs/mémoires des CS circulantes chez les patients de l'étude « PBMC congelées ». Seules les populations > 10% sont prises en compte sur cette représentation graphique.

(A) 17 patients présentent un seul type de CS, alors que (B) 17 ont plusieurs types de CS associés.

Des exemples d'immunophénotypages obtenus chez différents patients illustrent sur les figures 20-21 ces hétérogénéités intra- et inter-individuelles, à travers les principaux cas de figure rencontrés.

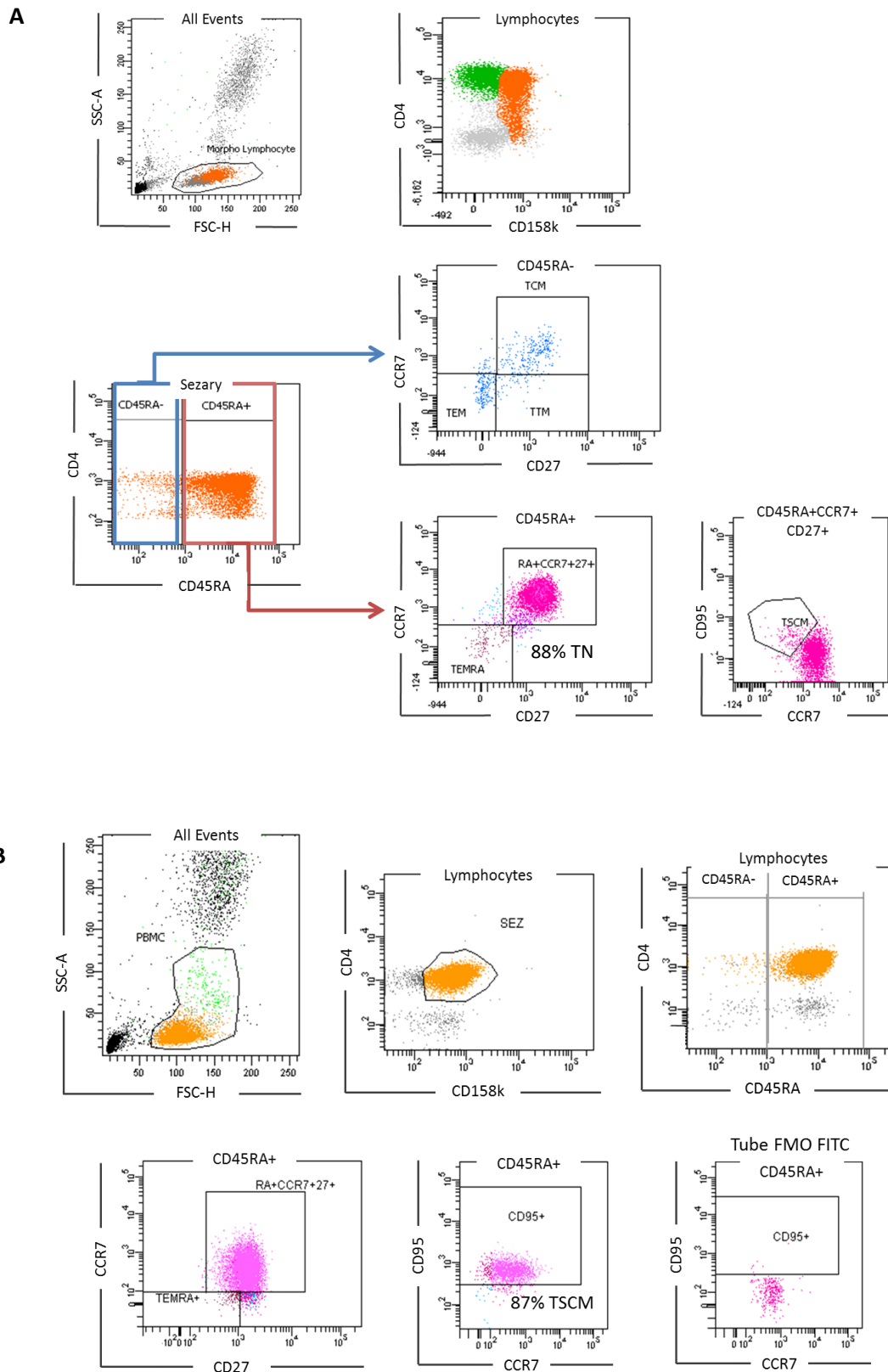


Figure 20 Exemples de patients présentant quasi exclusivement des CS de phénotype naïf (SAMM53 - **A**), ou TSCM (CERA45 - **B**) dans le sang. Ces dernières sont caractérisées comme CD45RA+CCR7+CD27+CD95+. Le dernier graphe CD95/CCR7 présente les résultats du tube FMO pour l'anticorps anti-CD95-FITC.

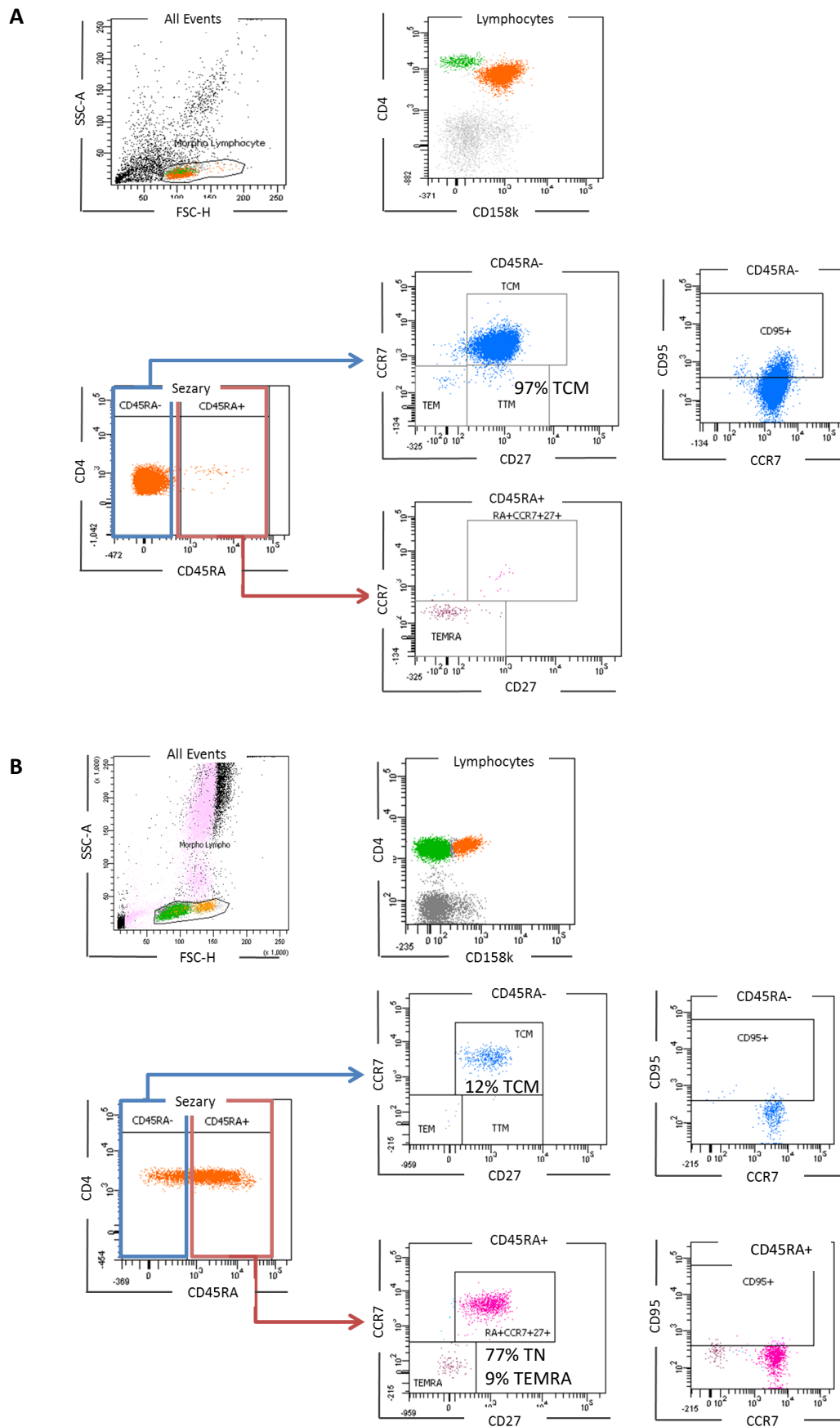


Figure 21 Exemples de patient présentant des CS sanguines quasi exclusivement de phénotype TCM (LECD48) (A), ou une association TCM-naïves (B)

Par ailleurs, l'anticorps anti-CD95 nous permet de différencier les T naïves des TSCM, mais est normalement également exprimé par l'ensemble des T mémoires. Or nous avons remarqué chez 68% des patients un marquage faible parmi les CS de phénotype mémoire, avec des niveaux d'expression de CD95 parmi les cellules CD45RA^{neg} souvent inférieurs à 25%, pour des valeurs usuelles chez le témoin sain de 44 à 89%. La répartition sur l'ensemble de la population apparaît bimodale, une très forte expression étant au contraire conservée chez certains patients (*fig.22B*).

Nous avons ensuite individualisé parmi les lymphocytes, les T CD4⁺CD158k^{neg} résiduelles (en vert sur les graphes Diva précédents), et les avons comparées aux T CD4⁺ de donneurs sains. Dans la cohorte 2, le chiffre moyen de T CD4⁺CD158k^{neg} est de 704/mm³ (écart-type = 755/mm³), pour des valeurs usuelles de T CD4⁺ comprises entre 447-1510/mm³. Nous avons exclu de cette analyse 5 patients présentant moins de 200 T CD4⁺CD158k^{neg}/mm³ (même critère quantitatif d'exclusion que pour les CS). On retrouve une répartition de maturation altérée chez l'ensemble des patients, avec des populations naïves fréquemment sous-représentées (chez 59%), tandis que les centrales mémoires sont sur-représentées chez 48% d'entre eux, par rapport aux valeurs usuelles établies chez les donneurs sains (*fig.22, annexes 4 et 7A*). L'expression de CD95 par les T CD4⁺CD158k^{neg} mémoires résiduels est comparable aux témoins (différence non significative), mis à part chez 3 patients où elle est effondrée de façon similaire aux cellules tumorales (*fig.22B*). L'étude de l'expression de CD7 et CD26, les deux marqueurs utilisés historiquement pour suspecter la présence de CS, montre que les populations T CD4⁺CD158k^{neg} expriment significativement plus fortement ces antigènes que les T CD158k⁺ ($p < 0,001$), mais souvent à des niveaux insuffisants (chez 31% des patients pour CD7, et 86% pour l'antigène CD26), considérés également comme pathologiques selon les critères de l'ISCL ($> 40\%$ de LT CD4⁺CD7⁻ et/ou $> 30\%$ de LT CD4⁺CD26⁻; paramètres non étudiés chez le sujet sain dans de mémoire) (*fig.22C*).

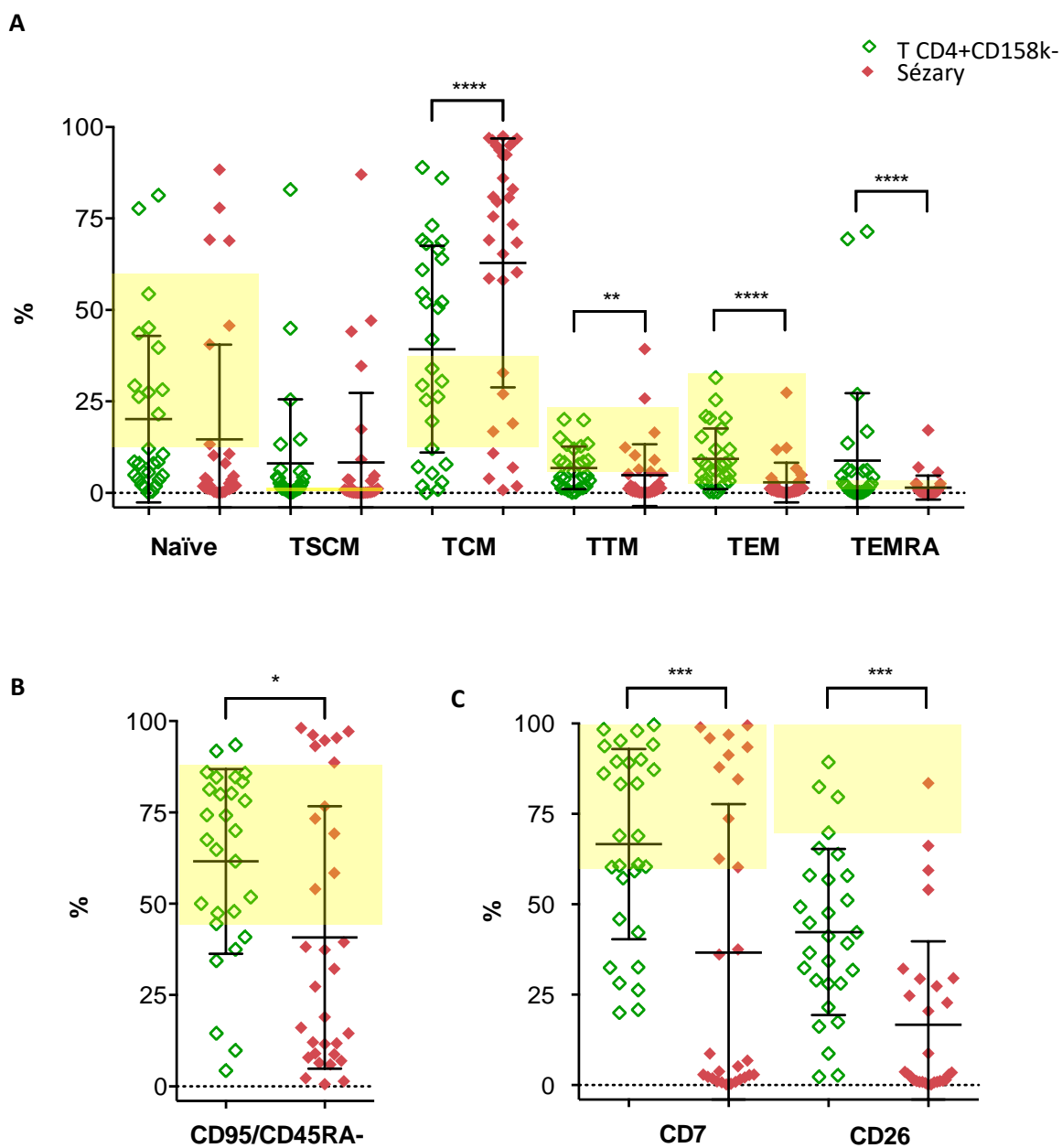


Figure 22 Phénotypes naïfs / mémoires des CS et des T CD4+CD158k- résiduels chez les patients de l' « étude PBMC congelées » (cohorte 2). En fond jaune l'intervalle de référence établi chez les sujets sains.

A. Répartitions comparées des populations circulantes T CD4+ tumorales et non pathologiques.

B. Expression de l'antigène CD95 par les cellules mémoires CD45RA-

C. Expression de CD7 et CD26, avec en fond jaune le seuil au-dessous duquel les valeurs correspondent aux critères pathologiques de l'ISCL

C.2.2. Étude des CS cutanées (cohorte 3)

Par opposition au milieu sanguin, les types de CS prédominantes dans la peau sont les TTM (médiane à 39% sur l'ensemble des patients) et TEM (28%). Les TEMRA sont parfois en proportion importante (jusque 40%) (*fig.23A*). Ces populations sont globalement toujours en association chez un même patient (*annexe 5* et exemple *fig.24*), ce qui est le cas également des T CD4⁺ extraits à partir de 3 échantillons de peau saine (*tab.7*). On peut observer parfois chez les patients une population significative de CS CD45RA^{neg}CCR7⁺CD27^{neg} (*annexe 5*), non précédemment décrite dans la littérature. Ces dernières ainsi que les TCM, présentes à plus de 10% chez cinq de nos patients, expriment CCR7, ce qui pourrait impliquer une dissémination de ces CS cutanées vers le sang et les ganglions.

CD95 est globalement bien exprimé par les CS cutanées CD45RA^{neg} (médiane à 77,5%, versus 67% pour la peau saine) (*fig.23B* et *tab.7*).

La confrontation des données permet d'apprécier les grandes hétérogénéités inter- et intra-individuelles de la répartition des populations naïves/mémoires de CS, de types distincts dans le sang et la peau, où elles paraissent plus matures.

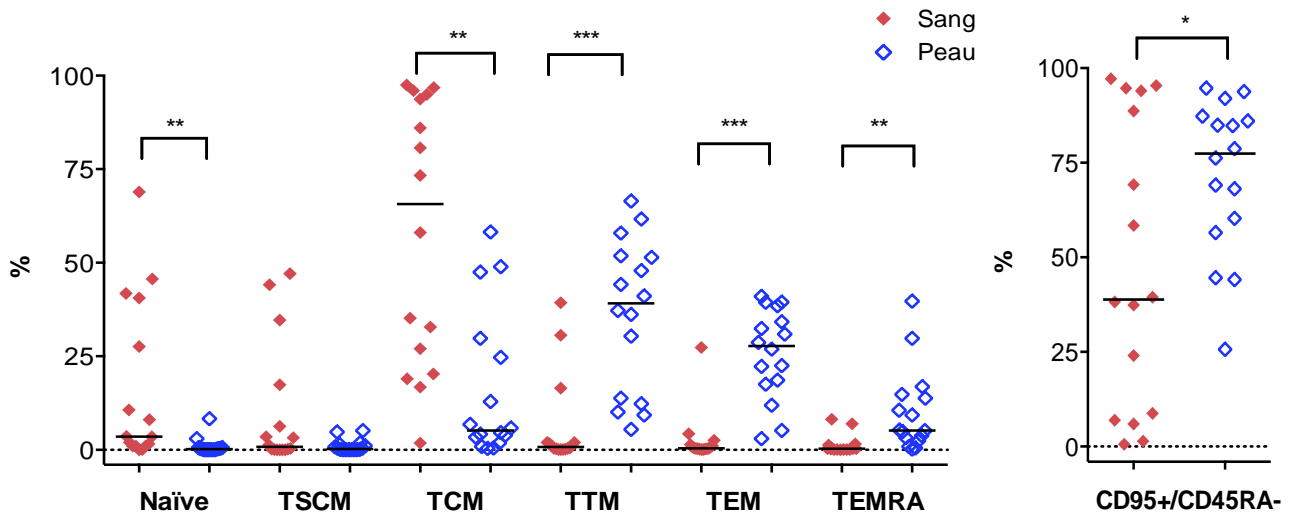


Figure 23 A. Répartition des populations CS naïves / mémoires dans le sang et la peau des patients biopsiés.
B. Expression de l'antigène CD95 par les CS cutanées mémoires CD45RA-

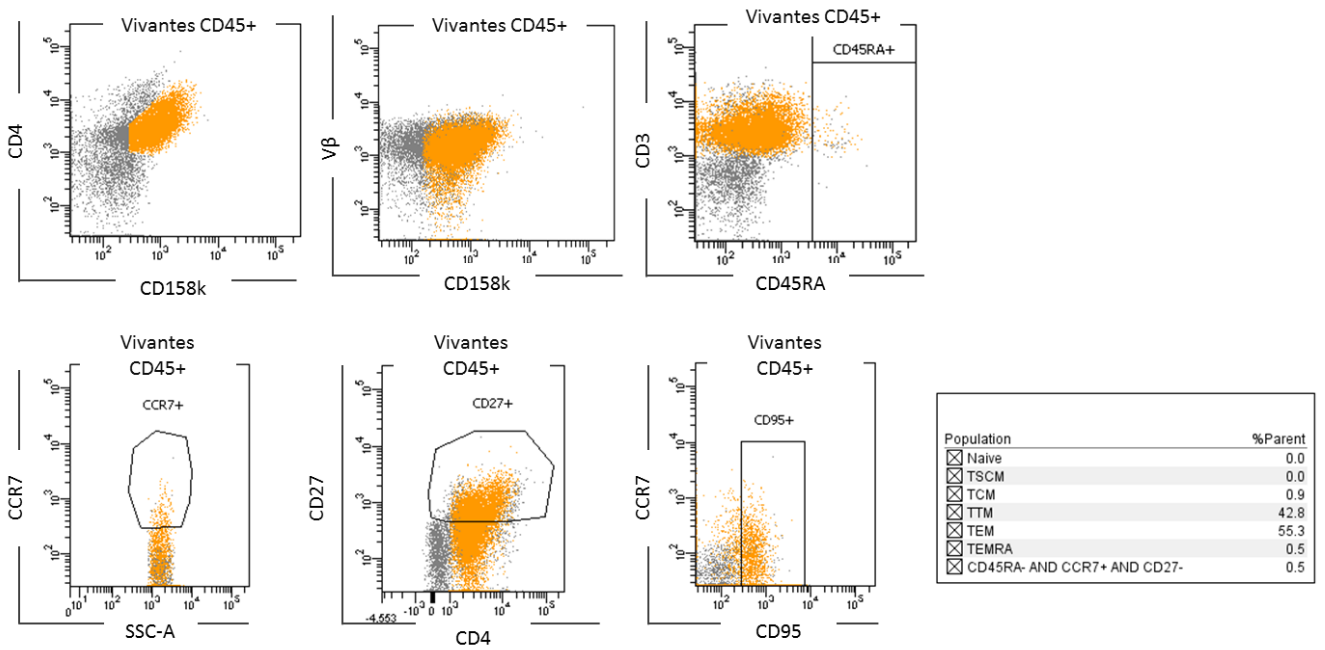


Figure 24 Exemple représentatif de marquage dans la peau (MOTM35).

4% des lymphocytes CD4⁺CD158k⁺ sont Vβ. L'analyse étant plus complexe dans la peau, chaque marqueur a été analysé sur un graphe, et les populations ont été déterminées par les intersections correspondant à leur définition.

	% TN	% TSCM	% TCM	% TTM	% TEM	%TEMRA	%CD95+ /CD45RA-
Médiane	0	0	9,3	10,2	65,1	6,1	66,9
Intervalle	0-0,3	0-0,3	5,6-10,4	7,8-16,3	36,8-76,1	5,6-9,3	38,9-85

Tableau 7 Répartition des populations CS naïves / mémoires sur 3 échantillons cutanés sains

C.2.3. Cas particulier de patient complexe

MOTM35, patient de 80 ans ayant reçu 9 lignes de traitement pour un SS de stade IVa1 au diagnostic, est celui présentant la plus grande diversité au sein de la population de CS. La figure 25 présente l'immunophénotypage des CS en novembre 2015.

Parmi les lymphocytes CD158k⁺, après exclusion des cellules NK, trois populations sont individualisables en fonction des marqueurs CD4 et CD3 (*fig.25*) : une population majoritaire (71%) CD3⁺CD4⁺, accompagnée d'une population CD3⁺CD4^{neg} (28% des CS) et d'une dernière minoritaire CD3^{neg}CD4^{neg} (0,3%). Elles expriment bien toutes trois le TCR Vβ22. Les CS CD4^{neg} sont des doubles négatives CD8^{neg}. Ceci correspond probablement à une perte aberrante de marqueurs T. L'étude de CD45RA, CCR7, CD27 et CD95 sur les deux populations principales est récapitulée dans le tableau 8.

Au contraire, dans la peau, ce patient présente des CS CD158k⁺ de phénotype homogène, CD3⁺CD4⁺CCR7⁻CD27^{+/-}CD95⁺, correspondant à des TTM et TEM (précédemment montré *fig.24*).

CD3+CD4+ (71%)		CD3+CD4- (28%)	
Expression de CD45RA hétérogène (continuum) 41% CD26-, 97% CD7-		Quasi-exclusivement CD45RA- 39% CD26-, 99% CD7-	
CD45RA- (83%)	CD45RA+ (15%)	CD45RA- (99%)	CD45RA+ (1%)
TCM - populations hétérogènes CD27+ et CD27low - CD95low	TN	TCM - populations hétérogènes CD27+ et CD27low - CD95low	TEMRA

Tableau 8 Répartition phénotypique des sous-populations de CS circulantes de MOTM35

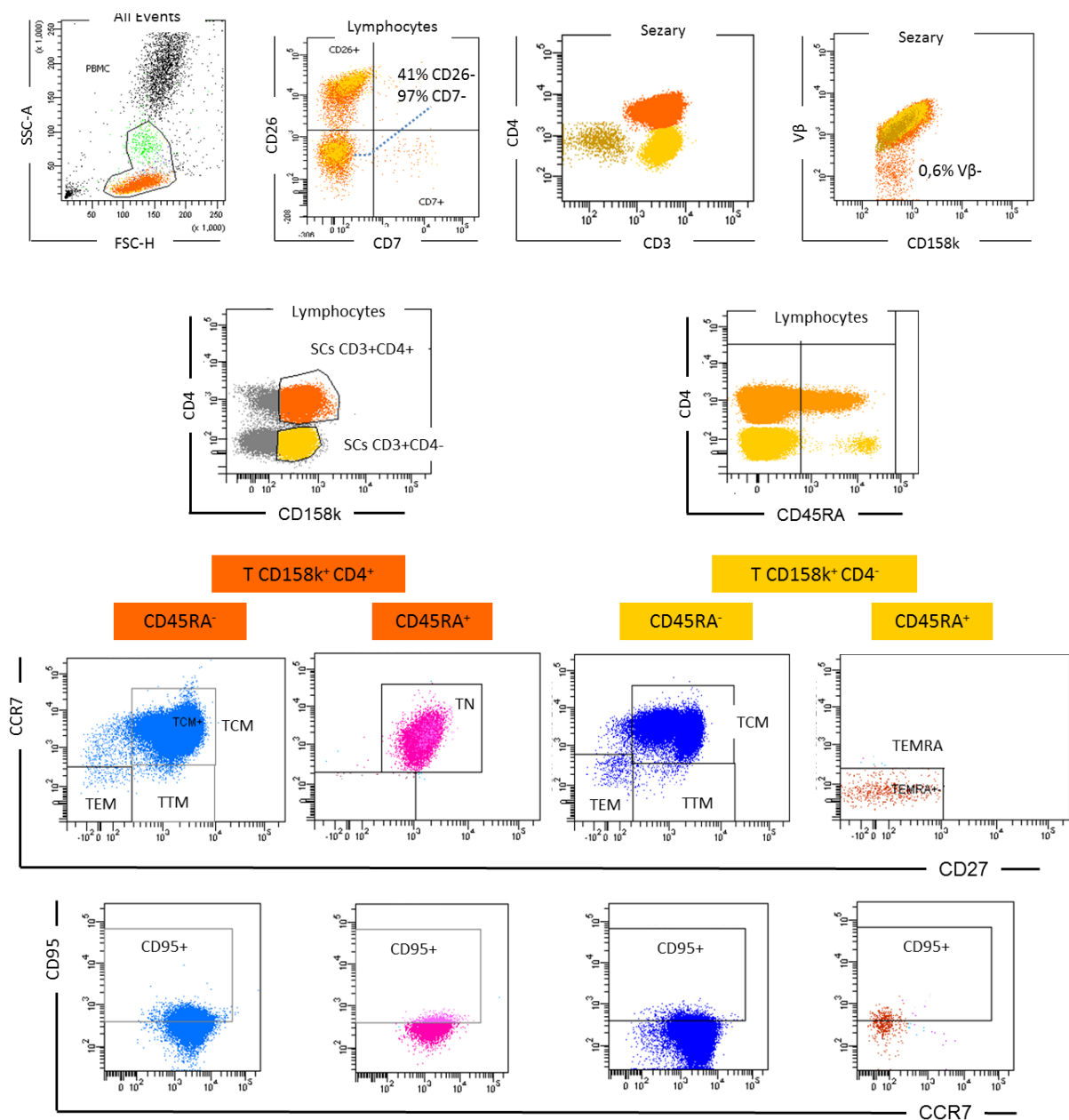


Figure 25 Immunophénotypage des CS sanguines de MOTM35 (novembre 2015)

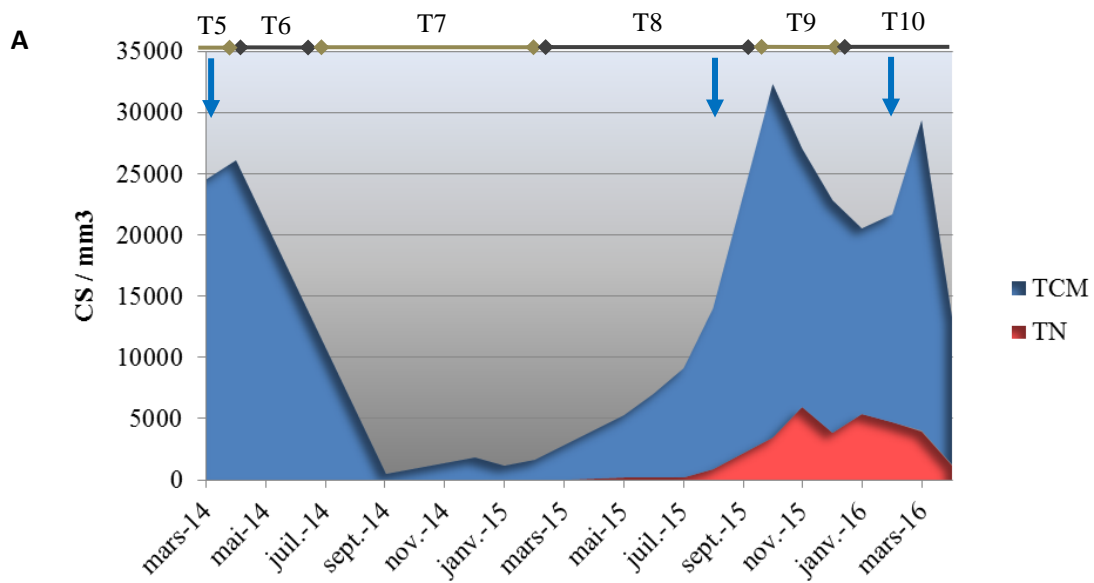
C.2.4. Suivi longitudinal des CS circulantes

Depuis mars 2014, 23 patients ont été suivis au laboratoire d'immunologie cellulaire de l'Hôpital Saint-Louis avec au moins 200 CS / mm³ de sang pendant plus de 6 mois (*annexe 6*). Nous avons pu apprécier une relative stabilité des phénotypes des CS naïfs / mémoires obtenus par rapport aux résultats au diagnostic. Néanmoins certains nouveaux phénotypes peuvent émerger, en particulier lors des phases de prolifération tumorale. Voici quelques exemples :

- **MOTM35 :**

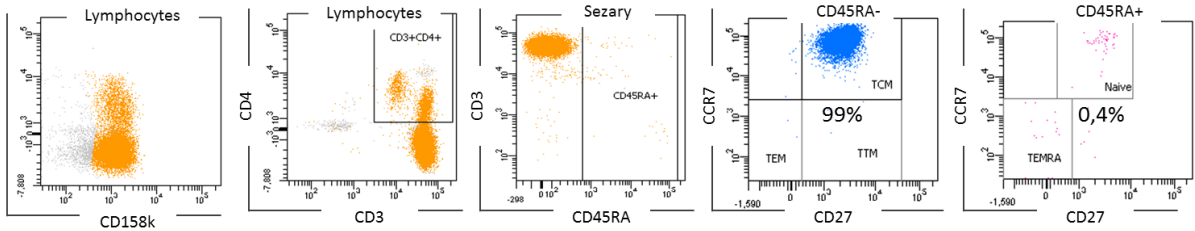
Le diagnostic date de juillet 2012 (4496 CS/mm³ estimées à l'analyse cytologique du frottis sanguin), et le premier phénotype à l'aide de l'anticorps anti-CD158k en mars 2014 retrouve 24 720 CS/mm³ exclusivement de type TCM, avec une population CD3⁺CD4^{neg} principale, accompagnée de CS CD3⁺CD4⁺ et CD3^{low}CD4⁺ (*fig.26*).

La complexité exposée dans le paragraphe précédent n'intervient que secondairement, dans le courant de l'année 2015. Une population de phénotype naïf apparaît alors progressivement, ainsi qu'une plus forte expression de CD27 parmi la population TCM, parallèlement à une expansion des cellules tumorales sous étoposide – ifosfamide au cours de l'été 2015. Les CS CD3⁺CD4⁺ deviennent prédominantes.

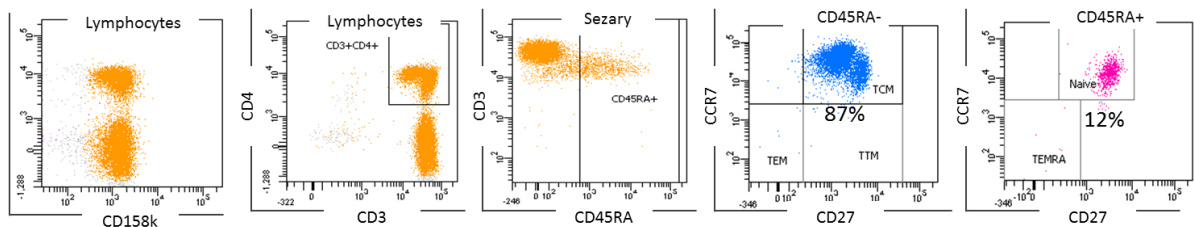


B

Mars 2014



Août 2015



Février 2016

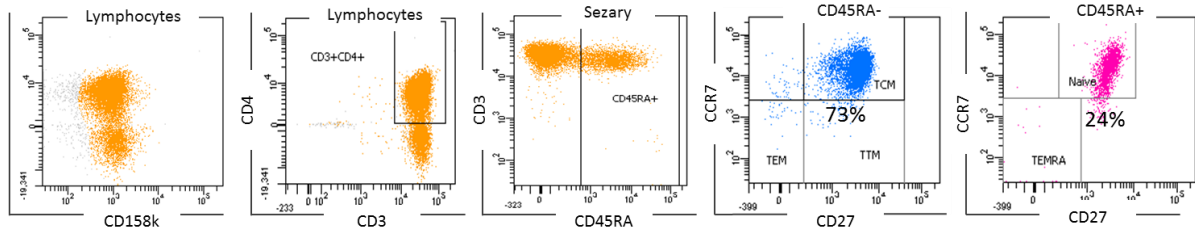


Figure 26 Evolution du phénotype des CS circulantes chez MOTM35

A. Graphique montrant la part des T naïves et TCM dans le pool de CS, la valeur absolue /mm³ correspondant à la hauteur sous la courbe. Les tirets indiquent les lignes de traitement (T8 : 8^e ligne = étoposide + ifosfamide, T9 = gemcitabine + oxaliplatine), et les flèches les dates des exemples de phénotypes présentés en **(B)**.

○ **ULMG41 :**

Le diagnostic a été posé en octobre 2012, et le premier phénotype de mars 2014 retrouve 6890 CS/mm³ de sang. Elles sont de phénotype TCM assez franc, avec seulement 3% de CS CCR7^{low} correspondant plutôt à des TTM (*fig. 27*).

Au mois d'août 2014, en revanche, la population de CS connaît une phase d'expansion sous photothérapie extra-corporelle et gemcitabine, et on remarque l'émergence d'une population nette de TTM (30% des CS), d'abord proches du nuage en CMF des TCM, puis bien individualisées CCR7^{neg}. Elle représente jusqu'à 70% des CS en janvier 2015, parallèlement à une chute du nombre de CS et à une réponse clinique sous doxorubicine.

En mars 2016, une nouvelle phase de prolifération survient, associée à des CS de type TCM uniquement.

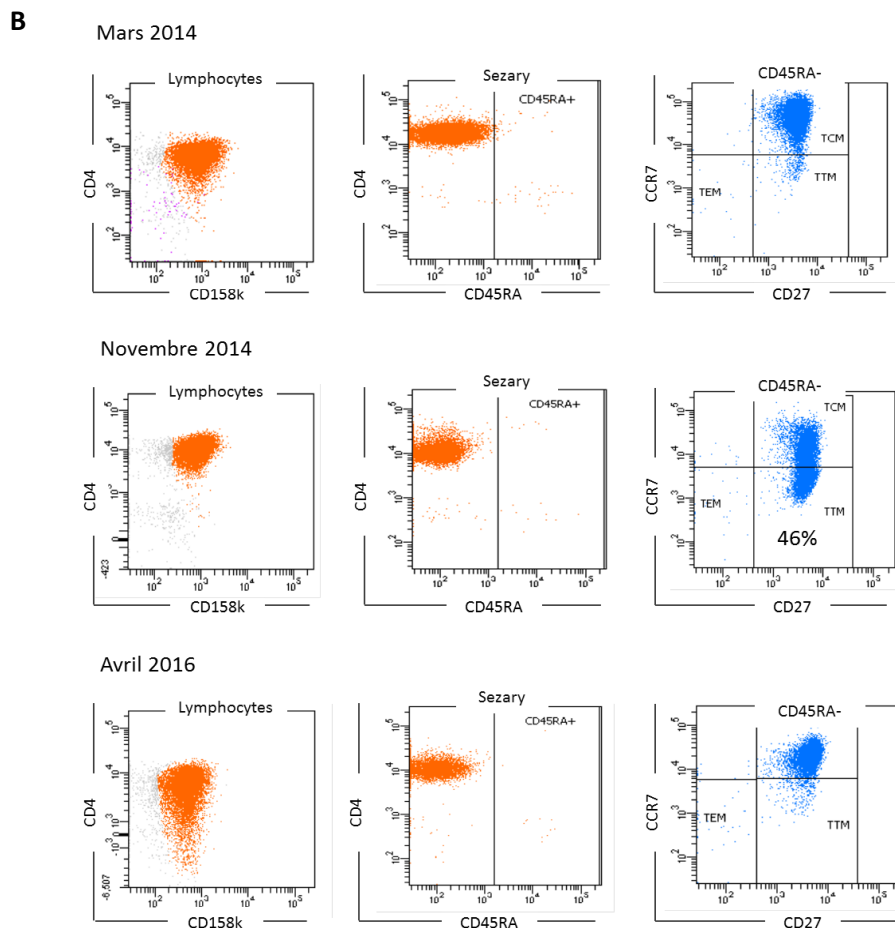
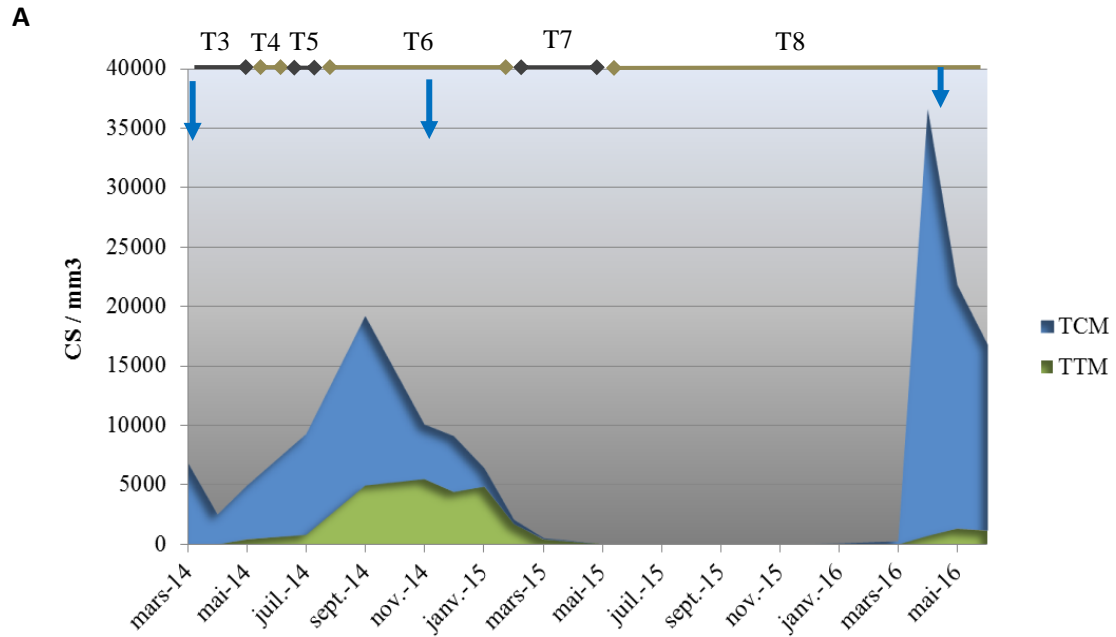


Figure 27 Evolution du phénotype des CS circulantes chez ULMG41

A. Graphique montrant la part des TTM et TCM dans le pool de CS, la valeur absolue / mm^3 correspondant à la hauteur sous la courbe. Les tirets indiquent les lignes de traitement (T4 : 4^e ligne = photothérapie extracorporelle, T5 = gemcitabine, T6 = doxorubicine liposomale, T7 = étoposide + ifosfamide), et les flèches indiquant les dates des exemples de phénotypes présentés en **(B)**.

Nous avons voulu ensuite comparer les CS mémoires, dont l'origine sanguine ou cutanée reste inconnue, avec les cellules T physiologiques de la peau, dont certaines, les TRM, sont connues pour présenter des propriétés distinctes des LT circulants.

C.2.5. Populations Sézary résidentes mémoires

Dans la peau, la plupart des CS expriment le marqueur de T résidentes mémoires (TRM) CD69 (médiane à 74% sur l'ensemble des patients), mais peu CD103 (10%) (fig. 28B et D). Dans le sang au contraire, CD69 est très peu exprimé. Le marquage CD103 est similaire à celui dans la peau (fig.28 B et C).

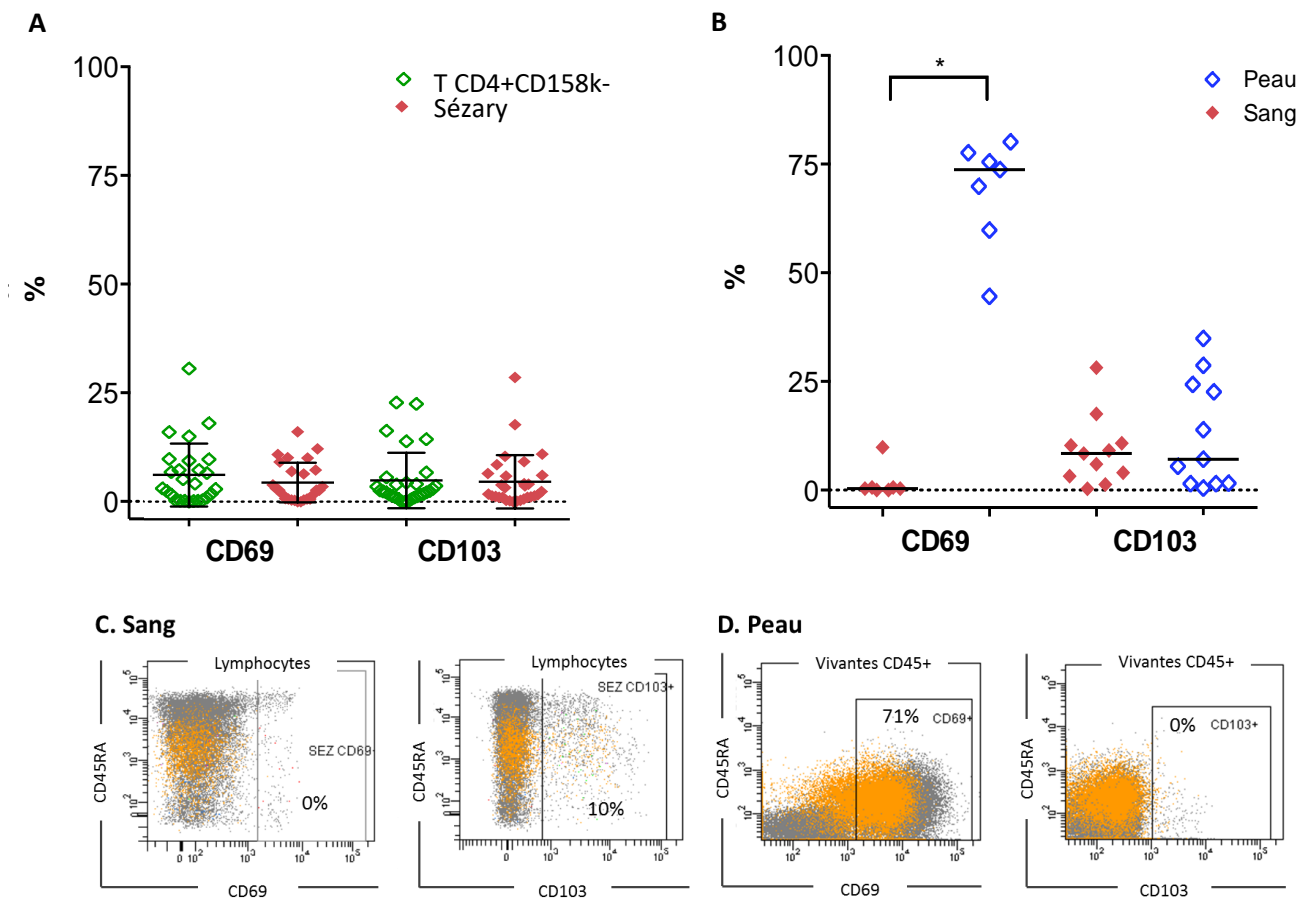


Figure 28 Expression des marqueurs de TRM

A. Etude « PBMC congelées » : comparaison entre les CS circulantes et les T CD4+CD158k- résiduelles.

B. Comparaison entre les CS circulantes et cutanées

Exemple représentatif de marquage CD69 et CD103 sur les CS sanguines (**C**) et cutanées (**D**)

Les deux biopsies de peau saine analysées sont également en faveur d'un marquage CD69 des lymphocytes T CD4⁺ prépondérant sur le marquage CD103 (exemple ci-dessous et *annexe 7*).

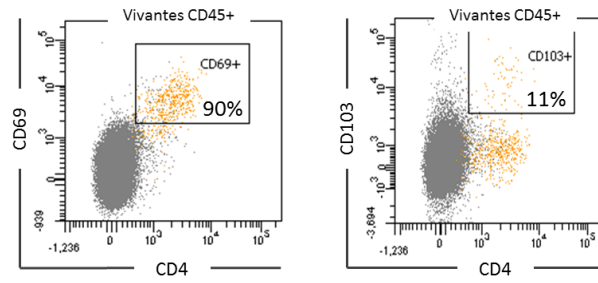


Figure 29 Exemple d'expression des marqueurs de TRM par les lymphocytes T CD4⁺ dans la peau saine

C.3. Expression par les CS des récepteurs de recrutement vers la peau

Les molécules de *homing* étudiées sont exposées dans le tableau suivant. Elles participent au recrutement des cellules T, endothéliales et dendritiques vers la peau durant la réponse inflammatoire.

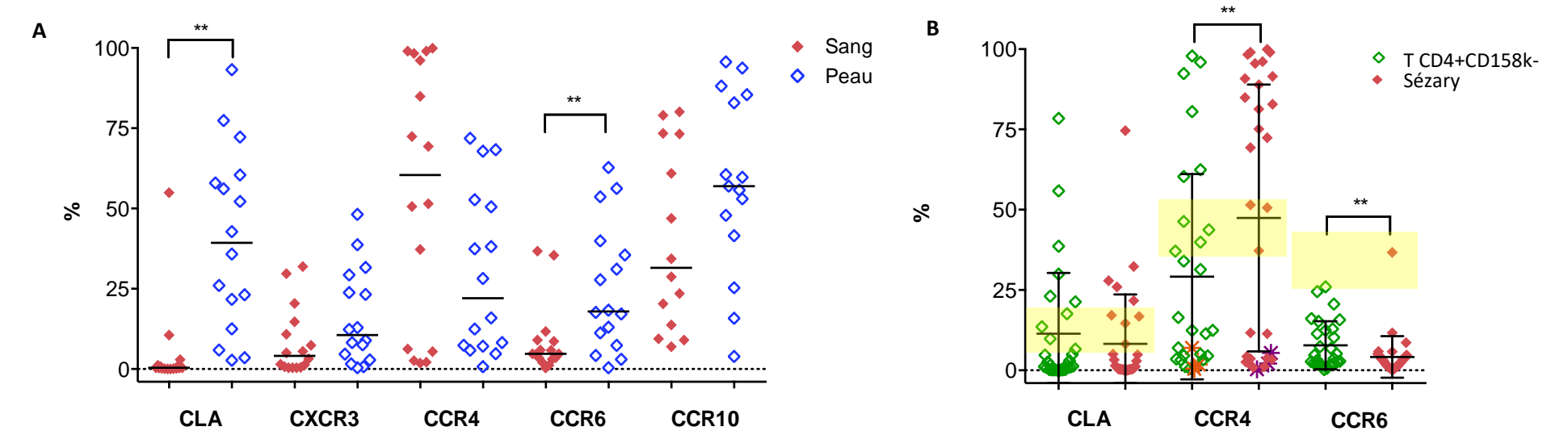
Récepteur	Ligand(s)
CLA	E-sélectine
CXCR3	CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC), CXCL4
CCR4	CCL2 (MCP-1), CCL4 (MIP-1), CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC), CCL22 (Macrophage-derived chemokine)
CCR6	CCL20 (MIP-3 α)
CCR10	CCL27, CCL28

Tableau 9 Récepteurs de chimiokines / sélectines étudiés et leurs ligands

La figure 30 illustre que CLA et les récepteurs de chimiokines impliqués dans le tropisme vers la peau sont significativement plus exprimés par les CS cutanées ($p < 0,01$ pour CLA et CCR6), mis à part CCR4 qui semble plus exprimé dans le sang (médiane à 60% contre 22% dans la peau, différence non significative). Il est à noter que 3 patients de la cohorte 2 étaient sous anti-CCR4 (mogamulizumab) au moment du prélèvement, avec des valeurs $< 7\%$ pour l'antigène cible, à la fois dans le sang et la peau. Les données obtenues chez le sujet sain sont présentées dans l'annexe 7 (PBMC congelées et peau), excepté pour les marquages CXCR3 et CCR10, ininterprétables sur cellules décongelées.

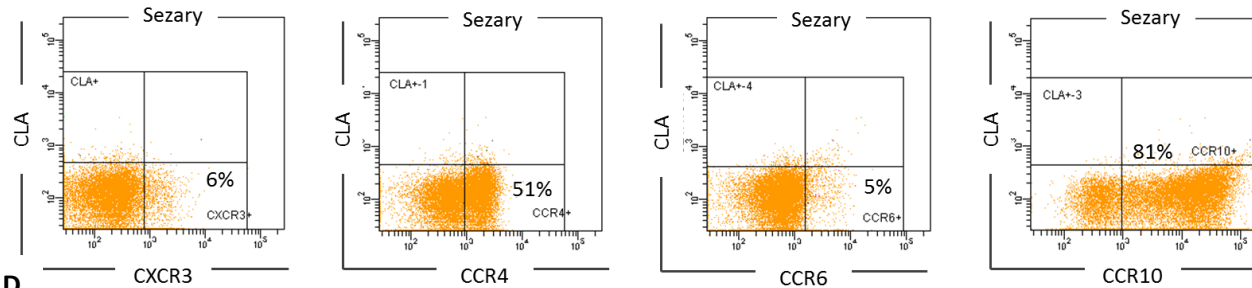
Dans le sang, CCR4 et CCR10 sont les plus exprimés à la surface des CS. On remarque une expression très hétérogène de CCR4 sur les CS circulantes, la plupart étant soit très positive, soit quasiment nulle, confirmé par l'étude complémentaire de la cohorte 2 (*fig 30B*). L'expression de CCR4 est très hétérogène mais généralement plus faible sur les T CD4⁺CD158k^{neg} résiduelles ($p < 0,01$), hormis chez une minorité. Il est à noter que les lymphocytes T CD4⁺ des sujets sains expriment CCR4 de manière plus homogène (intervalle de référence compris entre 36,5% et 56,8% - sur matériel congelé). L'expression de CCR6 est faible sur les CS comme sur les T CD4⁺CD158k^{neg} circulantes. On peut noter que CLA, CCR4 et CCR6 sont globalement significativement moins exprimés sur les T CD4⁺CD158k^{neg} que sur les T CD4⁺ des sujets sains ($p < 0,001$).

Dans la peau, CCR10 est le plus souvent présent des marqueurs étudiés (médiane à 57%), suivi par CLA (39%), CCR4 (22%) et CCR6 (18%), avec des proportions très variables. Le marquage sur un échantillon de peau saine retrouve la même prédominance de ces deux premiers récepteurs (*annexe 7B*), mais serait à confirmer sur un plus grand nombre de prélèvements.



C

A. Sang



D

B. Peau

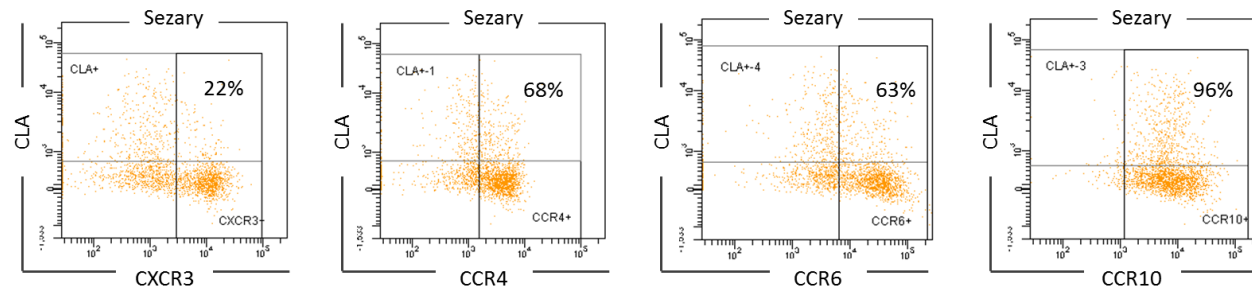


Figure 30 Expression des récepteurs des molécules d'écotaxie vers la peau.

A. Comparaison entre les CS sanguines et cutanées (n=16, sauf n=14 pour CCR10) (cohorte 3).

B. Comparaison entre les CS sanguines et les T CD4+CD158k- résiduelles (cohorte 2, marquages CXCR3 et CCR10 non fructueux sur PBMC congelées). En fond jaune l'intervalle de référence établi chez les sujets sains sur PBMC congelées. Pour le marquage CCR4, les patients sous thérapeutique anti-CCR4 sont symbolisés par un astérisque de couleur distincte.

Exemple représentatif de marquage sur les CS sanguines (**C**) et cutanées (**D**)

C.4. Expression des marqueurs d'activation et des récepteurs de cytokines

Nous avons d'autre part étudié des marqueurs d'activation tardifs comme CD25 et PD-1. CD25 (IL-2R α), est exprimé à la membrane cellulaire dans les 12-24h suivant l'activation du TCR, et permet l'assemblage d'un récepteur à l'IL-2 de haute affinité. PD-1 (« Programmed Death Receptor 1 ») est une molécule de costimulation négative, qui interagit avec ses deux ligands PD-L1 (B7-H1) et PD-L2 (B7-DC), pour exercer un rôle immunomodulateur en induisant et maintenant un état de tolérance. La surexpression de PD-1 et de ses ligands dans le micro-environnement tumoral constitue un mécanisme d'échappement à la réponse immune anti-tumorale (Pauken et Wherry, 2015).

Nos résultats montrent que CD25 est faiblement exprimé par les CS sanguines (médiane à 8% sur la cohorte 3) (*fig.31A*), comme par les T CD4⁺CD158k^{neg} (1,3%), en comparaison aux T CD4⁺ circulants frais de donneurs sains, qui sont à 46% CD25⁺ (32-59%, n=30 ; données du laboratoire). L'expression est plus forte sur les CS cutanées (37%), alors que les marquages sur deux échantillons de peau saine retrouvent 14% de LT CD4⁺CD25⁺ (*annexe 7B*).

PD-1 a une expression très variable sur les CS, en particulier dans le sang, avec une médiane élevée à 52% et des valeurs supérieures à 85% chez 5 patients (*fig.31A*), en comparaison à une valeur médiane retrouvée à 23% sur des populations de LT CD4⁺ mémoires frais de donneurs sains (17-45%, n=16 ; données du laboratoire). Elle est plus faible sur les LT CD4⁺CD158k^{neg} que sur les CS circulantes (cohorte 2 ; p<0,01) (*fig.31B*). L'expression de PD-1 est plus homogène sur les CS cutanées, avec une médiane à 50%. Les valeurs à 17% et 59% obtenues sur 2 échantillons de peau saine ne nous permettent pas de conclure pour le moment quant au niveau d'expression.

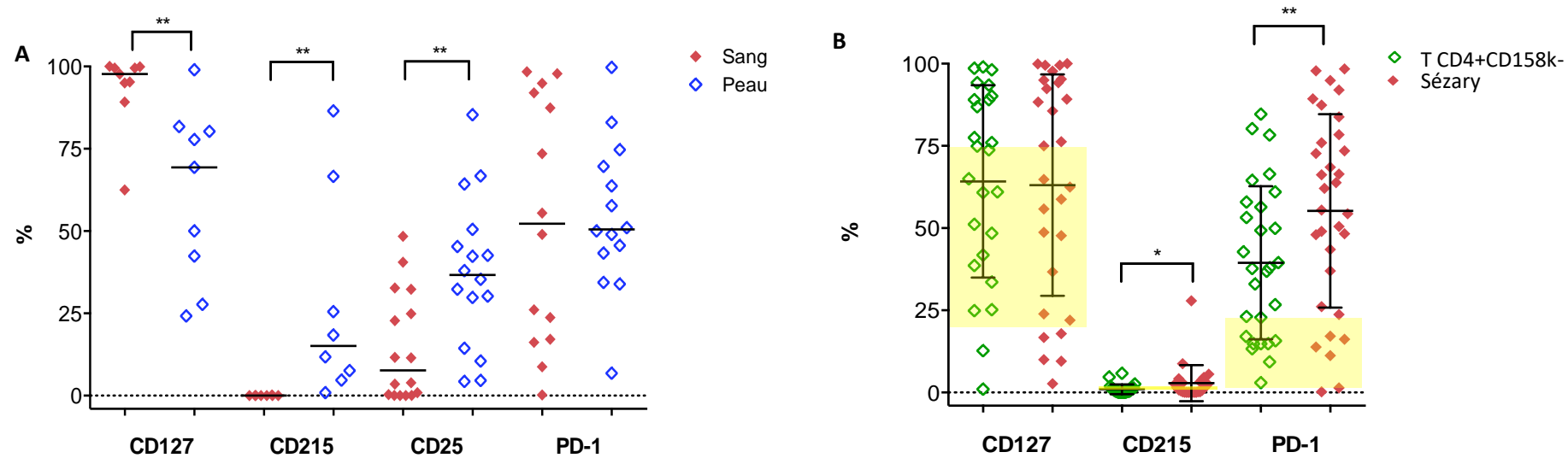
CTLA-4, marqueur d'activation précoce exprimé rapidement après activation du TCR, et également molécule de costimulation négative, a de plus été étudié chez 8 patients sur sang frais (marquage intra-cellulaire), où nous avons trouvé de faibles niveaux d'expression (médiane à 6,7% sur les CS, avec écart-type = 17,5%), comparables à ceux de LT CD4⁺ mémoires frais de donneurs sains (médiane à 5,6%, 2,9-10,2%, n=11 ; données du laboratoire).

Afin de commencer à appréhender leur comportement en culture pour des expériences ultérieures, nous nous sommes intéressés à l'expression des récepteurs d'interleukines impliquées dans la croissance des CS, en particulier les sous-unités IL-2R α (CD25), IL-7R α (CD127) et IL-15R α (CD215) (*fig.13*).

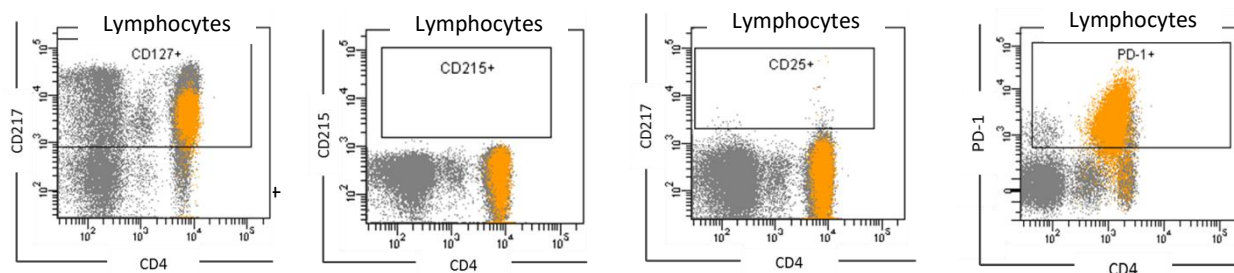
On observe une forte expression de CD127 par les CS circulantes comme cutanées (98% et 69% respectivement), ainsi que des expressions de CD25 et CD215 par une fraction des CS cutanées (37 et 15% respectivement), qui sont beaucoup plus faibles sur les CS sanguines ($p < 0,01$) (*fig.31A*).

L'étude sur PBMCs congelées (*fig.31B*) montre une forte expression de CD127 par rapport aux T CD4⁺ du sujet sain, sur les CS mais également sur les T CD4⁺CD158k^{neg} résiduelles ($p < 0,05$).

Par ailleurs, nous n'avons pas pour le moment dans nos cohortes, pu observer de CS de type Treg, CD25^{int/high} CD127^{low}, comme parfois évoqué dans la littérature (Krejsgaard et al., 2012).



C Sang



D Pe

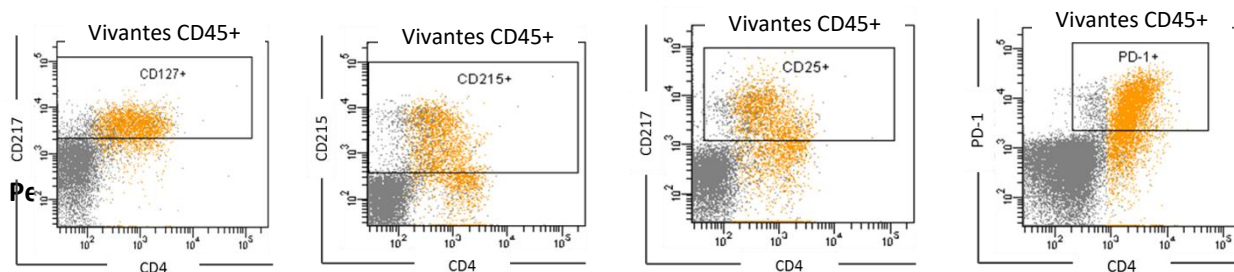


Figure 31 Expression des marqueurs d'activation et récepteurs d'interleukines

A. par les CS sanguines *versus* cutanées (CD127 : n=9, CD215 : n=8 ; CD25 : n=16 et PD-1 : n=14) (cohorte 3)

B. par les CS circulantes *versus* les T CD4+ CD158k- résiduelles (n=34) (cohorte 2 sur PBMC congelées ; marquage CD25 non fructueux). En fond jaune l'intervalle de référence établi chez les sujets sains sur PBMC congelées.

Exemple représentatif de marquage sur les CS sanguines (C) et cutanées (D).

PARTIE D : DISCUSSION

- **Intérêt de la molécule CD158k / KIR3DL2 en recherche et en pratique clinique dans le SS**

L'anticorps anti-CD158k / KIR3DL2 permet un accès aisé à l'analyse des CS en cytométrie en flux. La correspondance avec les marquages par l'anticorps anti-V β spécifique du clone isolé a pu être vérifiée chez certains patients, à la fois dans le sang et la peau, lorsque le clone était connu et l'anticorps disponible. Grâce à ce marqueur, il est maintenant aisé de caractériser les CS dans le sang et la peau, d'étudier leurs fonctions *in vitro* et de les isoler pour des investigations plus poussées d'analyse transcriptomique, métabolique, voire transfert dans des modèles animaux. En pratique clinique, cette découverte à l'hôpital Saint-Louis a non seulement eu un impact analytique pour le diagnostic et le suivi des patients, mais également thérapeutique, puisque une immunoglobuline IgG1 monoclonale humanisée anti-KIR3DL2 (IPH4102) a été développée et est actuellement en cours d'essai clinique de phase I sur notre site. Cet anticorps se distingue des immunothérapies précédentes par le fait qu'il cible plus spécifiquement les CS. Il agirait en recrutant les cellules NK et les macrophages, et permettrait d'éliminer les cellules tumorales par cytotoxicité et phagocytose dépendante des anticorps (ADCC et ADCP), respectivement (Marie-Cardine et al., 2014).

- **Quelle signification de l'hétérogénéité du profil naïf / mémoire des CS circulantes ?**

Nous retrouvons une grande hétérogénéité inter- et intra-individuelle du phénotype naïf / mémoire des CS circulantes, contrairement à l'étude de Campbell et al. (2010) qui décrivait les CS uniformément comme des TCM, CCR7⁺CD27⁺, tout en évoquant paradoxalement une expression variable de CD45RA. Le type TCM est effectivement le plus fréquemment rencontré, mais nous avons observé tous les cas de figure depuis qu'un suivi immunologique des patients Sézary est réalisé à l'hôpital Saint-Louis. La présence chez un même patient de plusieurs profils distincts d'état de maturation (par exemple CS naïves associées à des CS centrales mémoires), sont même aussi fréquentes parmi notre cohorte que la présence d'un seul phénotype défini. De plus, de telles sous-populations hétérogènes T CD4⁺CD158k⁺ peuvent également être mises en évidence par l'anticorps anti-V β de l'unique clone tumoral décrit en biologie moléculaire chez le patient, ce qui est un argument fort en faveur d'un seul clone tumoral aux facettes multiples, du moins sur le plan immunophénotypique.

L'origine des lymphomes T cutanés reste inconnue. L'hypothèse d'une stimulation initiale du clone par un superantigène, par exemple bactérien, a été évoquée mais jamais démontrée (Boursi et al., 2016; van der Fits et al., 2011). La mise en évidence de CS CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺ nous a interpellés, puisqu'un tel profil est évocateur de cellules T naïves. Dans cette étude nous avons pu différencier par l'expression différentielle de la molécule CD95 (Fas), les phénotypes TN des phénotypes TSCM. Or les TSCM sont douées de propriétés de prolifération et de multipotence (Gattinoni et al., 2011). Nagai et al., (2015) ont également rapporté des clones TSCM malins dans le lymphome à cellules T de l'adulte (ATL), autre néoplasie à cellules T, causée par le virus HTLV-1. Il a été montré dans cette pathologie que le clone TSCM est capable d'une part de s'auto-renouveler sur un mode de division lent, et d'autre part de donner des populations mémoires TCM et TEM lors de prolifération massive, constituant une véritable « cellule-souche cancéreuse », distincte des autres populations. Nous aimerions donc poursuivre cette caractérisation des CS par une étude fonctionnelle des différents sous-types de CS, en particulier naïfs et TSCM, afin d'apprécier si les phénotypes rapportés correspondent à des propriétés et origines différentes de ces cellules, ou bien à une simple expression ou perte aberrante de molécules de surface sans retentissement biologique. L'étude longitudinale à moyen et long terme chez 23 patients suggère une évolutivité modérée des profils naïfs / mémoires, avec des émergences / disparitions, ou possiblement différenciations de populations, en parallèle de rechute ou de la mise en place d'un traitement. Les différents types de CS pourraient donc être associés à des agressivités ou à des réponses thérapeutiques différentes. Dans notre cohorte, la grande disparité dans les lignes de traitement conduites nous empêche de rechercher toute corrélation entre populations Sézary et réponses cliniques.

L'étude des LT CD4⁺CD158k^{neg} résiduels circulants montre une répartition altérée des états de maturation, avec un défaut de cellules naïves chez près de la moitié des patients. L'expression de CD26 (dipeptidyl peptidase-4 ou DPP-4) est diminuée par rapport aux T CD4⁺ de sujets sains, et pourrait concorder avec le biais de polarisation des T helpers observée dans la maladie de Sézary, les Th2 et les Treg exprimant classiquement peu l'enzyme DPP-4, contrairement aux Th1 et Th17 (Willheim et al., 1997; Zhao et al., 2014). Nous constatons également une sous-expression de CD7 chez un tiers des patients, le rôle de CD7 dans la physiopathologie du CS étant par contre mal appréhendé. Nos observations sur les LT CD4⁺CD158k^{neg} résiduels suggèrent donc une perturbation de l'homéostasie lymphocytaire, non seulement quantitative mais qualitative sous pression du clone tumoral, et/ou de l'environnement cytokinique. Cela concorde avec l'appauvrissement du répertoire rapporté (Yawalkar et al., 2003), et mène à l'immunodépression des patients, responsable de la forte mortalité du SS.

- **Interactions entre les compartiments sanguins et cutanés du SS**

Les relations entre les deux localisations du clone tumoral sont mal connues. En parallèle des prélèvements sanguins, nous avons réalisé des biopsies cutanées chez 16 patients de phénotypes sanguins variés. Là aussi, contrairement au caractère constant central mémoire des CS sanguines et cutanées rapporté par les mêmes équipes (Campbell et al., 2010), nous constatons des profils différents de ceux vus dans le sang des mêmes patients. Néanmoins la répartition des CS cutanées est relativement homogène, entre les TCM, TTM, TEM et TEMRA. Au contraire, les phénotypes naïfs et TSCM n'ont quasiment pas été retrouvés. Dans la peau, les profils correspondraient donc à des états de maturation plus avancés que ceux des CS en circulation (*fig.32*). De plus, dans la peau les CS expriment des marqueurs de T résidentes mémoires (TRM), en particulier CD69, alors que nous n'avons pas d'argument pour considérer les CS circulantes comme des TRM. L'expression différentielle de CD69 entre les T circulantes et les TRM a déjà été montrée chez l'Homme (Sathaliyawala et al., 2013), alors que les TRM CD8⁺ sont rapportées plus fréquemment CD103⁺ que les TRM CD4⁺ (Turner et Farber, 2014). Cependant, CD69 est également un marqueur d'activation, ce qui ne permet pas d'affilier avec certitude les CS CD69⁺ cutanées à des TRM.

L'étude des molécules de *homing* vers la peau retrouve une expression en moyenne augmentée de CCR4 et CCR10 sur les CS circulantes (mais pas de CLA), suggérant une circulation rapide de ces cellules vers le tissu cutané. Dans le sang, une forte expression de CCR4 sur les CS en comparaison des autres molécules d'écotaxie, a déjà été rapportée dans la littérature (Campbell et al., 2010). Sugaya et al. (2015) rapportent un niveau d'expression de CCR4 dans la peau corrélé au stade de la maladie, et une expression de CXCR3 plutôt présente aux stades précoces. Ceci pourrait être le reflet de la transition d'un profil cytokinique Th1 vers un profil Th2 caractéristique du SS, CXCR3 étant exprimé préférentiellement par les cellules du premier type, et CCR4 du second. CCR10 serait quant à lui impliqué dans les stades tardifs de la maladie (Gonzalez et al., 2016). On remarque néanmoins une extrême hétérogénéité inter-individuelle, et parfois intra-individuelle, qui nécessiterait une analyse sur cytomètre multi-couleurs disposant d'un plus grand nombre de canaux, afin de confronter dans un même tube les récepteurs de chimiokines avec les marqueurs de maturation CD45RA/CCR7/CD27/CD95. Dans la peau, CCR6 et surtout CLA sont plus fortement exprimés que par les CS sanguines, avec également une forte positivité de CCR10 à la surface des CS cutanées. Un tel profil a été retrouvé chez des cellules T mémoires à tropisme cutané, produisant de l'IL-22 et dénommées Th22, qui ont été impliquées dans des pathologies dermatologiques variées, dont les CTCL (Duhon et al., 2009; Miyagaki et al., 2011). Au final, les CS circulantes et cutanées nous apparaissent donc également diverger sur le plan de la présence de molécules de recrutement vers la peau.

De nos observations nous pouvons dégager deux hypothèses :

- Soit la présence de cellules tumorales originaires du même clone V β , mais ayant divergé en fonction de leur site sanguin ou cutané, sans échange ultérieur entre les deux compartiments impliqués,
- Soit au contraire un modèle dynamique, avec la possibilité d'une plasticité des CS entre le sang et la peau, le phénotype du clone étant modifié au gré de la circulation entre les sites.

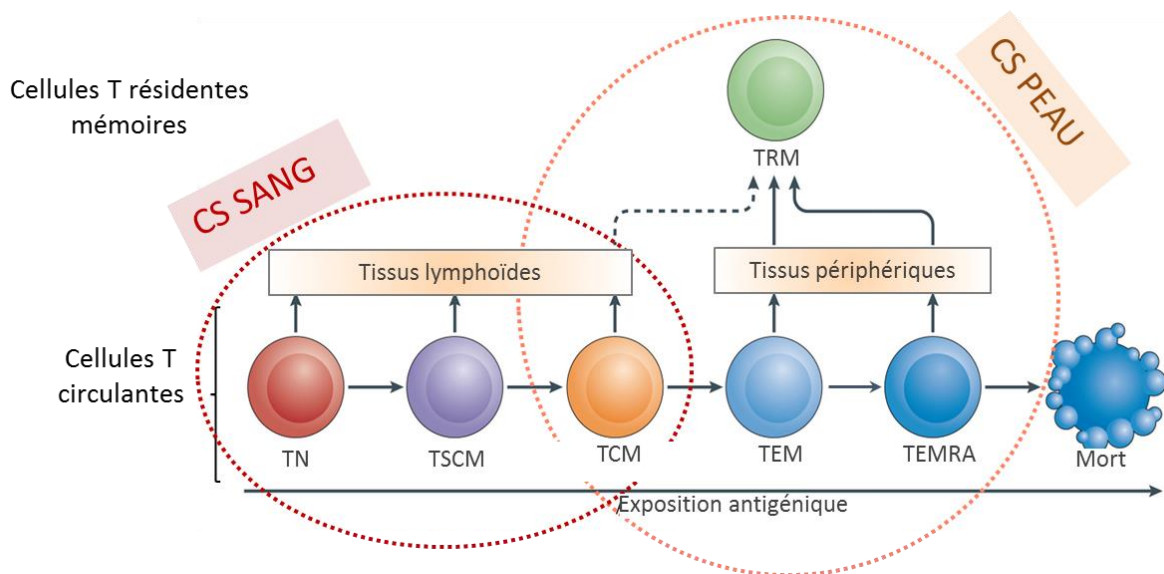


Figure 32 Schéma récapitulatif des états de maturation lymphocytaires T correspondant aux phénotypes des CS du sang et de la peau (adapté de Farber et al., 2014). Les CS circulantes sont très hétérogènes, et correspondent principalement à des TN / TSCM / TCM, alors que les CS résidentes sont exclusivement de type mémoire TCM / TEM / TEMRA.

○ Vie et mort de la CS

Nous nous sommes ensuite intéressés aux interactions des CS avec leur environnement, leurs mécanismes de prolifération restant obscurs. Nous retrouvons comme dans la littérature (Gonzalez et al., 2016; Talpur et al., 2006) des expressions importantes de CD25 et PD-1 sur les CS, en particulier cutanées. Le rôle d'une stimulation antigénique chronique dans un micro-environnement immunosuppresseur tumoral pourrait être évoqué, comme dans d'autres types de cancer (Pauken et Wherry, 2015), avec potentiellement la possibilité d'intervenir thérapeutiquement sur cette cible, encore peu décrite dans la maladie de Sézary.

Les CS ont également été rapportées comme des cellules répondant à l'IL-2, IL-7 et l'IL-15 (Hwang et al., 2008). Nous retrouvons principalement la présence en surface des CS sanguines comme cutanées, de la chaîne α du récepteur à l'IL-7 (CD127). Physiologiquement, une forte expression de CD127 à la surface des TEM et TCM est connue, IL-7 jouant un rôle dans l'homéostasie des cellules mémoires (Kondrack et al., 2003). Une étude après stimulation non spécifique *in vitro* pourrait peut-être permettre de mettre en évidence l'expression d'autres récepteurs aux interleukines. Mes premiers essais de culture cellulaire (non rapportés ici) n'ont pas montré de prolifération ni de différenciation des CS CD45RA⁺CCR7⁺CD27⁺CD95⁺ en réponse à l'IL-7 et l'IL-15 ou à l'activation par anti-CD3/CD28, contrairement aux TSCM de donneurs sains (Cieri et al., 2013; Lugli et al., 2013; Felix et al., données du laboratoire non publiées). En revanche l'expression des récepteurs CLA/CCR4 évolue. Les cellules restent vivantes et comme dans un état anergique. Aussi, l'analyse métabolique des sous-populations CS, à différents stades de différenciation naïf/mémoires est une approche que nous souhaiterions aborder. Il a été montré que l'engagement de profils métaboliques distincts affecte profondément la différenciation et la fonction des lymphocytes normaux (Buck et al., 2015) avec le passage, au cours de l'activation, de la phosphorylation oxydative à la glycolyse aérobie, phénomène connu dans les cellules tumorales sous le nom d'effet Warbug (Macintyre et Rathmell, 2013).

Une grande hétérogénéité avec une sous-, ou moins souvent une sur-expression de CD95 par les CS circulantes, a déjà été rapportée, les mécanismes sous-jacents pouvant être des mutations génétiques ou une hyperméthylation de promoteur (Jones et al., 2010). Ceci pourrait avoir une implication directe dans la tumorigenèse : CD95 (également nommé Fas ou APO-1) est un récepteur de mort cellulaire, et sa sous-expression pourrait contribuer à la résistance à l'apoptose caspase-dépendante des CS. Cependant, le rôle de CD95 en contexte oncologique n'est pas clair, puisque l'expression de CD95 et de son ligand CD95L par la cellule maligne semble stimuler la croissance tumorale (Chen et al., 2010). Cette dualité pourrait dépendre de la dose d'agoniste, une faible concentration de CD95L induisant une costimulation du complexe TCR/CD3 *in vitro* (Paulsen et al., 2011). Dans la peau, nous avons trouvé une expression plus homogène de CD95 par les CS.

Nos résultats amènent donc à de nombreuses questions, que nous souhaiterions explorer.

PARTIE E : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude retrouve une hétérogénéité inter- et intra-individuelle des phénotypes naïfs / mémoires des CS circulantes, non en miroir de ceux des CS cutanées. Les profils sanguins sont susceptibles d'évoluer lors des phases de prolifération, alors que dans la peau ils paraissent constants et plus matures chez notre cohorte. Nous avons également constaté des tableaux d'expression différents, entre le sang et la peau, sur les principaux récepteurs de chimiokines et d'interleukines décrits comme impliqués dans la maladie de Sézary. La question qui naturellement en découle est d'appréhender la signification de cette hétérogénéité.

Je poursuivrai cette étude avec les équipes du site de l'hôpital Saint-Louis au cours de mon année médaille de l'internat, puis d'une thèse de sciences. Le projet comporte pour le moment trois axes de recherche.

Une première approche fonctionnelle (en cours) est la réalisation du transcriptome des CS, après tri des 3 populations circulantes récurrentes que nous avons pu dégager (naïves, TSCM, et centrales mémoires). Elles sont comparées aux LT naïfs et mémoires de donneurs sains, dans le but de pouvoir apprécier si ces CS sont en mesure ou pas de correspondre à la définition conventionnelle de cellules immunitaires naïves ou mémoires.

Dans un deuxième temps, nous voudrions caractériser le comportement des différents types naïfs / mémoires, en particulier TSCM, par étude *in vitro* en culture cellulaire et suivi métabolique, en présence d'interleukines et de facteurs connus pour induire la différenciation des T naïves et TSCM en T mémoires (Cieri et al., 2013; Gattinoni et al., 2009). La mise en évidence ou pas d'une plasticité cellulaire *in vitro* permettrait de mieux comprendre les relations peau / sang de ces cellules tumorales *in vivo*, et potentiellement d'induire le développement de thérapies ciblées sur les cellules les plus agressives ou sur un éventuel réservoir tumoral.

Enfin, nous avons le projet de mise au point d'un modèle murin xénogénique de maladie de Sézary, actuellement aucun modèle stable n'étant disponible. Nous testerions quelle(s) sont les sous-population(s) greffable(s) et dans quel contexte, avec des perspectives d'étude *in vivo* des CS et l'acquisition d'un nouvel outil primordial pour le développement des thérapies futures.

Ainsi, à l'ère de l'utilisation des immunothérapies anti-tumorales et des traitements ciblés, une meilleure connaissance de la physiopathologie de ce syndrome permettra nous l'espérons, d'optimiser le suivi des patients traités et de choisir les meilleures approches thérapeutiques.

ANNEXES

Annexe 1 – Protocoles techniques

Annexe 2 – Cohorte 1 « étude Sang frais » - Numération des CS circulantes, pourcentages de cellules CD26⁻ et CD7⁻ parmi les lymphocytes T CD158k⁻, et sous-populations lymphocytaires T CD158k⁺ et T CD4⁺CD158k⁻ en fonction de leur état de maturation naïf / mémoire

Les patients étudiés également dans la cohorte 2 sont indiqués en fond vert ou jaune, tandis que ceux appartenant aussi à la cohorte 3 sont sur fond jaune.

Les sous-populations Sézary représentant plus de 10% des CS totales sont indiquées sur fond brique. A noter, les T naïves et les TSCM ne sont pas ici discriminées (antigène CD95 non étudié sur la cohorte 1), d'où l'appellation « pseudo-naïves ».

Annexe 3 – Cohorte 2 « étude PBMC congelées » - Caractéristiques cliniques des patients

Les patients indiqués sur fond jaune ont également bénéficié d'une biopsie cutanée, en plus du prélèvement sanguin à la date indiquée. Ils ont été intégrés à la cohorte 3.

IFN = interféron alpha, MTX = méthotrexate, PEC = photophérèse extracorporelle

Alemtuzumab = Campath[®] (anti-CD52), CHOP = Cyclophosphamide-doxorubicine-vincristine-prednisone (R-CHOP association au rituximab, anti-CD20), Bexarotène = Targretin[®] (rétinoïde), Mogamulizumab = anti-CCR4 (protocole Kiowa), Vorinostat = Zolinza[®] (inhibiteur des histones désacétylases), Romidepsine = Istodax[®] (inhibiteur des histones désacétylases)

Annexe 4 – Cohorte 2 « étude PBMC congelées » - Pourcentages des sous-populations lymphocytaires Sézary et T CD4⁺CD158k⁻ en fonction de leur état de maturation naïf / mémoire

Les sous-populations Sézary représentant plus de 10% des CS totales sont indiquées sur fond brique. Pour les T CD4⁺CD158k⁻ résiduelles et le pourcentage de cellules CD95⁺ parmi les CD45RA⁻, les chiffres en dehors des valeurs usuelles sont indiqués sur fond bleu pour les valeurs faibles, et sur fond rosé pour les valeurs fortes.

Annexe 5 - Cohorte 3 « étude Sang/peau » - Pourcentages des sous-populations lymphocytaires Sézary dans le sang et la peau en fonction de leur état de maturation naïf / mémoire

Les sous-populations Sézary circulantes et cutanées représentant plus de 10% des CS totales sont indiquées respectivement sur fond brique et sur fond jaune.

Annexe 6 - Cohorte 1 « étude Sang frais » - Suivi longitudinal des CS circulantes chez 23 patients issus de la cohorte 1, sélectionnés selon le critère de sélection de plus de 200 CS / mm³ pendant au moins 6 mois

Annexe 7 - Sujets sains

- A. Valeurs de référence établies chez 29 donneurs sains sur PBMC congelées. Intervalle correspondant à la moyenne +/- 2 écart-types.
- B. Valeurs obtenues sur des échantillons cutanés frais de 3 donneurs sains.

Annexe 1

A. Décongélation des ampoules de PBMC (cohorte 2)

Les ampoules sont décongelées rapidement au bain marie à 37°C, puis les cellules sont resuspendues dans du milieu RPMI.

Après deux lavages successifs dans du RPMI (5 min à 1200rpm à 20°), on incube avec de la DNase, 30 minutes à 37°C afin d'éliminer les débris cellulaires.

Après un nouveau lavage en RPMI, le culot sera mis en suspension dans du tampon PBS/SVF 5% (100 µL par tube de marquage, environ 200 000 cellules /tube). On peut ensuite procéder au marquage (C).

B. Extraction cellulaire à partir d'une biopsie de peau (cohorte 3)

Dans une petite boîte de Pétri, couper la biopsie en petits fragments (pince et scalpel stériles), dans 0,5mL de RPMI. Diluer 25µL de collagénase II (200mg/mL) (Sigma-Aldrich ; issue de *Clostridium histolyticum*, 0,5-5,0 unités FALGPA/mg, ≥125 CDU/mg) dans 2 mL de RPMI, et les mettre sur les fragments de peau. Incuber 30 min à 37°C.

Transférer dans un tube, centrifuger (5 min à 1500rpm), éliminer le surnageant. Laver dans 10mL de PBS/10mM EDTA. Reprendre dans 1mL de RPMI/10%SVF, et filtrer sur un filtre de 100µm.

Centrifuger le filtrat et reprendre le culot cellulaire dans du PBS/SVF 5% (1mL par tube), transférer dans les tubes de marquage. Centrifuger une nouvelle fois. Éliminer le surnageant, garder 100µL de volume pour procéder au marquage (C).

C. Marquage extracellulaire sur PBMC ou cellules cutanées extraites (cohortes 2, 3)

Ce protocole a été suivi pour la cohorte 2 (PBMC décongelées) et les biopsies cutanées de la cohorte 3, après extraction cellulaire.

On manipule dans la glace et à l'abri de la lumière.

Les anticorps sont ajoutés aux tubes de marquage contenant les cellules, aux volumes indiqués par le fournisseur. On incube 25 min à 4°C, à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées dans 1mL de PBS, et fixées pour conservation dans 150µL de PFA 2%.

D. Marquage extracellulaire sur sang total (cohortes 1, 3)

Ce protocole a été suivi pour la cohorte 1 et les prélèvements sanguins de la cohorte 3, sur des échantillons datant de moins de 48h.

On manipule dans la glace et à l'abri de la lumière.

Les anticorps sont ajoutés aux tubes de marquage contenant 100µL de sang total, aux volumes indiqués par le fournisseur. On incube 25 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les globules rouges du sang total sont lysés 10 min à l'aide du FACSTM Lysing Solution (BD Biosciences). Les cellules sont lavées dans 3mL de PBS puis fixées au PFA 2% (paraformaldéhyde) avant analyse.

Annexe 2

Patient	Date de prélèvement	T CD158k+ / mm3	% parmi les T CD4+		% parmi les T CD158k+				
			CD7-	CD26-	"pseudo-TN"	TCM	TTM	TEM	TEMRA
ARGP38	20/03/2014	5428	11,3	95,6	96,9	1	0,1	0	0,1
BATM55	30/05/2016	44976	26,6	98,2	85,6	9,7	0,6	0,1	0,2
BENN40	16/10/2014	1381	53,8	49,5	87,2	10	0,8	0,8	0,5
BIBP37	12/05/2014	2285	25,6	77,9	93,7	1,3	0	0,4	1,8
BINH71	27/11/2015	6265	94	95,5	1,7	74,6	24,4	0,6	0,3
CERA45	24/04/2014	13344	97	99,7	97,3	0,5	0	0,1	0,1
CLED45	16/04/2015	12091	99	99,3	0,4	91,1	6	0,5	0,1
COIJ47	15/09/2014	710	3,1	90,5	56,5	38,5	0	0,8	0,4
COQE33	16/04/2015	292	0,4	97,3	0	84,6	0,8	7,7	5,4
DARM53	27/03/2014	508	63,9	78,3	83,6	10,4	0,1	0,2	0,3
DERJ46	03/12/2015	1387	3	91,5	81,1	5,2	0,8	0,5	2,4
DESI71	28/06/2016	2524	87,5	88	1,1	98	0,6	0,1	0,2
DESS55	19/05/2015	943	31	95	36,6	37,9	0,9	0,9	23,6
DIAA41	08/01/2015	253	10	96	2,6	52	31,9	7,1	4,6
DORM62	05/07/2016	415	15,3	43,1	24,8	62,5	0,3	0,1	0
FLAG43	05/10/2015	232	1,5	68	4,8	89,5	2,2	1,2	1
FOUC36	15/01/2015	255	5	74,3	52,1	18,3	2,1	1,6	3,4
FUCA69	09/05/2016	16668	99,3	99,6	0,2	97,3	1,5	0,3	0,1
GASM45	21/05/2014	5322	0,7	95,8	19,9	79,1	0,1	0,3	0
GOLM47	10/03/2014	1656	6,3	81,6	80	17,7	0,2	0,4	0,1
GRIM40	26/05/2014	561	69,9	86,1	29,5	61,6	0,8	4,5	0,9
KASY32	05/03/2015	1641	27	75	2,7	79,7	2,3	1,8	0,9
KOUA40	16/06/2014	329	74,8	82,4	7,3	62,9	25,8	0,9	0,7
KRER35	07/05/2015	381	64	72	14,4	75,1	0,5	7	2,7
LAHA56	23/11/2015	3118	37	73	1,6	96	0,4	0,6	0,3
LESC45	07/03/2014	2968	9,8	90,8	91,8	4,6	0,1	0,2	0,2
LEBJ59	18/09/2014	2423	90,1	97,9	95,7	3,1	0,1	0,1	0,6
LECD48	01/06/2015	28280	96,7	58	0,2	96	0,3	1,1	2
LENJ40	27/03/2015	203	70,7	62	35,1	42,5	0,8	2,7	1,9
LONA49	06/11/2014	2959	4	64	6,1	92,6	0,3	0,5	0,1
MANF85	24/11/2014	314	30	14,4	35,5	39,5	5	12,7	5,7
MARCS4	11/02/2016	5312	94	95	0,9	98,1	0,2	0,1	0,2
MEUJ44	10/07/2014	608	71,7	73,1	3,7	42,7	46,3	8,2	0,7
MOTM35	14/03/2014	24723	96,2	96,6	0,3	99,1	0	0,1	0,1
OUZH76	27/05/2014	312	59,1	71	0,6	88,4	1,3	2,8	4,6
PATF64	03/03/2015	6471	97,2	97,4	85,6	13	0,1	0,1	0,3
PIOB80	14/05/2014	244	75,9	83,9	5,9	85,5	5,3	0,5	1,7
POMG48	26/10/2015	299	52,8	80,6	61,1	32,5	0,8	1,4	2,5
POPG43	14/04/2014	3686	95,9	66,7	0,4	88	4,7	0,9	0,3
QUIG51	12/03/2014	14802	98,1	99,1	0,3	76,8	24,3	0,4	0,4
RA VF60	16/04/2014	19583	98,7	98,9	0,2	69	30,8	0,4	0,2
RUBL38	29/04/2014	1743	91,6	63	41,6	53,8	0,6	0,3	0,6
SAMM53	07/09/2015	468	82	74	81,6	9,9	0,2	4,3	2
SAMP30	02/06/2014	510	38,2	17,1	77	9,1	1,8	4,2	2,3
SEMF36	26/06/2014	13826	0,3	51	8,6	89,6	0,2	0,6	0,3
SIWX58	19/05/2015	2233	85,2	86	3,5	94,8	0,5	0,5	0,5
STAD28	07/11/2014	8693	63	94	0,3	96,3	1,6	0,6	0,2
SYLM40	03/07/2014	207	15	43,9	13	16,5	3,6	13	45,9
SYLN27	18/03/2015	256	30	68	67,4	21,2	0,8	1,2	3,7
TETC49	12/03/2014	205	86,4	97,5	71,6	21,3	0	0,9	0,9
TIRD53	14/04/2014	1684	1,7	87,6	2	95,4	0,8	0,8	0,6
ULMG41	14/04/2014	6889	98,2	98	0,4	97,5	1,5	0,3	0,1
VOIM42	03/07/2015	9870	82	99,4	8,1	83	4,4	0,4	0,2

Annexe 3

Patient	sexe	âge	Date de diagnostic	Date de prélèvement	Stade TNMB	Traitements reçus jusqu'à la date de prélèvement
BIBP37	F	78	juillet 2013	19/11/15	IVa1	bexarotène
BINH71	M	44	décembre 2015	15/02/16	IVa1	bexarotène + PEC
FOUC36	M	79	avril 2007	04/10/15	IVa1	IFN, PEC, MTX, mogamulizumab, bexarotène
GOLM47	M	68	juillet 2012	02/11/15	IVa1	MTX, PEC, IFN, bexarotène
KOUA40	M	75	septembre 2011	12/10/15	IVa1	MTX
LECD48	F	67	juillet 2005	18/11/15	IVa1	IFN, bexarotène, CHOP, gemcitabine, etoposide-ifosfamide, vorinostat
MANF85	M	30	décembre 2015	28/12/15	IVa1	PUVA, bexarotène
MEUJ44	F	71	juin 2010	03/02/16	IVa1	PUVA, bexarotène, MTX, doxorubicine, gemcitabine, brentuximab, PEC
MOTM35	M	80	juillet 2012	26/11/15	IVa1	gemcitabine, MTX, PEC, bexarotène, vorinostat, doxorubicine, romidepsine, etoposide-ifosfamide, gemcitabine-
RUBL38	F	77	mai 2008	07/10/15	IVa1	MTX, IFN, bexarotène, gemcitabine, doxorubicine, alemtuzumab, vorinostat, mogamulizumab
SAMM53	M	62	septembre 2013	01/02/16	IVa1	IFN, bexarotène, PEC
SAMP30	M	85	janvier 2012	07/10/15	IIB	bexarotène
SIWX58	M	57	juin 2015	25/01/16	IVa1	bexarotène, PEC
STAI28	F	87	novembre 2014	10/03/16	IVa1	bexarotène, MTX
SYLN27	F	88	février 2015	19/08/14	IVa1	bexarotène, gemcitabine
TIRD53	F	62	août 2010	09/10/15	IVa1	IFN, bexarotène, PEC, MTX, doxorubicine, vorinostat, mogamulizumab
VOIM42	F	73	juillet 2015	03/11/14	IVa1	CHOP
ARGP38	M	76	novembre 2010	02/06/14	IVa1	PUVA, bexarotène
CERA45	M	69	février 2011	24/04/14	IVa1	IFN, bexarotène, gemcitabine, doxorubicine
CLED45	M	70	septembre 2008	16/04/15	IIB	radiothérapie
COIJ47	F	67	mai 2011	30/06/14	IVa1	bexarotène, PEC, IFN, carmustine locale
COQE33	F	82	avril 2014	16/04/15	IVa1	MTX
FLAG43	M	72	janvier 2012	05/10/15	IVa1	IFN
GASM45	F	69	décembre 2007	12/06/14	IVa1	MTX, bexarotène, doxorubicine, mini-CHOP, gemcitabine
KASY32	F	83	novembre 2014	05/03/15	IVa1	bexarotène, PEC
KRER35	F	80	octobre 2013	07/05/15	IVa1	MTX, bexarotène
LONA49	M	65	juin 2005	06/11/14	IVa1	IFN, PEC, MTX, bexarotène
MARC54	F	61	mai 2011	11/02/16	IVa1	bexarotène, PEC, MTX, IFN
OUZH76	M	38	juillet 2013	27/05/14	IVa2	MTX, CHOP
PATF64	F	51	septembre 2015	03/03/15	IVa1	MTX, PEC, bexarotène, gemcitabine
PIOB80	F	34	janvier 2012	14/05/14	IVa1	IFN, PEC, bexarotène, mogamulizumab
POPG43	F	71	juin 2013	14/04/14	IVa1	MTX, bexarotène, PEC
SEMF36	F	78	janvier 2014	23/10/14	IVa1	mini-CHOP
ULMG41	M	73	octobre 2012	24/04/14	IVa1	MTX, CHOP

COHORTE 2+3

Annexe 4

Patient	CS/mm3	CD4+ CD158k-		CD4+ CD158k-		CD4+ CD158k-		CD4+ CD158k-		CD4+ CD158k-		CD4+ CD158k-		CD4+158k- / CS /	
		/ % TN	/ % TN	/ % TCSM	/ % TCSM	/ % TCM	/ % TCM	/ % TTM	/ % TTM	/ % TEM	/ % TEM	/ % TEMRA	/ % TEMRA	% CD95+ parmi les CD45RA+	
ARGP38	4537,0	28,2	77,9	2,9	0,9	2,9	6,9	12,7	0,8	20,4	1,4	16,8	5,6	83,4	12,1
BIBP37	422,0	81,3	40,6	14,6	47,1	0,9	1,8	0,2	0,1	0,3	1,4	2,1	0,6	50	97,2
BINH71	480,0	39,7	1,6	4,3	0,1	29,4	58,1	13,2	39,3	8,7	2,6	0,7	0,5	78,2	1,4
CERA45	13344,0	4,8	4,1	82,9	87	0	0,8	1	0,1	2,9	0,1	4,8	2,5	80	96,2
CLED45	12091,0	0	0,3	2,7	0	12,1	68,4	20,1	25,8	31,5	4,1	6	0,2	80,2	2,2
COIJ47	313,0	/	13,3	/	1,2	/	65,3	/	9	/	6,7	/	2,4	/	11,6
COQE33	292,0	8,4	0,3	0,8	0,2	88,9	97	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	4,3	9
FLAG43	232,0	5,6	1,4	0,8	0,5	73,1	79,6	8,9	10,3	6	4,9	1	0,5	9,8	7,9
FOUC36	219,0	/	41,8	/	6,3	/	35,2	/	2	/	0,8	/	1,3	/	24,1
GASM45	12153,0	10,6	4,6	0	0,6	68,1	83	8,5	2,5	3,2	0,6	0	0,1	14,5	11,8
GOLM47	1747,0	29,3	45,7	25,4	34,7	30,5	16,8	3,8	0,4	5	0,4	0,6	0,3	70	58,4
KASY32	1641,0	2,2	0,9	1,3	3,7	1,8	60,3	2,8	5,3	17,6	12,3	69,4	17,1	84,7	76,6
KOUA40	337,0	/	1	/	0,2	/	80,7	/	16,5	/	0,5	/	0,3	/	37,4
KRER35	381,0	1,8	1,8	4,3	4,7	69,1	75,5	13,4	5,8	5,1	3,2	1,7	1,1	74,3	73,3
LECD48	14151,0	1,4	0	1	0	25,4	96,8	15,1	0,3	25,4	0,7	26,9	0,2	74,2	7
LONA49	2959,0	5,7	2	0,6	0,5	50,6	92,4	12	1,5	20,9	1,2	4,4	0,1	51,8	19
MANF85	347,0	4,9	68,9	1,1	3,3	5,3	19	4,6	0,1	8	0,4	71,4	7	67,5	6
MARC54	5312,0	12,1	1,3	1,1	0,1	68,7	95	8,3	1,3	4,7	0,8	2,5	0,2	34,4	27,3
MEUJ44	459,0	27,5	3,6	0,3	0,2	61	27	5,8	2	2,6	27,4	0,9	0,1	37,5	8,8
MOTM35	23313,0	43,6	10,7	1,2	1,3	41,9	86	5,8	0,2	6	0,3	0,5	0,3	61,6	38,2
OUZH76	312,0	21,5	2,6	5,9	0,8	7,8	69,1	19,9	12,4	11,9	11,8	13,6	0,6	84,6	14,5
PATF64	6471,0	77,7	69,2	6,4	9,1	7,1	10,8	1,1	1,5	0,2	0	0,1	0	44,5	32,2
PIOB80	244,0	/	10,2	/	0,3	/	80,9	/	5,1	/	0,6	/	2,6	/	6,4
POPG43	3686,0	3,8	0,2	0,2	0,1	52,2	58,6	4,3	1,6	7,8	2,9	0,2	0	93,5	98,1
RUBL38	1413,0	8,5	1	0,3	0	66,6	97,5	1,8	0,5	15,3	0,2	6	0,1	47,4	69,2
SAMM53	2166,0	/	88,3	/	3,7	/	3,9	/	0,8	/	2,9	/	1,2	/	54
SAMP30	45,0	60,7	27,6	1,1	0,4	6,5	20,3	15,8	30,6	6,8	4,3	8,4	8,2	65,5	94
SEMF36	27613,0	3,6	1,2	4	0,4	64	96,4	1,3	0,5	20,4	1,3	2,7	0	47,9	16,1
SIWX58	532,0	54,4	3,5	1	0	33,9	95	4,2	1,1	3,7	0,2	0,1	0,1	40,9	0,6
STAI28	5630,0	45,1	0,1	2,2	0	26,3	96	7,8	1,7	8,8	0,3	6,2	0	64,8	39,5
SYLN27	10952,0	8	8,1	45	44,1	19,6	32,8	0,6	0,4	11,9	0,1	1,8	1,6	85,7	88,7
TIRD53	1633,0	26,3	1	0,7	3,5	52,1	93,7	3,4	0,1	7,6	0,1	6,4	0,1	86	95,4
ULMG41	2518,0	0,4	0,2	1,6	0,1	86	92,1	8,8	6,4	1,6	0,7	0,4	0,1	91,8	93,2
VOIM42	5137,0	8,1	2	13,3	17,4	54,5	73,3	1,3	1,2	2,5	1,1	0,1	0,1	81,3	94,7

Annexe 5

Patient	Sang / Peau /		Sang / Peau /		Sang / Peau /		Sang / Peau /		Sang / Peau /		Sang / Peau /		Peau / % CD45RA- CCR7+ CD27-	Sang / Peau /	
	% TN	% TN	% TSCM	Peau /% TSCM	% TCM	% TCM	% TTM	% TTM	% TEM	% TEM	% TEMRA	% TEMRA		% CD95+ parmi les CD45RA-	
BIBP37	40,6	0	47,1	0	1,8	3,9	0,1	47,9	1,4	30,9	0,6	10,6	5,8	97,2	84,9
BINH71	1,6	8,3	0,1	4,8	58,1	4,2	39,3	10,1	2,6	22,3	0,5	29,8	23,6	1,4	44,1
FOUC36	41,8	0,2	6,3	1,9	35,2	47,5	2	13,8	0,8	18,6	1,3	0,9	15,9	24,1	76,2
GOLM47	45,7	0	34,7	0	16,8	0,5	0,4	57,9	0,4	41	0,3	0,5	0,1	58,4	87,3
KOUA40	1	0	0,2	0	80,7	0,9	16,5	61,7	0,5	32,4	0,3	3,8	1,2	37,4	78,7
LECD48	0	0,3	0	0,1	96,8	4,6	0,3	66,5	0,7	22,5	0,2	5,3	2,1	7	44,6
MANF85	68,9	0,2	3,3	0	19	48,9	0,1	5,5	0,4	17,5	7	2,4	24,8	6	86
MEUJ44	3,6	3	0,2	5,1	27	29,8	2	30,4	27,4	3	0,1	3,3	6,2	8,8	68,1
MOTM35	10,7	0	1,3	0	86	0,4	0,2	51,4	0,3	34,2	0,3	13,8	0,1	38,2	84,8
RUBL38	1	0,3	0	0,4	97,5	12,9	0,5	36,2	0,2	39,5	0,1	4,9	5,4	69,2	69,1
SAMP30	27,6	0	0,4	0,8	20,3	5,8	30,6	44,2	4,3	28,7	8,2	16,9	2,8	94	60,3
SIWX58	3,5	0,6	0	0	95	24,7	1,1	12,3	0,2	38,5	0,1	5,1	18,2	0,6	25,7
STAI28	0,1	0,6	0	0,4	96	58,2	1,7	9,3	0,3	5,2	0	0,2	25,6	39,5	56,5
SYLN27	8,1	0	44,1	1,1	32,8	3,4	0,4	51,8	0,1	26,9	1,6	14,8	1,2	88,7	92
TIRD53	1	0	3,5	0,1	93,7	6,8	0,1	37,2	0,1	39,4	0,1	9,3	7	95,4	94,7
VOIM42	2	0,4	17,4	1,4	73,3	1,8	1,2	41,1	1,1	11,9	0,1	39,7	2,4	94,7	93,8

Annexe 6

Patient	Phénotype(s) initial(aux) des CS	Date	Evolution du nombre de CS durant la période	Evolutivité du phénotype(s)	Date
ARGP38	95% TN	mars 2014	↘↘	85% TN + 10% TCM	décembre 2014 - avril 2015
			↗↗	Prolifération avec 75% TN + 20% TCM	avril 2016
BIBP37	95% TN	mai 2014	↘	Stable	novembre 2015
BINH71	75% TCM + 25% TTM	novembre 2015	↘	Stable	juin 2016
CERA45	95% TN	avril 2014	↘	Stable	septembre 2015
COIJ47	70% TN + 20% TCM	avril 2014	↔	Variations TN / TCM + TEM	fluctuant de juin 2014 à juillet 2015
DERJ46	80% TN	décembre 2015	↔	Stable	juin 2016
FOUC36	55% TN + 20% TCM + 20% CD3loCD4lo	janvier 2015	↗	Prolifération avec 90% TN	avril 2016 à juillet 2016
GOLM47	80% TN + 15% TCM	mars 2014	↔	Stable	janvier 2016
KOUA40	60% TTM + 25% TCM	juin 2014	↔	Variations TTM / TCM	avril 2015 à mars 2016
KRER35	75% TCM + 15% TN	mai 2015	↘	Stable	novembre 2015
LECD48	95% TCM	juin 2015	↘↘	Stable	décembre 2015
MANF85	40% TCM + 35% TN + 5% TEMRA	novembre 2014	↔	Stable	juin 2016
MEUJ44	45% TCM + 45% TTM + 10% TEM	juillet 2014	↘	Stable	février 2016
MOTM35	100% TCM	mars 2014	↗	Prolifération avec ↘TCM et ↗TN (25%)	octobre 2015 à février 2016
			↔	début de ↘ des CS avec ↗TCM et ↘TN (10%)	mars 2016 à avril 2016
POPG43	90% TCM, population atypique CCR7+ CD27lo	avril 2014	↘↘	Stable	janvier 2015
RUBL38	55% TCM + 45% TN	avril 2014	↗	Variations TCM / TN	juillet 2014 à juin 2016
SANG37	70% TN + 25% TCM Populations CD3loCD4+ et CD3loCD4-	novembre 2014	↔	Stable	avril 2015
SIWX58	95% TCM + 5% TN	mai 2015	↘	Stable	juillet 2016
STAI28	95% TCM	novembre 2014	↔	↗ TTM (15%)	juin 2016
SYLN27	70% TN + 20% TCM	mars 2015	↗	Stable	juin 2016
TIRD53	95% TCM	avril 2014	↘↘	Stable	janvier 2016
ULMG41	95% TCM	avril 2014	↗	Prolifération avec population TTM transitoire (30%)	novembre 2014 à janvier 2015
			↗↗	Prolifération à 100% TCM	mars 2016 à juin 2016
VOIM42	80% TCM + 10% TN	juillet 2015	↘↘	Stable	novembre 2015

Annexe 7

A. Sang (sur PBMC décongelées)

Donneurs sains	% TN	% TSCM	% TCM	% TTM	% TEM	% TEMRA	% CD95+ parmi les CD45RA-	% CD69+	% CD103+
Moyenne	36,5	0,6	25,7	15,3	17,4	2,2	66,6	0,9	1,5
Intervalle de référence	12,7 - 60,3	0 - 1,2	12,8 - 38,6	6,0 - 24,6	2,4 - 32,5	0 - 5,4	44,3 - 88,9	0 - 2,6	0 - 2,9

Donneurs sains	% CLA+	% CCR4+	% CCR6+	% CD127+	% CD215+	% PD-1+
Moyenne	13,0	46,7	34,5	47,9	0,4	12,2
Intervalle de référence	5,4 - 20,6	36,5 - 56,8	26,1 - 43	20,5 - 75,3	0 - 0,9	1,4 - 23,1

B. Peau

Donneurs sains	% TN	% TSCM	% TCM	% TTM	% TEM	% TEMRA	% CD95+ parmi les CD45RA-	% CD69+	% CD103+
n° 1	0	0	5,6	10,2	76,1	5,6	85		
n° 2	0	0	9,3	16,3	65,1	9,3	66,9	56,5	15,7
n° 3	0,3	0,3	10,4	7,8	36,8	6,1	38,9	90,3	10,9

Donneurs sains	% CLA+	% CXCR3+	% CCR4+	% CCR6+	% CCR10+	% CD127+	% CD215+	% CD25+	% PD-1+
n° 1								14,2	17,2
n° 2	37,7	1,6	3,3	1,6	42,6	89,2	4,8		59
n° 3						47,6	0,4	13,6	

BIBLIOGRAPHIE

- Agar, N.S., Wedgeworth, E., Crichton, S., Mitchell, T.J., Cox, M., Ferreira, S., Robson, A., Calonje, E., Stefanato, C.M., Wain, E.M., et al. (2010). Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4730–4739.
- Bagot, M., and Bensussan, A. (2006). [Epidermotropic T cell lymphomas as models for tumor progression]. *Médecine Sci. MS* *22*, 192–196.
- Bagot, M., Moretta, A., Sivori, S., Biassoni, R., Cantoni, C., Bottino, C., Boumsell, L., and Bensussan, A. (2001). CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood* *97*, 1388–1391.
- Bernengo, M.G., Novelli, M., Quaglino, P., Lisa, F., De Matteis, A., Savoia, P., Cappello, N., and Fierro, M.T. (2001). The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sézary cells. *Br. J. Dermatol.* *144*, 125–135.
- Bouaziz, J.-D., Remtoula, N., Bensussan, A., Marie-Cardine, A., and Bagot, M. (2010). Absolute CD3+ CD158k+ lymphocyte count is reliable and more sensitive than cytomorphology to evaluate blood tumour burden in Sézary syndrome. *Br. J. Dermatol.* *162*, 123–128.
- Boursi, B., Haynes, K., Mamtani, R., and Yang, Y.-X. (2016). An association between newly diagnosed cutaneous T cell lymphoma and prior impetigo: a nested case-control study. *Arch. Dermatol. Res.*
- Buck, M.D., O'Sullivan, D., and Pearce, E.L. (2015). T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.* *212*, 1345–1360.
- Campbell, J.J., Clark, R.A., Watanabe, R., and Kupper, T.S. (2010). Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood* *116*, 767–771.
- Chen, L., Park, S.-M., Tumanov, A.V., Hau, A., Sawada, K., Feig, C., Turner, J.R., Fu, Y.-X., Romero, I.L., Lengyel, E., et al. (2010). CD95 promotes tumour growth. *Nature* *465*, 492–496.
- Chevret, E., and Merlio, J.-P. (2016). Sézary Syndrome: Translating Genetic Diversity into Personalized Medicine. *J. Invest. Dermatol.* *136*, 1319–1324.
- Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., et al. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood* *121*, 573–584.
- Clark, R.A., Shackelton, J.B., Watanabe, R., Calarese, A., Yamanaka, K., Campbell, J.J., Teague, J.E., Kuo, H.P., Hijnen, D., and Kupper, T.S. (2011). High-scatter T cells: a reliable biomarker for malignant T cells in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* *117*, 1966–1976.
- Devata, S., and Wilcox, R.A. (2016). Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Review with a Focus on Targeted Agents. *Am. J. Clin. Dermatol.* *17*, 225–237.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 857–863.
- Dummer, R., Nestle, F.O., Niederer, E., Ludwig, E., Laine, E., Grundmann, H., Grob, P., and Burg, G. (1999). Genotypic, phenotypic and functional analysis of CD4+CD7+ and CD4+CD7- T lymphocyte subsets in Sézary syndrome. *Arch. Dermatol. Res.* *291*, 307–311.

- Duvic, M., Tetzlaff, M.T., Gangar, P., Clos, A.L., Sui, D., and Talpur, R. (2015). Results of a Phase II Trial of Brentuximab Vedotin for CD30+ Cutaneous T-Cell Lymphoma and Lymphomatoid Papulosis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 3759–3765.
- Esmailzadeh, S., Huang, Y., Su, M.-W., Zhou, Y., and Jiang, X. (2015). BIN1 tumor suppressor regulates Fas/Fas ligand-mediated apoptosis through c-FLIP in cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia* *29*, 1402–1413.
- Ferenczi, K., Fuhlbrigge, R.C., Pinkus, J.L., Pinkus, G.S., and Kupper, T.S. (2002). Increased CCR4 Expression in Cutaneous T Cell Lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* *119*, 1405–1410.
- van der Fits, L., Sandberg, Y., Darzentas, N., Zoutman, W.H., Tielemans, D., Wolvers-Tettero, I.L.M., Vermeer, M.H., and Langerak, A.W. (2011). A restricted clonal T-cell receptor $\alpha\beta$ repertoire in Sézary syndrome is indicative of superantigenic stimulation. *Br. J. Dermatol.* *165*, 78–84.
- Gattinoni, L., Zhong, X.-S., Palmer, D.C., Ji, Y., Hinrichs, C.S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Garvin, L.M., et al. (2009). Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+ memory stem cells. *Nat. Med.* *15*, 808–813.
- Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C.M., Quigley, M.F., Almeida, J.R., Gostick, E., Yu, Z., Carpenito, C., et al. (2011). A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat. Med.* *17*, 1290–1297.
- Gebhardt, T., Mueller, S.N., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2013). Peripheral tissue surveillance and residency by memory T cells. *Trends Immunol.* *34*, 27–32.
- Gonzalez, B.R., Zain, J., Rosen, S.T., and Querfeld, C. (2016). Tumor microenvironment in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Curr. Opin. Oncol.* *28*, 88–96.
- Huang, Y., Su, M.-W., Jiang, X., and Zhou, Y. (2015). Evidence of an oncogenic role of aberrant TOX activation in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* *125*, 1435–1443.
- Hurabielle, C., Michel, L., Ram-Wolff, C., Battistella, M., Jean-Louis, F., Beylot-Barry, M., d’Incan, M., Bensussan, A., and Bagot, M. (2016). Expression of Sézary Biomarkers in the Blood of Patients with Erythrodermic Mycosis Fungoides. *J. Invest. Dermatol.* *136*, 317–320.
- Hwang, S.T., Janik, J.E., Jaffe, E.S., and Wilson, W.H. (2008). Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet Lond. Engl.* *371*, 945–957.
- Jones, C.L., Mary Wain, E., Chu, C.-C., Tosi, I., Foster, R., McKenzie, R.C.T., Whittaker, S.J., and Mitchell, T.J. (2010). Downregulation of Fas Gene Expression in Sézary Syndrome Is Associated with Promoter Hypermethylation. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1116–1125.
- Jones, D., Dang, N.H., Duvic, M., Washington, L.T., and Huh, Y.O. (2001). Absence of CD26 expression is a useful marker for diagnosis of T-cell lymphoma in peripheral blood. *Am. J. Clin. Pathol.* *115*, 885–892.
- Kiel, M.J., Sahasrabudhe, A.A., Rolland, D.C.M., Velusamy, T., Chung, F., Schaller, M., Bailey, N.G., Betz, B.L., Miranda, R.N., Porcu, P., et al. (2015). Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK-STAT pathway in Sézary syndrome. *Nat. Commun.* *6*, 8470.
- Klemke, C.D., Booken, N., Weiss, C., Nicolay, J.P., Goerdt, S., Felcht, M., Géraud, C., Kempf, W., Assaf, C., Ortonne, N., et al. (2015). Histopathological and immunophenotypical criteria for the diagnosis of Sézary syndrome in differentiation from other erythrodermic skin diseases: a European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Cutaneous Lymphoma Task Force Study of 97 cases. *Br. J. Dermatol.* *173*, 93–105.
- Kondrack, R.M., Harbertson, J., Tan, J.T., McBreen, M.E., Surh, C.D., and Bradley, L.M. (2003). Interleukin 7 Regulates the Survival and Generation of Memory CD4 Cells. *J. Exp. Med.* *198*, 1797–1806.
- Krejsgaard, T., Odum, N., Geisler, C., Wasik, M.A., and Woetmann, A. (2012). Regulatory T cells and immunodeficiency in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Leukemia* *26*, 424–432.

- Langerak, A.W., van Den Beemd, R., Wolvers-Tettero, I.L., Boor, P.P., van Lochem, E.G., Hooijkaas, H., and van Dongen, J.J. (2001). Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha T-cell proliferations. *Blood* *98*, 165–173.
- Lugli, E., Gattinoni, L., Roberto, A., Mavilio, D., Price, D.A., Restifo, N.P., and Roederer, M. (2013). Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nat. Protoc.* *8*, 33–42.
- Macintyre, A.N., and Rathmell, J.C. (2013). Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. *Cancer Metab.* *1*, 5.
- Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M., and Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2797–2809.
- Marie-Cardine, A., Viaud, N., Thonnart, N., Joly, R., Chanteux, S., Gauthier, L., Bonnafous, C., Rossi, B., Bléry, M., Paturel, C., et al. (2014). IPH4102, a humanized KIR3DL2 antibody with potent activity against cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res.* *74*, 6060–6070.
- Miyagaki, T., and Sugaya, M. (2014). Immunological milieu in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *J. Dermatol.* *41*, 11–18.
- Miyagaki, T., Sugaya, M., Suga, H., Kamata, M., Ohmatsu, H., Fujita, H., Asano, Y., Tada, Y., Kadono, T., and Sato, S. (2011). IL-22, but not IL-17, dominant environment in cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 7529–7538.
- Moins-Teisserenc, H., Daubord, M., Clave, E., Douay, C., Félix, J., Marie-Cardine, A., Ram-Wolff, C., Maki, G., Beldjord, K., Homyrda, L., et al. (2015). CD158k is a reliable marker for diagnosis of Sézary syndrome and reveals an unprecedented heterogeneity of circulating malignant cells. *J. Invest. Dermatol.* *135*, 247–257.
- Morton, L.M., Slager, S.L., Cerhan, J.R., Wang, S.S., Vajdic, C.M., Skibola, C.F., Bracci, P.M., de Sanjose, S., Smedby, K.E., Chiu, B.C.H., et al. (2014). Etiologic Heterogeneity Among Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monogr.* *2014*, 130–144.
- Mueller, S.N., Zaid, A., and Carbone, F.R. (2014). Tissue-resident T cells: dynamic players in skin immunity. *Front. Immunol.* *5*, 332.
- Nagai, Y., Kawahara, M., Hishizawa, M., Shimazu, Y., Sugino, N., Fujii, S., Kadowaki, N., and Takaori-Kondo, A. (2015). T memory stem cells are the hierarchical apex of adult T-cell leukemia. *Blood* *125*, 3527–3535.
- Nicolay, J.P., Felcht, M., Schledzewski, K., Goerdt, S., and Géraud, C. (2016). Sézary syndrome: old enigmas, new targets. *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG* *14*, 256–264.
- Olsen, E., Vonderheid, E., Pimpinelli, N., Willemze, R., Kim, Y., Knobler, R., Zackheim, H., Duvic, M., Estrach, T., Lamberg, S., et al. (2007). Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* *110*, 1713–1722.
- Ortonne, N., Huet, D., Gaudez, C., Marie-Cardine, A., Schiavon, V., Bagot, M., Musette, P., and Bensussan, A. (2006a). Significance of circulating T-cell clones in Sezary syndrome. *Blood* *107*, 4030–4038.
- Ortonne, N., Bagot, M., and Bensussan, A. (2006b). KIR3DL2 : une nouvelle étape dans l'histoire du syndrome de Sézary. *Médecine/Sciences* *22*, 691–693.
- Ortonne, N., Le Gouvello, S., Mansour, H., Poillet, C., Martin, N., Delfau-Larue, M.-H., Leroy, K., Farcet, J.-P., Bagot, M., and Bensussan, A. (2008). CD158K/KIR3DL2 transcript detection in lesional skin of patients with erythroderma is a tool for the diagnosis of Sézary syndrome. *J. Invest. Dermatol.* *128*, 465–472.
- Pauken, K.E., and Wherry, E.J. (2015). Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* *36*, 265–276.

- Paulsen, M., Valentin, S., Mathew, B., Adam-Klages, S., Bertsch, U., Lavrik, I., Krammer, P.H., Kabelitz, D., and Janssen, O. (2011). Modulation of CD4+ T-cell activation by CD95 co-stimulation. *Cell Death Differ.* *18*, 619–631.
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., and Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J. Exp. Med.* *184*, 505–518.
- Rappl, G., Abken, H., Muche, J.M., Sterry, W., Tilgen, W., André, S., Kaltner, H., Ugurel, S., Gabius, H.-J., and Reinhold, U. (2002). CD4+CD7- leukemic T cells from patients with Sézary syndrome are protected from galectin-1-triggered T cell death. *Leukemia* *16*, 840–845.
- Remer, M., Al-Shamkhani, A., Glennie, M., and Johnson, P. (2014). Mogamulizumab and the treatment of CCR4-positive T-cell lymphomas. *Immunotherapy* *6*, 1187–1206.
- Sako, N., Schiavon, V., Bounfour, T., Dessirier, V., Ortonne, N., Olive, D., Ram-Wolff, C., Michel, L., Sicard, H., Marie-Cardine, A., et al. (2014). Membrane expression of NK receptors CD160 and CD158k contributes to delineate a unique CD4+ T-lymphocyte subset in normal and mycosis fungoides skin. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *85*, 869–882.
- Santana, M.A., and Esquivel-Guadarrama, F. (2006). *Cell Biology of T Cell Activation and Differentiation*. B.-I.R. of Cytology, ed. (Academic Press), pp. 217–274.
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J.C., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., et al. (2013). Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity* *38*, 187–197.
- Scarisbrick, J.J., Prince, H.M., Vermeer, M.H., Quaglino, P., Horwitz, S., Porcu, P., Stadler, R., Wood, G.S., Beylot-Barry, M., Pham-Ledard, A., et al. (2015). Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *33*, 3766–3773.
- Steinhoff, M., Schöpp, S., Assaf, C., Muche, M., Beyer, M., Sterry, W., and Lukowsky, A. (2009). Prevalence of genetically defined tumor cells in CD7 as well as CD26 positive and negative circulating T-cell subsets in Sézary syndrome. *Leuk. Res.* *33*, 88–99.
- Sugaya, M., Morimura, S., Suga, H., Kawaguchi, M., Miyagaki, T., Ohmatsu, H., Fujita, H., and Sato, S. (2015). CCR4 is expressed on infiltrating cells in lesional skin of early mycosis fungoides and atopic dermatitis. *J. Dermatol.* *42*, 613–615.
- Talpur, R., Jones, D.M., Alencar, A.J., Apisarnthanarax, N., Herne, K.L., Yang, Y., and Duvic, M. (2006). CD25 expression is correlated with histological grade and response to denileukin diftitox in cutaneous T-cell lymphoma. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 575–583.
- Tan, S.-Y., Roediger, B., and Weninger, W. (2015). The role of chemokines in cutaneous immunosurveillance. *Immunol. Cell Biol.* *93*, 337–346.
- Taswell, H.F., and Winkelmann, R.K. (1961). Sezary syndrome--a malignant reticulemic erythroderma. *JAMA* *177*, 465–472.
- Thonnart, N., Caudron, A., Legaz, I., Bagot, M., Bensussan, A., and Marie-Cardine, A. (2014). KIR3DL2 is a coinhibitory receptor on Sézary syndrome malignant T cells that promotes resistance to activation-induced cell death. *Blood* *124*, 3330–3332.
- Turner, D.L., and Farber, D.L. (2014). Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology. *Front. Immunol.* *5*, 331.

- Willemze, R., van Vloten, W.A., Hermans, J., Damsteeg, M.J., and Meijer, C.J. (1983). Diagnostic criteria in Sézary's syndrome: a multiparameter study of peripheral blood lymphocytes in 32 patients with erythroderma. *J. Invest. Dermatol.* *81*, 392–397.
- Willemze, R., Jaffe, E.S., Burg, G., Cerroni, L., Berti, E., Swerdlow, S.H., Ralfkiaer, E., Chimenti, S., Diaz-Perez, J.L., Duncan, L.M., et al. (2005). WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* *105*, 3768–3785.
- Willheim, M., Ebner, C., Baier, K., Kern, W., Schrottbauer, K., Thien, R., Kraft, D., Breiteneder, H., Reinisch, W., and Scheiner, O. (1997). Cell surface characterization of T lymphocytes and allergen-specific T cell clones: correlation of CD26 expression with T(H1) subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* *100*, 348–355.
- Wood, G.S., Tung, R.M., Haeffner, A.C., Crooks, C.F., Liao, S., Orozco, R., Veelken, H., Kadin, M.E., Koh, H., and Heald, P. (1994). Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sézary syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J. Invest. Dermatol.* *103*, 34–41.
- Yagi, H., Tokura, Y., Furukawa, F., and Takigawa, M. (1996). CD7-positive Sézary syndrome with a Th1 cytokine profile. *J. Am. Acad. Dermatol.* *34*, 368–374.
- Yawalkar, N., Ferenczi, K., Jones, D.A., Yamanaka, K., Suh, K.-Y., Sadat, S., and Kupper, T.S. (2003). Profound loss of T-cell receptor repertoire complexity in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* *102*, 4059–4066.
- Zhao, Y., Yang, L., Wang, X., and Zhou, Z. (2014). The new insights from DPP-4 inhibitors: their potential immune modulatory function in autoimmune diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *30*, 646–653.

RESUME

Le syndrome de Sézary est un lymphome T cutané leucémisé. Le marqueur CD158k/KIR3DL2, récemment validé par mon équipe pour identifier les cellules de Sézary (CS), nous a permis de suivre immunologiquement ces patients. Contrairement à la littérature, nous rapportons une hétérogénéité intra- et inter-individuelle, avec l'ensemble des profils de maturation possibles pour les CS circulantes, alors que celles de la peau sont de phénotypes plus matures, exclusivement mémoires. Des populations de description récente ont été observées, de type TSCM (« T stem cell memory ») dans le sang, et T résidente mémoire dans la peau. Nous retrouvons une expression différentielle entre les deux sites, de récepteurs de chimiokines et d'interleukines connus pour être impliqués dans la maladie. L'exploration de cette diversité phénotypique, et des interactions entre les compartiments sanguins et cutanés, pourrait permettre de définir la cible cellulaire la plus pertinente pour les immunothérapies du futur.

DISCIPLINE

Immunologie

MOTS CLES

Lymphome T cutané ; Sézary ; KIR3DL2/CD158k ; Immunophénotype ; Naïf ; Mémoire ; TSCM ; Chimiokine

ADRESSE DE L'AUTEUR

96, rue de la fontaine au roi
75011 - PARIS