

UNIVERSITÉ TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE : 2019

THESES 2019/TOU3/2022

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

DOUAT-BEYRIES Claudia

Née le 01/11/1991 à Tarbes

ÉTUDE DES MARQUEURS PHÉNOTYPIQUES DANS LE DIAGNOSTIC
ET LE SUIVI DES LYMPHOMES T CUTANÉS PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX

Le 28 juin 2019

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur François VERGEZ

JURY

Président : Madame le Professeur Véronique DE MAS

1er assesseur : Madame le Professeur Laurence LAMANT

2ème assesseur : Monsieur le Docteur Serge BOULINGUEZ

3ème assesseur : Monsieur le Docteur François VERGEZ

PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} janvier 2019

Professeurs Emérites

M. BENOIST P.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme. AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J.-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MÜLLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J.-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie Clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERAËVE C.	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELENDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Assistant Associé des Universités	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	Mme MARTINI H.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. METSU D.	Pharmacologie		
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S.	Biophysique		

Remerciements

A Madame le Professeur Véronique De Mas, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie également pour vos conseils pendant l'internat. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

A Madame le Professeur Laurence Lamant, je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury et de participer à la critique de ce travail. Je vous remercie beaucoup pour les explications que vous m'avez apportées pendant ce travail. Je vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

A Monsieur le Docteur Serge Boulinguez, je vous remercie de faire l'honneur de juger mon travail et d'y apporter votre regard de clinicien. Soyez assuré de mon respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur François Vergez, je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir fait confiance pour réaliser ce travail. Merci pour ton enthousiasme, tes conseils, ta disponibilité et ton investissement tout au long de ce travail. C'était un plaisir de travailler avec toi, toujours dans la bonne humeur.

Merci aux techniciennes qui ont permis la réalisation de ce travail et qui ont travaillé sur ces dossiers.

Merci à tous les biologistes et à tous les techniciens rencontrés pendant cet internat, à Bordeaux, Limoges, Toulouse et Saint-Gaudens. Je vous remercie pour l'ensemble des conseils et des connaissances que vous m'avez apportés pendant ces quatre années. Votre accueil, votre générosité m'ont permis d'apprendre à vos côtés, de jour comme de nuit. Je vous en suis très reconnaissante.

A mes parents, merci pour votre soutien infailible à toute épreuve. C'est grâce à vous que je suis ici aujourd'hui. A ma Maman, merci pour l'exemple que tu as été, pour ton courage face à toute épreuve. A mon Papa, merci pour les valeurs que tu nous as transmises, pour ta générosité tout au long de ces années et pour ces bons repas que nous partageons régulièrement tous ensemble.

A ma Mamie, merci Mamie. Merci pour ta patience et pour tout ce que tu as fait pour nous. Pour nous avoir accompagnés partout, pour t'être si bien occupée de nous, et pour nous avoir soutenus dans chaque activité que l'on faisait. On ne te remerciera jamais assez.

A mes frères, Hugo, merci de m'avoir supportée. Pour tous ces bons souvenirs que j'ai de notre enfance. Je te souhaite plein de bonheur pour la suite avec Malin. A Jean Mi, pour ces innombrables parties de Siedler. A Gérôme pour m'avoir appris les plaques tectoniques et à Eric, merci d'avoir été

là pour moi. A mes neveux et nièces et mes belles sœurs, merci pour ces bons moments passés ensemble.

A France et à sa grande famille, Alain, Mémène, Sandrine. Merci de nous avoir acceptés dans votre famille. Merci France pour ta grande générosité et pour ton soutien.

A ma marraine, à mon parrain et Pascale, merci d'avoir été là dans tous les moments importants.

A mes amis

Sandra, à mes côtés depuis à peine 27 ans. Lucie, je te souhaite plein de bonheur avec ta jolie famille. A Matthieu, qui a toujours été là pour moi. Marine, pour ces folles années depuis le lycée. A Baptiste, pour ces beaux souvenirs ensemble à quelques kilomètres d'ici voire un peu plus loin.

A mes amis de pharma : Merci à Yohan sans qui ces révisions n'auraient pas été aussi joyeuses. A Nancy, ma bibi, et à nos souvenirs de TP, à Alix, Kévin et Joévin. A Gaëlle et Jérémy, no worries.

A mes co-internes : Merci à Thibaut, mon ami tarnais avec qui j'ai partagé de nombreux stages d'internat. Merci pour ces moments partagés ensemble, des plus compliqués au début de cet internat, aux moins compliqués à Limoges et à Toulouse.

Merci à Patchouka sans qui ce stage à Limoges n'aurait pas été le même. Ma Patchouk, ma pépite. Merci pour ces soirées d'internat et ces rigolades dans le BDI.

A Isa, merci pour tout. Je te souhaite beaucoup de réussite. Tu as été très présente pour moi pendant ces années d'internat et c'était un régal de travailler avec toi au quotidien. Merci pour ta bonne humeur ma Isa.

A Jen qui passe facilement un ippon sur Thibaut, à Eline, Nico et leur futur Golden.

Merci à tous les co-internes avec qui j'ai partagé ces années d'internat, Solweig, Tania, MF, Marine, Mylène, Charlycorne, Bastien, Vuthy, Julien, Pauline et Clémence, Floflo, Virginie, Théo, Guillaume, Momojito, Aligator, Imane, Karen, Nono, Claire, Caro, Laurie, Julia, Pauline, Anaïs, Agnès.

Merci à ceux que j'ai pu rencontrer grâce à l'internat, Cédric, Catherine, Antho, Laurie, Audrey, Thomas.

Merci à Mumu pour ton aide durant les différents stages et pour ta bonne humeur qui est toujours au rendez-vous.

A la famille de Renan, merci pour votre générosité et pour tous les bons moments que l'on passe ensemble.

A mon Renan. Merci pour ton aide très précieuse pendant la rédaction de ce travail et l'analyse des résultats. Merci pour ton soutien.

C'est un bonheur de vivre avec toi au quotidien et j'ai hâte de continuer à partager ma vie à tes côtés.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux	11
Liste des abréviations	12
Introduction.....	13
1. Généralités sur les lymphomes T cutanés primitifs	15
1.1 Généralités	15
1.1.1 Définitions et classification diagnostique des lymphomes T cutanés primitifs	15
1.1.2 Classification TNMB, stadification et correspondances pronostiques du MF et du SS	17
1.1.3 Facteurs de mauvais pronostic.....	20
1.2 Le syndrome de Sézary (SS).....	21
1.2.1 Généralités et historique.....	21
1.2.2 Epidémiologie.....	21
1.2.3 Pronostic.....	21
1.2.4 Diagnostic clinique.....	21
1.2.5 Diagnostic histologique	23
1.2.6 Diagnostic biologique	24
1.2.7 Diagnostic différentiel du SS.....	27
1.2.8 Traitement du SS	27
2. Place de la CMF dans le diagnostic et dans le suivi du SS	29
2.1 Importance de la CMF dans le diagnostic et dans le suivi du SS.....	29
2.2 Les différents marqueurs	31
2.2.1 Le KIR3DL2 : CD158k.....	31
2.2.2 Le CD28.....	32
2.2.3 Le CD279.....	34
2.3 Objectif	34

3.	Patients et méthode.....	35
3.1	Patients.....	35
3.2	Méthode.....	35
3.2.1	Cytologie.....	35
3.2.2	Cytométrie en flux multiparamétrique	35
3.2.3	Stratégie de fenêtrage des cellules d'intérêt	36
4.	Résultats.....	44
4.1	Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte	44
4.2	Evaluation du taux de lymphocytes en fonction des différents groupes de patients.....	47
4.3	Evaluation des critères diagnostiques définis par l'ISCL	48
4.3.1	Evaluation du ratio CD4/CD8 en fonction des groupes de patients.....	48
4.3.2	Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26- en fonction des groupes de patients	49
4.3.3	Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD7- en fonction des groupes de patients.....	50
4.3.4	Evaluation des performances diagnostiques des différents paramètres.....	50
4.3.5	Evaluation des seuils des différents paramètres.....	51
4.4	Evaluation de l'expression des différents marqueurs en fonction des groupes de patients	52
4.4.1	Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD28-	52
4.4.2	Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+	53
4.4.3	Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+	53
4.4.4	Evaluation des performances diagnostiques du pourcentage et du nombre de cellules CD158k+, PD-1+ ou CD28-	54
4.4.5	Établissement d'un score diagnostique en fonction des résultats des performances diagnostiques	55
4.5	Etude de la co-expression des marqueurs de surface au sein de la population lymphocytaire.....	57

4.6	Etude de l'hétérogénéité de la population maligne pour chaque patient.....	59
4.6.1	Evaluation de l'hétérogénéité de la population clonale par patient	60
4.7	Etude de la population maligne et de la population clonale majoritaire au cours du traitement	63
4.7.1	Suivi de 2 patients SS.....	63
4.7.2	Suivi des groupes de patients SS selon l'expression combinée des marqueurs	65
	Discussion	69
	Conclusion	74
	ANNEXES.....	75

Liste des figures

Figure 1 : Exemple d'aspect clinique du SS	22
Figure 2 : Exemple de CS sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa.....	24
Figure 3 : Mécanisme d'action de l'Ipilimumab d'après Sekulic <i>et al.</i> (69).	33
Figure 4 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total.....	37
Figure 5 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires de phénotype CD3+CD4+CD26-CD7+/-à partir de sang total.....	39
Figure 6 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total.....	41
Figure 7 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total d'un patient atteint d'un SS.....	42
Figure 8 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total d'un patient atteint de MF.	42
Figure 9 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total.....	43
Figure 10 : Répartition des patients en fonction de leur diagnostic au sein de la cohorte d'étude.....	44
Figure 11 : Pourcentage de patients ayant eu un nombre donné de prélèvements.....	45
Figure 12 : Pourcentage de patients ayant un SS associé au nombre de prélèvements effectués.	46
Figure 13 : Taux de lymphocytes dans les différents groupes étudiés.	47
Figure 14 : Ratio CD4/CD8 dans les différents groupes étudiés.	48
Figure 15 : Comparaison des pourcentages et du nombre de lymphocytes CD3+CD4+CD26-	49
Figure 16 : Comparaison des pourcentages et du nombre de lymphocytes CD3+CD4+CD7-	50
Figure 17 : Courbes ROC et AUC correspondantes pour les différents paramètres.....	51
Figure 18 : Comparaison des pourcentages et des taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD28-	52
Figure 19 : Comparaison des pourcentages et des taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+	53
Figure 20 : Comparaison des pourcentages et des taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+	53
Figure 21 : Courbes ROC des pourcentages et des taux de cellules CD158k+ et de cellules CD279+ ..	54
Figure 22 : Courbe ROC des pourcentages et des taux de cellules CD28-	55
Figure 23 : Pourcentage de l'ensemble des patients ayant un SS, un MF, un LT ou sains en fonction du score calculé.....	56
Figure 24 : Différents groupes de lymphocytes en fonction de l'intensité d'expression des marqueurs	57

Figure 25 : Différents groupes de cellules chez les patients SS, non LT et MF	57
Figure 26 : Pourcentage des lymphocytes totaux contenus au sein des 5 groupes de cellules.	58
Figure 27 : Pourcentage des lymphocytes T CD4+ CD26- contenus au sein des 5 groupes de cellules.	59
Figure 28 : Patients 1 à 13 classés selon la population CS majoritaire	60
Figure 29 : Suivi clinique et biologique du patient 1 au cours du temps.....	63
Figure 30 : Suivi clinique et biologique du patient 4 au cours du temps.....	64
Figure 31 : Pourcentage d'expression de CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+ en fonction du pourcentage d'expression de CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+ chez les patients ayant un SS.....	65
Figure 32 : Évolution du pourcentage de cellules CD4+CD26- au cours du temps chez les patients ayant un SS exprimant fortement CD158k.....	66
Figure 33 : Évolution du pourcentage de cellules CD4+CD26- au cours du temps chez les patients ayant un SS exprimant fortement PD-1	66
Figure 34 : Évolution du pourcentage de cellules CD4+ CD26- au cours du temps chez les patients ayant un SS n'exprimant ni CD158k ni PD-1.....	67
Figure 35 : Pente de régression pour chacun des groupes précédemment définis.	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des lymphomes T cutanés primitifs selon la classification WHO 2008 d'après Beylot-Barry <i>et al.</i> (5)	16
Tableau 2 : Classification TNMB simplifiée et révisée du MF et du SS par l'ISCL (International Society For Cutaneous Lymphomas) et l'EORTC d'après Olsen <i>et al.</i> (7)	18
Tableau 3 : Stadification ganglionnaire histopathologique dans le MF et le SS d'après Olsen <i>et al.</i> ...	19
Tableau 4 : Correspondance entre la stadification, la classification TNMB et la survie à 5 ans dans le MF/SS d'après Agar <i>et al.</i> (9).....	20
Tableau 5 : Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisés	36
Tableau 6 : Score en fonction des performances diagnostiques des différents marqueurs	55
Tableau 7 : Résumé des différentes populations lymphocytaires majoritaires pour chaque patient .	61

Liste des abréviations

ADP : Adénopathies

AUC : Area under the curve

CMF : Cytométrie en flux

CS : Cellules de Sézary

CTLA4 : Cytotoxic antigen T lymphocyte 4

EORTC : European Organization of Research and Treatment of Cancer

ISCL : International Society For Cutaneous Lymphomas

LTC : Lymphomes T cutanés

LCP : Lymphomes cutanés primitifs

MF : Mycosis fongoïde

MGG : May-Grünwald Giemsa

NK : Natural killer

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PCR : Polymerase chain reaction

PD-1 : Programmed cell death 1

PEC : Photophérèse extracorporelle

ROC : Receiver Operating Characteristic

SS : Syndrome de Sézary

TCR : T cell receptor

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

WHO : World Health Organization

Introduction

Le diagnostic et la classification de certaines hémopathies restent parfois difficiles malgré les signes cliniques et histologiques que présente le patient. De nos jours, de nouvelles technologies comme la cytométrie en flux (CMF), se développent de plus en plus et trouvent leur place dans le diagnostic des hémopathies. C'est ce que nous allons étudier dans le cadre du syndrome de Sézary (SS).

Cette pathologie fait partie des lymphomes T cutanés (LTC). Les LTC regroupent de nombreuses entités dont le mycosis fongoïde (MF) et le SS. Le diagnostic du SS peut être évoqué cliniquement devant une érythrodermie mais de nombreuses autres pathologies peuvent présenter ce tableau, que ce soit des pathologies bénignes ou malignes. Il est donc nécessaire de réaliser des examens complémentaires afin de préciser le diagnostic, tels que la recherche de cellules de Sézary (CS) dans le sang. La recherche microscopique de ces cellules, réalisée par l'hémato-cytologiste, reste difficile et opérateur-dépendant. De plus, des cellules morphologiquement semblables peuvent être retrouvées dans d'autres pathologies. Les nouvelles technologies telles que la CMF, mais également la biologie moléculaire représentent donc à ce niveau une véritable aide au diagnostic. Cependant, les marqueurs étudiés en CMF ne sont pas tout le temps exprimés, et le panel d'études réalisé en biologie moléculaire ne couvre pas l'ensemble des anomalies possibles dans cette maladie. Le diagnostic du SS est donc compliqué et nécessite la collaboration de plusieurs disciplines.

Le pronostic de cette pathologie reste sombre. Bien qu'il n'y ait pas à l'heure actuelle de thérapie curative, une prise en charge rapide pour tenter de minimiser les lésions induites est nécessaire. Parmi les outils technologiques à disposition, l'utilisation de la CMF est recommandée. Cette technique permet d'étudier différents marqueurs exprimés à la surface des cellules, à partir d'un échantillon de sang périphérique. Elle est rapide et peu coûteuse. Les CS circulantes sont des lymphocytes T CD4+. La perte d'un ou deux marqueurs, CD26 et CD7, au sein de la population lymphocytaire T CD4+ est dans un premier temps étudiée pour identifier une population de lymphocytes T potentiellement malins. Cependant, la perte de ces marqueurs n'est pas toujours présente. De plus, la sensibilité et la spécificité de ces marqueurs varient en fonction du seuil fixé (1).

Ainsi, à partir d'une cohorte de patients du CHU de Toulouse, atteints de LTC ou de dermatoses inflammatoires, nous avons évalué l'expression membranaire de 3 nouveaux marqueurs (CD28, CD158k et CD279) au sein de la population lymphocytaire T CD4+ de phénotype malin. L'étude que

nous présentons a pour but d'évaluer l'utilisation de ces nouveaux marqueurs à visée diagnostique en mettant en évidence une expression aberrante et spécifique par les CS.

Dans une première partie, nous étudierons les différentes caractéristiques des lymphomes T cutanés et plus particulièrement du SS. Ensuite, nous analyserons l'intérêt de la CMF dans le diagnostic de cette pathologie, puis nous présenterons les caractéristiques de l'étude, ses objectifs et ses résultats. Enfin, nous discuterons sur l'apport de l'identification de nouveaux marqueurs dans cette pathologie.

1. Généralités sur les lymphomes T cutanés primitifs

1.1 Généralités

1.1.1 Définitions et classification diagnostique des lymphomes T cutanés primitifs

Un lymphome est une pathologie clonale, cancéreuse, qui se développe à partir de lymphocytes. A la suite d'acquisition d'une ou plusieurs anomalies génétiques, les lymphocytes anormaux vont proliférer dans divers tissus lymphoïdes tels que les ganglions, la rate, le thymus mais également dans d'autres organes non lymphoïdes comme la peau, siège d'un envahissement primitif ou secondaire.

Les lymphomes sont classés en deux groupes principaux : les lymphomes hodgkiniens et les lymphomes non hodgkiniens. Les lymphomes cutanés constituent un sous-ensemble des lymphomes non-hodgkiniens. Les lymphomes cutanés représentent la seconde forme la plus fréquente des lymphomes extra-ganglionnaires. Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) sont des proliférations clonales de lymphocytes matures d'origine B ou T, localisées à la peau, sans argument pour une localisation extra cutanée au moment du diagnostic. Ces lymphomes sont donc appelés primitifs quand la peau est le premier ou le seul organe atteint tandis qu'ils sont dits secondaires quand les localisations cutanées apparaissent au cours de l'évolution d'un lymphome systémique. Les LCP sont en majorité de phénotype T (70 à 80 % des cas) (2).

Les lymphomes cutanés regroupent différentes entités ayant des tableaux cliniques, histologiques, phénotypiques, moléculaires, immunohistologiques et évolutifs très hétérogènes. Le LCP le plus fréquent, le MF, développé à partir de lymphocytes T, est de faible grade de malignité. Le SS est quant à lui plus rare mais de mauvais pronostic. Le pronostic des lymphomes T cutanés primitifs étant très différent de celui des lymphomes systémiques atteignant secondairement la peau, des classifications particulières pour les LCP ont été développées. Une classification WHO-EORTC (World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer) permet de classer les différents LCP en fonction de leur pronostic (3,4) (Annexe 1). La classification des lymphomes T cutanés primitifs selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO) 2008 est présentée ci-dessous (tableau 1).

Tableau 1 : Classification des lymphomes T cutanés primitifs selon la classification WHO 2008 d'après Beylot-Barry *et al.* (5)

Classification des lymphomes T cutanés primitifs selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO) 2008
<p>Mycosis fongoïde (MF) MF variants et sous types MF folliculotrope Lymphome pagétoïde Lymphome chalazodermique Syndrome de Sézary Leucémie/Lymphome T de l'adulte Lymphoprolifération CD30+ Lymphome cutané à grandes cellules anaplasiques Papulose lymphomatoïde Lymphome sous cutané à type de panniculite Lymphome T cutané à cellules NK de type nasal Lymphome T cutané périphérique SAI (grandes cellules CD30-) Lymphome T épidermotrope agressif CD8+ (entité provisoire) Lymphome T cutané à cellules $\gamma\delta$+ (entité provisoire) Lymphome T pléiomorphe à petites et moyennes cellules CD4+ (entité provisoire)</p>

*SAI: sans autre indication

Dans la classification mise à jour en 2018, la terminologie du lymphome T pléiomorphe à petites et moyennes cellules CD4+ a été revue. Elle est désormais classée en lymphoprolifération primitivement cutanée à cellules T CD4+ petites et moyennes (entité provisoire) (2). D'autres entités provisoires ont été ajoutées (Annexe 2).

Le plus commun des lymphomes T cutanés primitifs est le MF (6). Il représente 44 % des LCP (3). Les lymphoproliférations cutanées T CD30+ englobent le lymphome anaplasique à grandes cellules primitif cutané et les papuloses lymphomatoïdes (5).

Suite au diagnostic du lymphome, un bilan d'extension doit être réalisé pour évaluer le stade de la maladie.

1.1.2 Classification TNMB, stadification et correspondances pronostiques du MF et du SS

Une classification TNMB (pour Tumor Node Metastasis Blood) particulière est définie pour le MF et le SS (tableaux 2 et 3).

Le T de la classification TNMB est défini par le type de lésions et la surface corporelle atteinte totale lors de l'examen clinique cutané. La présence d'adénopathie périphérique (N) et d'atteinte viscérale (M), s'il y en a, doit également être déterminée. En cas de suspicion de SS, il est nécessaire d'effectuer une recherche de CS et un immunophénotypage des lymphocytes CD4+ circulants (B). Il faut aussi procéder à une recherche de clone T circulant par PCR (polymerase chain reaction) ou par CMF sur les lymphocytes sanguins et le comparer avec un éventuel clone T cutané. L'existence d'un clone T identique dans la peau et le sang est très en faveur d'un diagnostic de lymphome T.

Tableau 2 : Classification TNMB simplifiée et révisée du MF et du SS par l'ISCL (International Society For Cutaneous Lymphomas) et l'EORTC d'après Olsen *et al.* (7)

Classification TNMB simplifiée et révisée du MF et du SS par l'ISCL/EORTC	
T : peau	
T1	Macules [1], papules et/ou plaques [2] < 10 % de la surface corporelle
T2	Plaques ≥ 10 % de la surface corporelle
T3	Tumeur(s) de plus de 1 cm de diamètre [3]
T4	Erythrodermie ≥ 80 % de la surface corporelle
N : ganglions	
N0	Absence d'adénopathie clinique [4]; la biopsie n'est pas nécessaire
N1	Adénopathie(s) périphérique(s); histologie [5]: dermo-pathique N1a clone négatif N1b clone positif
N2	Adénopathies périphériques ; histologie : infiltration par cellules de MF mais architecture du ganglion préservée N2a clone négatif N2b clone positif
N3	Adénopathies périphériques cliniques ; histologie : effacement de l'architecture du ganglion, clone positif ou négatif
Nx	Adénopathies périphériques avec absence de confirmation histologique
M : organes	
M0	Absence d'envahissement viscéral
M1	Atteinte viscérale prouvée histologiquement [6] et organe spécifié
B : sang	
B0	≤ 5 % de cellules atypiques dans le sang (cellules de Sézary) [7] B0a clone négatif B0b clone positif
B1	>5 % de cellules atypiques dans le sang B1a clone négatif B1b clone positif
B2	1 000 cellules de Sézary/mm ³ avec clone positif

[1] Macule : absence de relief. La présence ou non d'hypo ou d'hyperpigmentation, de squames, de croûtes, de poikilodermie doit être mentionnée.

[2] Plaque : présence d'un relief. La présence ou non d'hypo ou d'hyperpigmentation, de squames, de croûtes, de poikilodermie doit être notée. Les caractéristiques histopathologiques telles que le folliculotropisme, la présence de grandes cellules (>25 %) CD30+ ou CD30-, le caractère clinique ulcéré sont à rapporter.

[3] Le nombre de tumeurs, le volume total, le plus grand diamètre, la région du corps atteinte doivent être notés. La présence ou non de grandes cellules à l'histopathologie et la présence de cellules CD30+ ou – doit être souligné.

[4] Adénopathie(s) ferme(s), irrégulière(s), fixée(s) ou de 1,5 cm ou plus. Les ganglions à examiner sont les ganglions cervicaux, sus-claviculaires, axillaires, et inguinaux.

[5] Classification Dutch et NCI-VA.

[6] La rate et le foie sont étudiés par imagerie.

[7] Les cellules de Sézary sont définies comme des lymphocytes ayant un noyau cérébriforme. Un des critères suivants peut également être utilisé : réarrangement clonal du TCR ; prolifération cellulaire CD4 ou CD3 avec $CD4/CD8 \geq 10$; prolifération CD4 avec immunophénotypage anormal (perte de CD7 ou de CD26).

Tableau 3 : Stadification ganglionnaire histopathologique dans le MF et le SS d'après Olsen *et al.* (7)

Stades histopathologiques des ganglions lymphoïdes dans le MF et le SS		
Classification ISCL/EORTC	Dutch	NCI-VA
N1	Grade 1 : lymphadénopathie dermopathique	LN ₀ : absence de lymphocyte atypique LN ₁ : lymphocytes atypiques isolés et occasionnels (absence de cluster) LN ₂ : beaucoup de lymphocytes atypiques ou clusters de 3 à 6 cellules
N2	Grade 2 : Présence de cellules à noyau cérébriforme	LN ₃ : lymphocytes atypiques groupés ; architecture ganglionnaire préservée
N3	Grade 3 : Effacement partiel de l'architecture ganglionnaire ; beaucoup de cellules à noyau cérébriforme Grade 4 : Effacement complet de l'architecture ganglionnaire	LN ₄ : effacement partiel ou complet de l'architecture ganglionnaire par des lymphocytes atypiques ou par des cellules néoplasiques

En fonction de tous ces paramètres, le stade du lymphome sera précisé dans la classification TNMB présentée ci-dessous (tableau 4). Les stades permettent de définir une prise en charge adaptée et sont corrélés au pronostic (8).

Tableau 4 : Correspondance entre la stadification, la classification TNMB et la survie à 5 ans dans le MF/SS d'après Agar *et al.* (9)

Résumé des caractéristiques pronostiques et des caractéristiques de stadification clinique selon la classification ISCL/EORTC du MF et du SS					
	T	N	M	B	Survie à 5 ans (%)
IA	1	0	0	0-1	98
IB	2	0	0	0-1	89
IIA	1-2	1-2	0	0-1	89
IIB	3	0-2	0	0-1	56
IIIA	4	0-2	0	0	54
IIIB	4	0-2	0	1	48
IVA1	1-4	0-2	0	2	41
IVA2	1-4	3	0	0-2	23
IVB	1-4	0-3	1	0-2	18

1.1.3 Facteurs de mauvais pronostic

Des études ont permis d'identifier des facteurs de mauvais pronostic (10). Ces différents facteurs sont :

- ✓ Stade avancé de la maladie : stade IV
- ✓ Age > 60 ans
- ✓ Transformation en lymphome à grandes cellules
- ✓ LDH augmentés

1.2 Le syndrome de Sézary (SS)

1.2.1 Généralités et historique

En 1938, Albert Sézary et Yves Bouvrain décrivent pour la première fois le cas d'une patiente âgée de 58 ans atteinte d'une érythrodermie depuis 3 mois, précédée d'un prurit insomniant. Cette patiente présentait également des adénopathies inguinales bilatérales (11). L'examen sanguin réalisé par le docteur Levy-Coblentz a révélé des « cellules monstrueuses » mesurant de 12 à 14 µm de diamètre. Une description plus précise de ces cellules fut réalisée par Taswell et Winkelmann en 1961 : les caractéristiques du noyau cérébriforme furent alors clairement identifiées. C'est en 1973 que Brouet détermina que les CS étaient des lymphocytes T.

1.2.2 Epidémiologie

Le SS est une pathologie rare. Son incidence est d'environ 0,8 nouveau cas par an et par million d'habitants, ce qui correspond à 50 à 60 nouveaux cas/an en France (12,13). Le SS représente 3 à 5 % de l'ensemble des lymphomes T cutanés. (14,15). Il touche plus fréquemment les hommes que les femmes. L'âge moyen des patients au diagnostic est aux alentours de 50 ans (16).

1.2.3 Pronostic

Le SS est une maladie agressive. La survie globale à 5 ans est de 24 % (3). La médiane de survie est de 2 à 4 ans.

1.2.4 Diagnostic clinique

Le diagnostic s'appuie sur des critères à la fois cliniques, biologiques et histologiques.

Historiquement ce syndrome est défini par la triade suivante :

- ✓ Une érythrodermie : érythème couvrant 90 % de la surface corporelle. Cette érythrodermie peut se présenter sous différentes formes : elle est chronique et souvent pigmentée, œdémateuse, infiltrée, et très prurigineuse (17). Elle peut également être sèche et squameuse voir discrète. D'autres signes cliniques peuvent y être associés tels qu'une alopecie, une kératodermie palmo-plantaire, une onychodysplasie ou un ectropion (17-19) ;

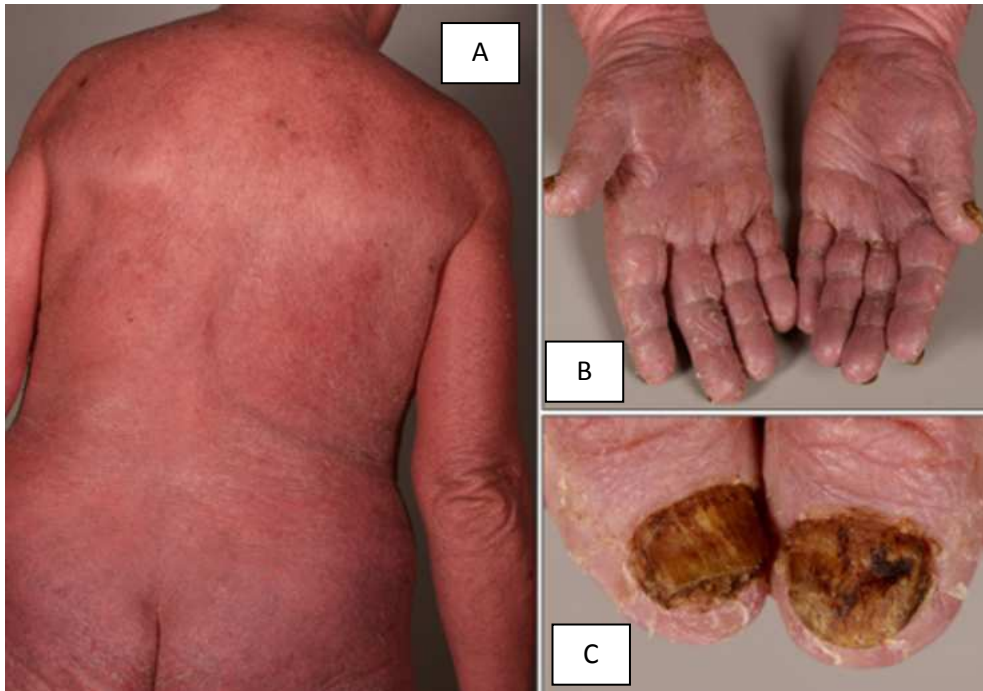


Figure 1 : Exemple d'aspect clinique du SS

Photographies issues de l'atlas of sciences : www.atlasofscience.org
(A) érythrodermie ; (B) kératodermie palmaire ; (C) onychodysplasie (20)

- ✓ Des adénopathies superficielles : les adénopathies supérieures à 1,5 cm ou les adénopathies cliniquement palpables sont prises en compte ;
- ✓ La présence dans le sang de cellules mononucléées ayant un aspect caractéristique appelées CS. Ces cellules sont également présentes dans la peau et les ganglions.

Les infections cutanées sont les complications majoritairement observées. Le germe le plus fréquemment retrouvé est *Staphylococcus aureus* (21).

1.2.5 Diagnostic histologique

L'anatomopathologie a une place très importante dans le diagnostic.

Des biopsies cutanées sont prélevées afin d'être analysées. Après avoir été fixée dans le formol, la biopsie cutanée est incluse en paraffine. De fines coupes histologiques sont colorées à l'hématoxyline éosine safran ce qui permet d'étudier la morphologie du tissu cutané. Les anomalies histologiques permettant d'orienter le diagnostic sont les suivantes (22–24) :

- ✓ migration des lymphocytes dans l'épiderme sur un mode épidermotrope (lymphocytes alignés dans la basale épidermique) ;
- ✓ présence d'amas lymphocytaires denses dans l'épiderme, sans spongiose associée, appelé micro-abcès de Pautrier ;
- ✓ présence d'atypies cellulaires ;
- ✓ présence d'un infiltrat lymphocytaire dermique péri-vasculaire comportant parfois des cellules atypiques accompagnées d'un nombre variable d'éosinophiles.

Ces anomalies histologiques ne sont pas toujours visibles. Seuls quelques signes d'inflammation non spécifiques peuvent être observés.

Afin de connaître le phénotype des cellules composant l'infiltrat dermo-épidermique, des marquages immunohistochimiques sont réalisés. L'immunohistochimie permet de confirmer la nature lymphocytaire T de l'infiltrat (grâce aux différents anticorps tels que les anti-CD2, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5, anti-CD7 et anti-CD8) et de mettre en évidence des pertes antigéniques T. L'expression de certains marqueurs tel que PD-1, qui est fortement exprimé par les CS, est également étudiée.

De plus, un réarrangement clonal des gènes du TCR est recherché par PCR au niveau cutané. Les résultats sont comparés à ceux retrouvés dans le sang.

Les biopsies des ganglions peuvent compléter l'analyse. Histologiquement, cette pathologie se manifeste par une infiltration diffuse et monotone du ganglion par les cellules malignes. Cet envahissement entraîne un effacement de l'architecture ganglionnaire. La rate ou la moelle osseuse peuvent également être infiltrées.

L'histologie a donc une place centrale dans le diagnostic du SS mais peut être décevante ou non-contributive. Cependant, au cours du suivi, la répétition de biopsies cutanées n'est pas une option envisageable. L'examen des CS circulantes, à partir d'un prélèvement sanguin est utilisé.

1.2.6 Diagnostic biologique

➤ Hémogramme

L'anémie et la thrombopénie sont souvent absentes. Le nombre de leucocytes est le plus souvent normal. Une hyperlymphocytose est parfois associée. Les CS ont une morphologie caractéristique : ce sont des cellules atypiques de taille petite à moyenne (de 10 à 12 μm de diamètre), avec un noyau à chromatine mature, très irrégulier, présentant un à deux sillons dits « en coup d'angle » ce qui lui confère un aspect cérébriforme.

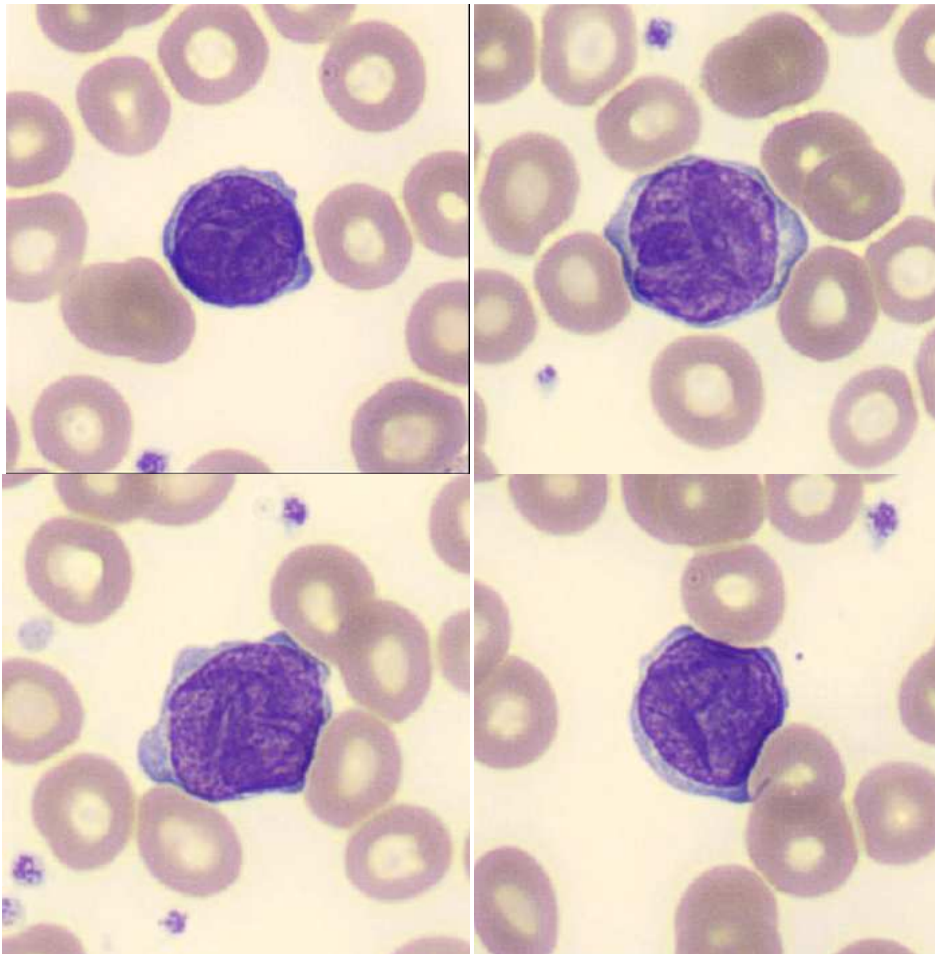


Figure 2 : Exemple de CS sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald Giemsa. Observation au microscope au fort grossissement X1000

➤ Immunophénotypage

Le SS est une maladie caractérisée par la présence de CS circulantes. Ces cellules sont cytologiquement reconnaissables mais aujourd'hui la CMF permet de les quantifier de façon plus reproductible. Les critères diagnostiques internationaux reconnus par l'ISCL et l'EORTC depuis 2007 sont :

- ✓ Un clone T sanguin circulant que l'on peut comparer avec un clone T cutané. S'ils sont identiques c'est un argument fort en faveur d'un lymphome T cutané.
- ✓ Et :
 - Soit plus de 1 000/mm³ CS circulantes ;
 - Soit un rapport lymphocytes T CD4/CD8 ≥ 10 ;
 - Soit l'augmentation de lymphocytes T CD4+ au phénotype anormal (≥ 40 % de cellules T CD4+CD7- ou ≥ 30 % de cellules T CD4+/CD26-) (7). En effet, la perte d'expression d'antigènes CD26 et CD7 est un argument en faveur du diagnostic.

➤ **Biologie moléculaire**

La PCR est utilisée afin de rechercher une clonalité dans la peau et dans le sang (25). Cette technique fait partie des critères de recommandations de l'EORTC. Elle peut être utilisée afin d'étudier le réarrangement des gènes du récepteur T permettant ainsi de détecter un clone T majoritaire. La présence d'un clone T dans le sang et/ou dans la peau a une valeur à la fois diagnostique et pronostique. La PCR est également utile dans le suivi de la maladie résiduelle dans le sang et dans la peau en cas de rémission clinique du SS. La recherche d'un clone T dans le sang peut également être réalisée par CMF.

➤ **Cytogénétique**

Même si aucune anomalie cytogénétique pathognomonique n'a clairement été identifiée dans cette pathologie, quelques mutations récurrentes ont été isolées sur des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs, des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire du TCR, ou encore dans la régulation de l'ADN.

Afin de mettre en évidence des anomalies génétiques au sein des lymphomes T cutanés, da Silva Almeida *et al.* ont réalisé le séquençage complet des exons à partir de l'ADN de cellules T CD4+ issues du sang de 25 patients atteints de SS (26). En moyenne, chez ces patients, 21 altérations du nombre de copies des gènes sont identifiées. Des gains récurrents dans les chromosomes 7, 8q, et 17q sont visibles. Des délétions récurrentes impliquant des gènes suppresseurs de tumeurs sur les chromosomes 17p (*TP53*), 13q (*RB1*), 10q (*PTEN*) et 12p (*CDKN1B*) sont aussi retrouvées. Les anomalies génétiques (délétions et/ou mutations) les plus fréquentes sont celles impliquant *TP53* (52%) situé sur le bras long du chromosome 17 (26–29).

TP53 est le gène le plus cité dans les études (27,30,31). Ce suppresseur de tumeur codant pour la protéine p53 est muté dans de nombreux cancers. La protéine p53 a un rôle crucial dans l'oncogénèse. Elle est indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire. Elle est généralement nommée la « gardienne du génome ».

PLCG1 et *CARD11* sont mutés chez plusieurs patients. Le pourcentage de mutation de *PLCG1* est de 9% dans le SS (30,32). *PLCG1* code pour une protéine, la phospholipase C gamma 1. Cette protéine catalyse la formation d'inositol 1, 4, 5-triphosphate et de diacylglycérol à partir du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. Elle est impliquée dans le réseau complexe de signalisation engagé en aval du TCR. *CARD11* est un gène qui code pour une protéine appartenant à la famille des guanylates cyclases impliquée dans la signalisation du TCR. Plusieurs études ont rapporté la mutation de ce gène (26,30).

Certaines anomalies touchent les gènes régulateurs épigénétiques et donc l'expression des gènes. Des délétions touchant le locus de *DNMT3A* sont observées chez 20 % des patients atteint de SS (26). *DNMT3A* est localisé sur le bras court du chromosome 2. Il régule la méthylation de l'ADN. Autre exemple, *TET2* est un gène muté dans les hémopathies myéloïdes ainsi que dans les hémopathies lymphoïdes dont le SS. Il code pour une dioxygénase qui catalyse la transformation de 5-méthylcytosine en 5-hydroxyméthylcytosine jouant un rôle important dans la méthylation de l'ADN et la transcription.

1.2.7 Diagnostic différentiel du SS

Les symptômes cliniques et les critères histologiques n'étant pas spécifiques de cette maladie, il est important de prendre en compte le contexte global afin d'exclure d'autres pathologies (16). L'analyse histologique peut ne pas être spécifique, en particulier au stade précoce de la maladie. Les pathologies provoquant des érythrodermies, les pathologies lymphoprolifératives cutanées et celles où l'on peut retrouver des CS circulantes sont donc à éliminer avant de conclure au diagnostic de SS.

Concernant les pathologies entraînant une érythrodermie, il faudra exclure les formes de psoriasis érythrodermique, la dermatite atopique érythrodermique (33), les érythèmes secondaires à la prise d'un médicament, les réactions cutanées du greffon contre l'hôte, la dermatite de contact, la dermatite séborrhéique, le lupus subaigu cutané, et le pytriasis rubra-pilaire. Le contexte et les antécédents aident parfois à orienter le diagnostic.

D'autres LTC font partie des diagnostics différentiels (34,35), en particulier le MF érythrodermique.

Les CS circulantes ne sont pas spécifiques du SS. Celles-ci peuvent être retrouvées dans diverses pathologies comme les dermatoses chroniques, la kératose solaire, la dermatite atopique, le psoriasis, le lupus érythémateux discoïde, les vascularites et les lymphomes B (36).

Le diagnostic du SS doit combiner plusieurs spécialités comme la dermatologie, l'anatomopathologie, la biologie, l'hématologie afin de regrouper le maximum d'information pour parfaire ce diagnostic.

1.2.8 Traitement du SS

Il existe différents traitements pour cette pathologie (22,37–40). Ces traitements dépendent du diagnostic de certitude et du stade de la maladie. Ils sont discutés au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire.

Néanmoins aucune de ces thérapeutiques n'est curative et les rechutes de ce syndrome sont fréquentes, bien que les réponses thérapeutiques au début de la maladie soient bonnes (41). Les thérapeutiques ont pour but d'améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients. Il n'existe pas de traitement de référence pour le SS. Ces divers traitements utilisés peuvent être classés en 3 catégories principales :

- ✓ Les traitements locaux superficiels :
 - Corticostéroïdes topiques
 - Rétinoïdes topiques : Bexarotène
 - Moutarde azotée : Chlorméthine

- Immunomodulateurs : Carmustine, Imiquimod
- Photothérapie UV : PUVAthérapie
- Radiothérapie locale
- Electronthérapie corporelle totale

- ✓ Les traitements systémiques :
 - Les immunomodulateurs : Interféron alpha, les rétinoïdes, la photophérèse extracorporelle (PEC)
 - Les thérapies ciblées :
 - Les anticorps monoclonaux : Alemtuzumab, Mogamulizumab
 - Les inhibiteurs des histones déacétylases : Vorinostat, Romidepsin
 - Les protéines de fusion : Denileukin difitox
 - Les agents cytotoxiques :
 - Les antifoliques : méthotrexate et le pralatrexate
 - La Gemcitabine
 - La Doxorubicine liposomale non pégylée

- ✓ L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Une recommandation européenne a conclu à l'utilisation de la PEC en traitement de première intention. Celle-ci est généralement bien tolérée avec des effets indésirables assez faibles (42). La PEC est utilisée seule ou en combinaison avec un traitement topique et une autre thérapie systémique. Si le traitement par PEC n'est pas disponible, l'utilisation de l'interféron seul ou associé à la PUVAthérapie et du méthotrexate peut être envisagée. Les autres traitements sont utilisés de préférence en deuxième ligne. Ils sont associés ou combinés à d'autres traitements (43). L'allogreffe de cellules souches est réalisée en dernier recours chez les jeunes patients.

2. Place de la CMF dans le diagnostic et dans le suivi du SS

2.1 Importance de la CMF dans le diagnostic et dans le suivi du SS

La CMF est une véritable aide à l'orientation diagnostique des différents lymphomes.

La détection et la quantification des CS sont évaluées au microscope sur frottis sanguins. Quelle que soit l'expérience du cytologiste, il reste difficile d'affirmer la présence de CS sur les seuls critères morphologiques. Les CS peuvent être observées en petit nombre dans le sang au cours de diverses dermatoses bénignes telles que l'eczéma, le psoriasis ou le parapsoriasis en plaque (36). Ce compte demeure très opérateur-dépendant.

L'analyse des réarrangements des gènes du récepteur T par biologie moléculaire permet d'identifier un clone T. C'est l'une des techniques de référence pour permettre le diagnostic du SS. Elle ne permet pas tout le temps d'identifier un clone.

La CMF peut également être utilisée afin de rechercher un clone T. Le panel d'anticorps anti-V β utilisé pour identifier le clone T permet d'identifier seulement 70 % des antigènes du TCR (44).

Dans le but d'aider au diagnostic du SS, la CMF identifie le phénotype des cellules des patients (45). Cette technique définit rapidement l'intensité d'expression d'un marqueur et le pourcentage de cellules concernées en utilisant un large panel d'anticorps. Les CS sont des lymphocytes T CD4+ qui ont perdu l'expression de certains marqueurs et sont caractérisées par l'apparition d'autres marqueurs (46).

De plus, un rapport CD4/CD8 ≥ 10 est retrouvé chez 48 à 88 % des patients atteints de SS (47). Cependant, près de 20 % des patients ayant une érythrodermie bénigne peuvent présenter eux aussi un rapport CD4/CD8 ≥ 10 .

Pour aider au diagnostic, l'ISCL a introduit des critères diagnostiques concernant la perte d'expression des marqueurs CD7 (48) et CD26 (49).

La CMF repère la population de cellules T malignes caractérisée par des cellules T CD4+/CD7- ou T CD4+/CD26-(50). Les critères retenus par l'ISCL sont les suivants :

- ✓ Lymphocytes T CD4+CD7- \geq à 40 % du total lymphocytaire
- ou
- ✓ Lymphocytes T CD4+CD26- \geq à 30 % du total lymphocytaire

Le CD7 est une glycoprotéine membranaire de la famille des immunoglobulines exprimée sur 85 à 90% des cellules T sanguines chez l'adulte sain, sur les NK, et sur les thymocytes.

Le CD26 est une protéase membranaire présente à la surface des cellules T périphériques, des cellules endothéliales et des cellules épithéliales. Cette protéine est impliquée dans la régulation immunitaire, la transduction de signal et l'apoptose.

Dans les études, les CS sont définies par la perte de CD7 et de CD26 et la monotypie du TCR V β . Bien que la grande majorité des lymphocytes T CD4+ sains soient CD26+ et CD7+, une petite partie de cellules normales peut avoir perdu l'expression de ces marqueurs : c'est le cas chez des patients ayant des dermatoses inflammatoires. (7,46,47,51,52). En l'absence de marqueurs plus spécifiques des CS, certaines cellules CD26- CD7- pourraient ne pas être malignes. Cela augmente donc faussement le nombre de cellules ayant un phénotype de type CS.

Plusieurs auteurs ont tenté d'identifier des marqueurs phénotypiques permettant d'individualiser les CS des autres cellules T non malignes (20,49,53,54). La complexité de cette pathologie est caractérisée par la variabilité d'expression de différents marqueurs. Certaines CS expriment des marqueurs retrouvés physiologiquement sur des cellules saines et inversement, certaines cellules saines expriment ou perdent l'expression de marqueurs retrouvés sur les CS. Egalement, de nombreux états inflammatoires et notamment des dermatoses impliquant des lymphocytes T induisent ou diminuent l'expression de ces marqueurs.

A titre d'exemple, des études montrent que la CS est un lymphocyte T mature exprimant CD2, CD3, CD4, CD5, TCR $\alpha\beta$, et n'exprimant pas CD8. Cependant, les CS peuvent perdre l'expression des marqueurs CD2, CD3, CD5.

L'identification de marqueurs spécifiques des CS serait une avancée pour diagnostiquer cette maladie.

Tout cela nous prouve qu'il n'existe pas de profil immunophénotypique spécifique du SS. L'immunophénotypage est d'autant plus délicat à interpréter que le nombre de CS est faible et qu'il pourrait exister plusieurs clones de CS chez un même patient. Cette hypothèse a été étudiée et serait peut être la cause de nombreuses rechutes de cette maladie (55). La combinaison de différents marqueurs faciliterait l'identification des cellules T malignes.

Concernant le suivi de la maladie, celui-ci peut être réalisé grâce à la CMF si un clone V β a été identifié. Dans le cas contraire, le suivi nécessite que le phénotype des CS soit stable dans le temps, ce qui n'est pas toujours le cas. En effet, Novelli *et al.* ont montré que quelques patients atteints de

SS n'expriment pas le même phénotype suite aux traitements administrés (56). Dans les cas où ce suivi est possible, Scarisbrick *et al.* ont publié des recommandations concernant l'analyse par CMF des taux de lymphocytes malins sanguins suite à la mise en place des traitements. Cela permet d'évaluer l'efficacité des traitements mis en place (57) (Annexe 3).

Nous allons étudier 3 marqueurs (CD158k, CD28 et CD279) afin d'évaluer si leur recherche simultanée permet une aide au diagnostic et au suivi de cette pathologie complexe.

2.2 Les différents marqueurs

2.2.1 Le KIR3DL2 : CD158k

Les KIR3DL2 sont des récepteurs exprimés par les lymphocytes NK et par certains lymphocytes T CD3+ CD8+.

La famille des KIR, à laquelle appartient KIR3DL2, interagit avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Cette interaction induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation ou à l'inhibition de fonctions cellulaires effectrices et immunorégulatrices. Ces récepteurs sont des homodimères. Chaque homodimère est constitué de différentes parties :

- ✓ Une partie extracellulaire composée de 3 domaines immunoglobuliniques ;
- ✓ Une partie transmembranaire ;
- ✓ Une partie intracellulaire qui contient des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) qui a un rôle inhibiteur.

Bagot *et al.* ont mis en évidence la présence de CD158k sur les CS (58) . Bouaziz *et al.* ont comparé l'expression de ce marqueur au niveau cutané entre des patients atteints de SS et des patients ayant une pathologie inflammatoire bénigne entraînant une érythrodermie (59). Ils ont montré que ce marqueur n'est pas exprimé de façon significative à la surface des cellules CD4+ chez les patients sains et chez les patients qui ont une pathologie inflammatoires bénigne. Une autre étude a évalué au niveau cutané par immunohistochimie l'expression de ce marqueur entre des patients atteints de SS et des patients ayant un MF à un stade précoce (60). Le marquage des cellules tumorales était positif pour les patients ayant un SS mais négatif pour les patients ayant un MF à un stade précoce.

L'expression de ce marqueur évaluée par CMF varie entre 65 et 97 % des patients chez les patients atteints de SS selon différentes études (61–63).

D'autres études montrent que pour la plupart des malades, le clone tumoral CD158k+ se retrouve aussi bien dans le sang que dans la peau (60). En cas de rémission clinique, ce marqueur serait absent (64).

Deux axes de recherche sont à aborder pour le CD158k :

- ✓ son intérêt en tant que facteur pronostique pour l'évolution du SS ;
- ✓ sa présence après la mise en place de différentes thérapeutiques.

Au-delà de l'utilité diagnostique de ce marqueur, nous ne savons pas si ce récepteur a la même fonction sur les CS que sur les lymphocytes NK. Etant donné que ce récepteur est exprimé sur les CS mais pas sur les lymphocytes T CD4+ sains, leur rôle dans la prolifération et dans la résistance à l'apoptose reste à étudier (64). De plus, de nouvelles thérapeutiques dirigées contre ce marqueur sont en cours d'essai pour cibler spécifiquement les cellules tumorales (65).

2.2.2 Le CD28

Le CD28 est un homodimère de 44 kDa. Le CD28 est un récepteur qui se lie au CD80 et au CD86. Il a un rôle très important dans les interactions des lymphocytes B et T. Il est impliqué dans l'initiation et dans la régulation d'une voie de transduction de signal différente de celle stimulée par le TCR.

CD28 est exprimé sur les cellules T naïves. A ce stade, sa liaison avec la molécule B7 va permettre de stimuler la prolifération des lymphocytes T. Au cours du processus de différenciation des cellules T en cellules mémoires effectrices, l'expression de CD28 diminue. Il n'est donc pas exprimé à la surface des lymphocytes T mémoires effecteurs.

CD28 et CTLA4 (cytotoxic antigen T lymphocyte 4) sont des co-récepteurs présents à la surface des cellules T. Ils ont des effets opposés sur l'activation des cellules T. Dans les cellules saines, l'activation de CD28 stimule la prolifération cellulaire. A l'inverse l'activation de CTLA4 inhibe la prolifération cellulaire. Or CTLA4 lie les ligands avec une affinité et une avidité plus importante que CD28 (66,67).

A la surface des cellules tumorales, Sekulic *et al.* ont mis en évidence la fusion de CTLA4 et de CD28. Lorsque la partie extracellulaire de CTLA4 est fusionnée avec la partie intracellulaire de CD28, l'inhibition exercée au préalable par CTLA4 est levée. Cela entraîne donc la prolifération des cellules malignes (68). La découverte de cette mutation a permis le développement d'une nouvelle molécule, l'Ipilimumab. Cette molécule est un anticorps anti-CTLA4 qui inhibe ce signal pro-oncogénique. Un seul patient ayant un SS a été testé ne permettant pas de conclure quant à l'efficacité de ce médicament.

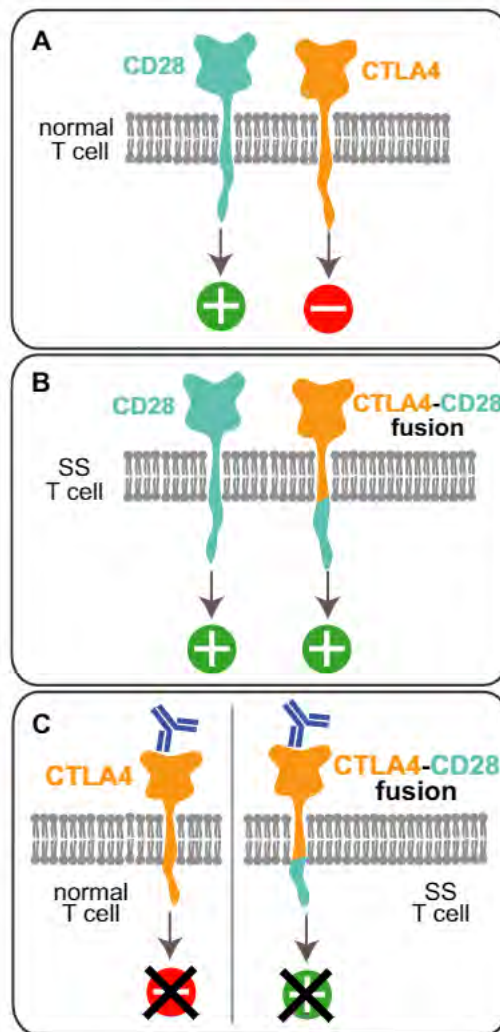


Figure 3 : Mécanisme d'action de l'Ipilimumab d'après Sekulic *et al.* (69).

(A) : Dans les cellules saines, CD28 stimule la prolifération cellulaire tandis que CTLA4 l'inhibe.

(B) : Dans les CS, la fusion de la partie extracellulaire de CTLA4 avec la partie intracellulaire de CD28 lève l'inhibition de la prolifération cellulaire engendrée auparavant par CTLA4.

(C) L'Ipilimumab, un anticorps anti-CTLA4 inhibe les signaux médiés par CTLA4 dans les cellules saines ainsi que dans les CS lorsque CTLA4 est fusionné à CD28.

La fusion concerne la partie extracellulaire de CTLA4 avec la partie intracellulaire de CD28. Dans le cadre de notre travail, nous supposons que cette fusion entraîne également une perte d'expression de la partie extracellulaire de CD28 à la surface des cellules malignes. Nous allons étudier si l'expression de CD28 est diminuée à la surface des CS.

2.2.3 Le CD279

CD279 est également connu sous le nom de PD-1 (programmed cell death 1). Cette glycoprotéine transmembranaire est un récepteur immunomodulateur. Elle est exprimée par différentes cellules telles que les cellules T activées, et les cellules B. Elle contient un motif ITIM dans sa région intracytoplasmique. L'interaction avec ses ligands (CD273 et CD274) entraîne l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et de la sécrétion de cytokines. Des publications étudiant l'expression de PD-1 en immunohistochimie sur des biopsies de peau montrent que l'expression de ce marqueur est significativement augmentée chez les patients atteints de SS en comparaison avec les patients ayant un MF et avec les patients sains. A l'inverse, d'autres publications montrent que ce marqueur est également fortement exprimé dans le MF (24,70–72).

L'expression de ce marqueur a également été étudiée à partir de biopsies cutanées chez des patients ayant des pathologies inflammatoires bénignes et chez des patients atteints de SS. Une expression augmentée de ce marqueur est plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de SS (73).

L'expression de PD-1 sur les lymphocytes malins a été étudiée en cytométrie en flux. *Horna et al.* n'ont pas mis en évidence de différence significative entre les patients atteints de MF et de SS. En revanche, il existe une augmentation significative de l'expression de PD-1 sur la population de lymphocytes malins dans le SS et le MF en comparaison avec les lymphocytes T CD4+ issus de patients sains (74). *Samimi et al.* ont mis en évidence une augmentation de l'expression de PD-1 chez les patients ayant un SS en comparaison avec les lymphocytes T CD4+ des patients atteints de MF et des patients sains (75).

2.3 Objectif

L'objectif principal de cette étude est d'établir une méthode d'aide au diagnostic du SS par CMF en évaluant les critères internationaux dans notre pratique courante et en y associant l'expression de nouveaux marqueurs (CD158k, CD279, CD28).

L'objectif secondaire de ce travail est d'étudier la répartition de ces marqueurs membranaires sur les cellules de patients afin de distinguer plusieurs classes phénotypiques de SS.

3. Patients et méthode

3.1 Patients

Tous les patients de cette étude rétrospective ont été vus au CHU de Toulouse. Les diagnostics ont été posés par les cliniciens, en accord avec l'ensemble des données bio-cliniques, notamment l'évaluation anatomo-pathologique d'une biopsie cutanée, lorsque cela a été nécessaire. Les échantillons sanguins des patients ont été prélevés sur tube EDTA. Au total, 426 prélèvements distincts ont été analysés pour suspicion clinique de lymphome T cutané ou prolifération de lymphocytes T CD4+, selon les critères du laboratoire (hyperlymphocytose et ratio CD4/CD8>10).

Ces prélèvements concernent 290 patients inclus dans l'étude : 98 femmes et 192 hommes. Parmi ces patients on retrouve 21 cas de SS (soit 7,2 %), 38 cas de MF (13,1 %), 38 cas d'hémopathies lymphoïdes T CD4+ (13,1 %) ainsi que 193 patients non atteints de SS, de MF ou de lymphome T cutané (66,6 %). Les inclusions ont eu lieu sur la période de janvier 2015 à décembre 2018. Leur âge est compris entre 14 et 101 ans pour une moyenne de 66 ans.

3.2 Méthode

3.2.1 Cytologie

Les numérations et les formules sanguines ont été réalisées sur les automates XN 2000 Sysmex® au CHU de Toulouse, à partir de prélèvements sanguins sur des tubes EDTA. Les frottis sanguins ont été réalisés par l'automate SP-10 de Sysmex®. Cet automate permet d'étaler et de colorer au MGG les lames afin de réaliser l'étude morphologique des cellules. La recherche de CS est faite au microscope par un technicien d'hématologie et validée par un biologiste.

3.2.2 Cytométrie en flux multiparamétrique

Un volume de 100 µL de sang total EDTA est additionné à un mélange d'anticorps couplés à des fluorochromes (Tableau 5) et incubé à température ambiante pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Puis, ce mélange est centrifugé 5 minutes à 1500 tours/minutes. L'ajout de 2 mL de tampon de lyse au culot cellulaire permet de lyser les globules rouges. Ce tampon est obtenu en diluant au 1/10^{ième} la solution BD FACS lysing solution 10X. Le culot cellulaire et la solution de lyse sont incubés 10 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante, puis centrifugés 5 minutes à 1500 tours/minutes. Puis, 2 mL de Cell Wash sont ajoutés au culot cellulaire et une nouvelle centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment. Les cellules lavées sont remises en

suspension dans 250 μL de Cell Wash. L'acquisition est réalisée sur au moins 40 000 événements sur un cytomètre NAVIOS® (BECKMAN COULTER®), puis l'analyse des données est effectuée à l'aide du logiciel Kaluza®.

Tableau 5 : Liste des anticorps couplés à leurs fluorochromes utilisés

Fluorochrome	Cible	Volume (μL)	Canal
FITC	CD26	20	FL1
PE	CD158	10	FL2
PECF594	CD28	5	FL3
PerCP 5.5	CD7	5	FL4
PC7	CD4	2	FL5
APC	CD30	5	FL6
AA700	CD3	5	FL7
AA750	CD8	5	FL8
BV421	CD279	5	FL9
BV510	CD45	5	FL10

3.2.3 Stratégie de fenêtrage des cellules d'intérêt

➤ Expression du CD4 par les lymphocytes T

Les agrégats cellulaires appelés doublets sont d'abord éliminés selon les pratiques usuelles du laboratoire (Figure 4A). Les paramètres mesurés en CMF sont :

- ✓ la réfraction de la lumière à 90° (Side Scatter = SSC) qui nous informe sur la granularité de la cellule ;
- ✓ la diffusion de la lumière dans l'axe (Forward Scatter = FSC) qui nous renseigne sur la taille de la cellule.

Les leucocytes sont ciblés sur la population CD45+, ce qui permet d'éliminer les débris cellulaires, les plaquettes et les globules rouges non lysés. Les lymphocytes sont ciblés sur le graphe bi-paramétrique CD45+/SSC. Ils expriment fortement le CD45 (nuage bleu foncé, Figure 4B). De cette population sont exclus les monocytes qui expriment faiblement le CD4.

Dans le cadre de cette étude, la population de lymphocytes d'intérêt est ciblée en utilisant les marqueurs CD3 et CD4. Trois sous-populations de lymphocytes sont identifiées :

- ✓ les lymphocytes CD3+ CD4- (qui correspondent aux lymphocytes T CD8+ et T CD4- CD8-). Les lymphocytes T CD8+ peuvent également être exclus en ciblant la population de lymphocytes CD3+ CD8+ ;
- ✓ les lymphocytes CD3-CD4- (qui correspondent aux lymphocytes B CD19+ et aux NK) ;
- ✓ les lymphocytes CD3+ CD4+ qui représentent notre population de lymphocytes T d'intérêt.

Les lymphocytes NK qui sont obligatoirement CD3- ne sont donc pas pris en compte dans notre population d'intérêt.

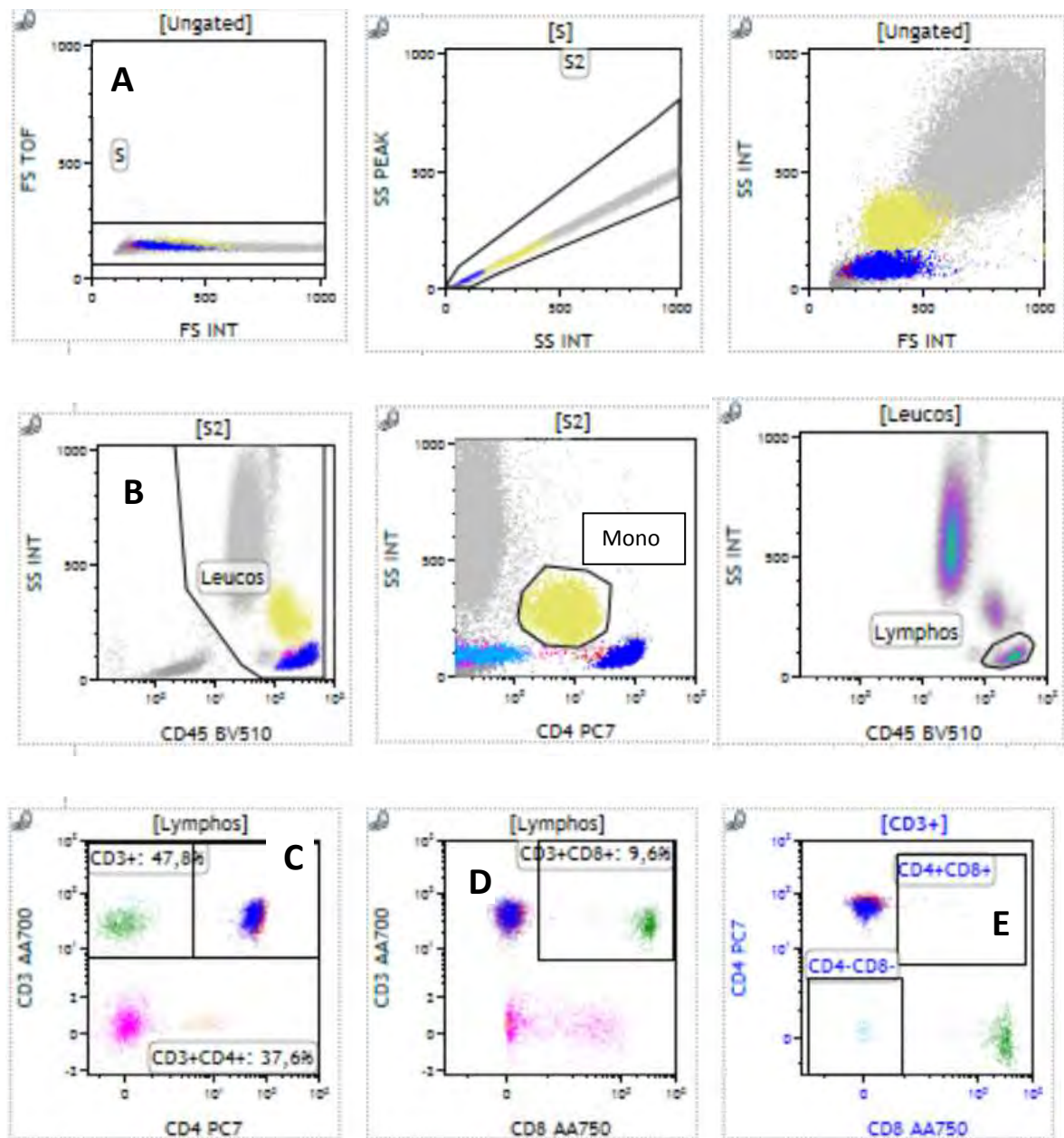


Figure 4 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total.

Les doublets sont éliminés (A). A partir du fenêtrage des leucocytes totaux, les monocytes sont identifiés puis les lymphocytes (B). Parmi les lymphocytes, les lymphocytes T CD3+CD4+ sont sélectionnés (C) tandis que les lymphocytes T CD3+CD8+ (D), les lymphocytes CD4-CD8- et les lymphocytes CD4+CD8+ sont exclus (E) de l'étude.

➤ **Perte d'expression du CD26 et du CD7**

D'après les critères diagnostiques internationaux reconnus par l'ISCL et l'EORTC depuis 2007 cités précédemment, nous avons choisi de cibler la population de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7+/- . Cette population correspond phénotypiquement aux CS.

A partir des lymphocytes totaux puis des lymphocytes CD3+CD4+, deux sous populations sont identifiées :

- ✓ les lymphocytes CD4+CD7- ;
- ✓ les lymphocytes CD4+CD26- .

Enfin, à partir des lymphocytes CD3+CD4+ uniquement, les lymphocytes CD26- et CD7+/- sont identifiés.

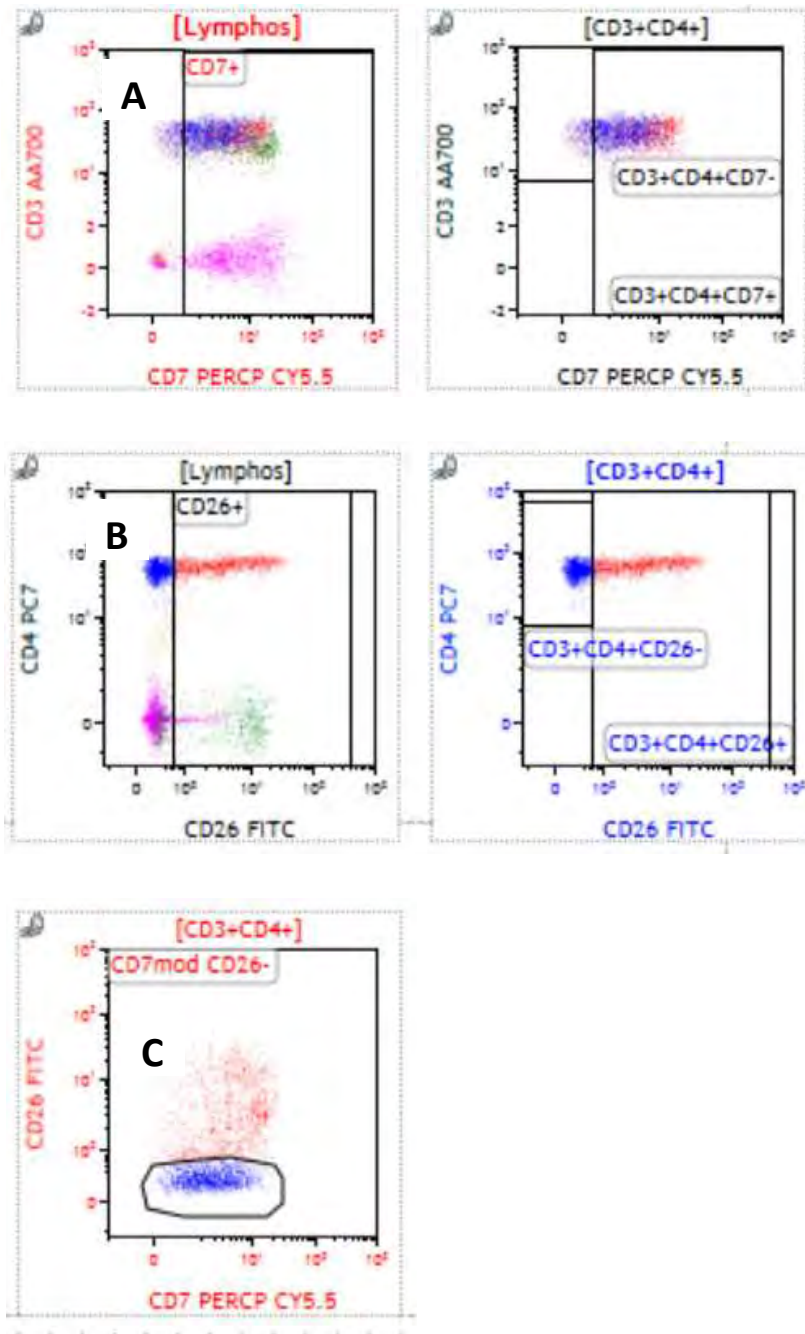


Figure 5 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires de phénotype CD3+CD4+CD26-CD7+/- à partir de sang total.

A partir du fenêtrage des lymphocytes totaux et des lymphocytes T CD3+CD4+, les taux de cellules CD3+CD7- (A) et les cellules CD4+CD26- (B) sont quantifiés. Enfin, parmi les lymphocytes T CD3+CD4+ les cellules n'exprimant pas le CD26 et exprimant +/- le CD7 ont été sélectionnées (C).

➤ **Expression des nouveaux marqueurs par les CS**

Suite aux résultats publiés par Bahler *et al.*, nous avons choisi d'étudier l'expression de CD158k exprimée par les CS (63). Nous avons également sélectionné le CD279 suite aux travaux de Kantekure *et al.* (72). A l'inverse, suite à l'étude publiée par Sekulic *et al.* nous avons émis l'hypothèse que nous retrouverions une diminution d'expression de CD28 (69).

L'expression de ces différents marqueurs a été analysée par CMF multiparamétrique à l'aide du logiciel Kaluza®. L'expression de chacun de ces marqueurs a été représentée en fonction des cellules CD3+ soit sur les lymphocytes totaux, soit sur les lymphocytes CD3+CD4+, soit sur les CS (CD3+CD4+CD26-CD7-/lo).

L'expression du CD158k en fonction du CD279 ou encore l'expression du CD158k en fonction du CD28 parmi la population CD3+CD4+ a également été représentée.

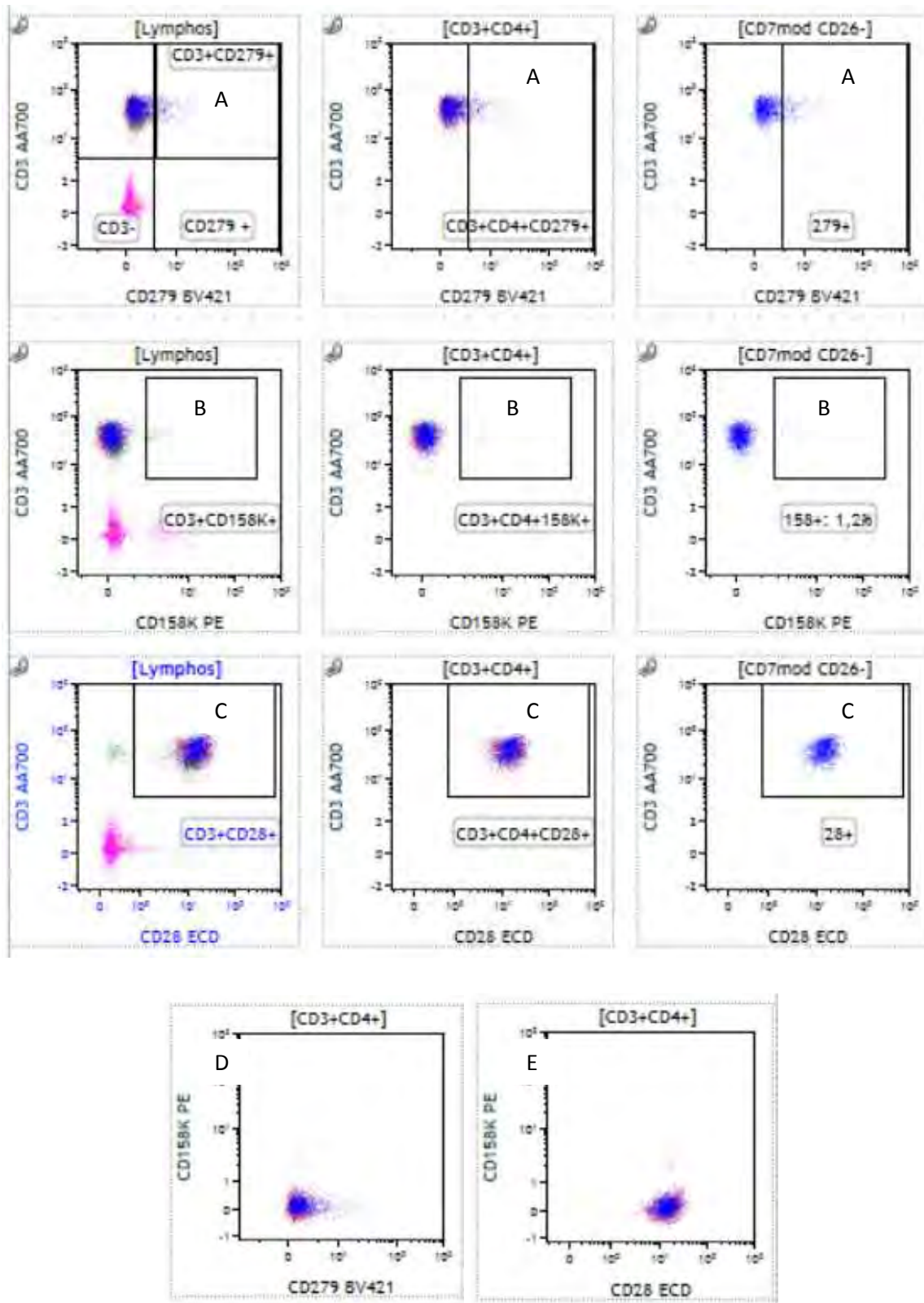


Figure 6 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total.

A partir du fenêtrage des lymphocytes totaux, des lymphocytes T CD3+CD4+ et des lymphocytes T CD26-CD7+/-, les cellules n'exprimant pas les marqueurs CD279 (A), CD158k (B) et CD28 (C) sont

ensuite exclues. Parmi la population de lymphocytes T CD3+CD4+, l'expression de CD158k en fonction de CD279 (D) et de CD28 (E) a été étudiée.

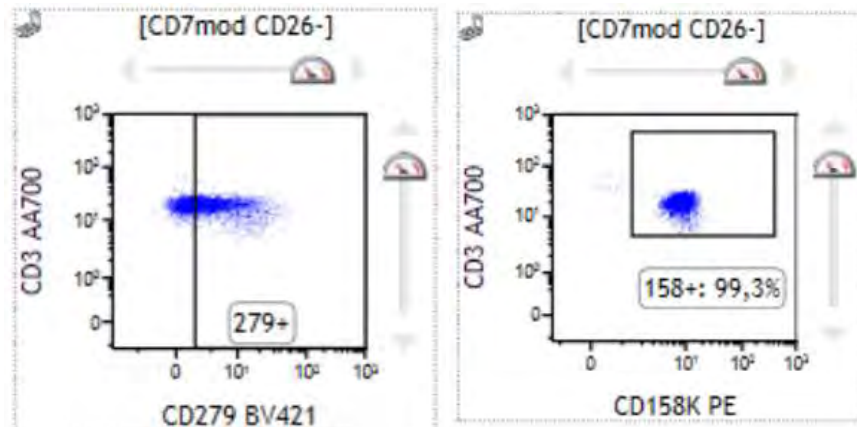


Figure 7 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total d'un patient atteint d'un SS.

Dans cet exemple, nous pouvons observer une population de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 mod exprimant CD279 et CD158k.

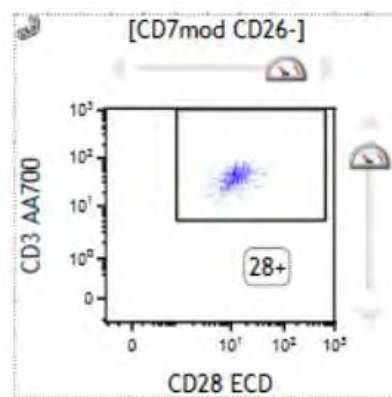


Figure 8 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total d'un patient atteint de MF.

Sur ce graphe, nous pouvons voir une population de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 mod exprimant CD28.

➤ Clonalité T

Lorsqu'une population de CS importante est mise en évidence, une recherche de clonalité T est faite par cytométrie en flux, en quantifiant l'expression des V β . En cas de surexpression d'un sous-type V β , celui-ci est quantifié dans le but de suivre la maladie résiduelle. La population de lymphocytes T

CD3+CD4+ est identifiée. Puis, la population de cellules clonales identifiable grâce à l'expression de la chaîne V β de son TCR est mise en évidence parmi les lymphocytes totaux et parmi les lymphocytes T CD3+CD4+.

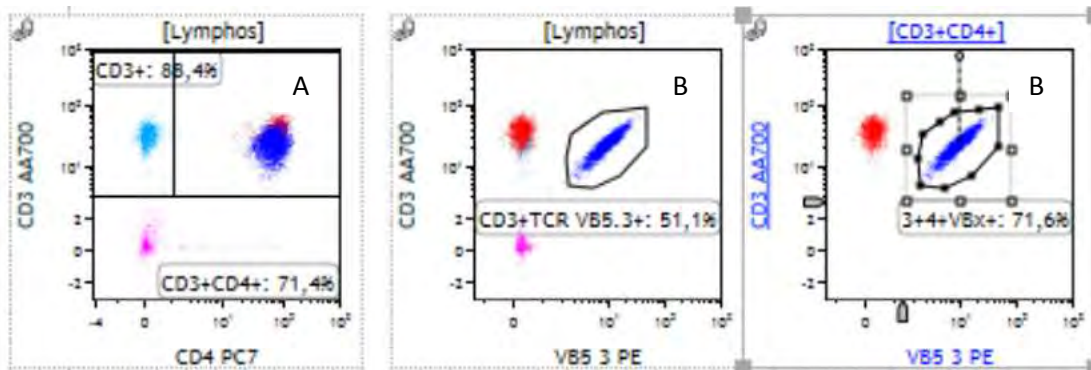


Figure 9 : Stratégie de fenêtrage des sous-populations lymphocytaires à partir de sang total.

Suite au fenêtrage des lymphocytes T CD3+CD4+ (A), les cellules exprimant le V β correspondant au clone identifié sont incluses (B).

➤ Tests statistiques

La comparaison des pourcentages d'expression de chaque marqueur par les différentes sous-populations lymphocytaires a été réalisée à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

Les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) ont été construites à l'aide du logiciel Tanagra pour chaque marqueur étudié. L'AUC (Area under the curve) calculée est spécifiée. Elle permet d'établir le meilleur paramètre diagnostique.

4. Résultats

4.1 Caractéristiques des patients inclus dans la cohorte

Au total, 426 prélèvements de 290 patients ont été analysés. 21 patients font partie du groupe ayant un SS, 38 patients ont un MF, 38 patients ont un lymphome T cutané autre qu'un SS ou un MF et 193 patients n'ont pas de lymphome T cutané et représentent donc le groupe contrôle.

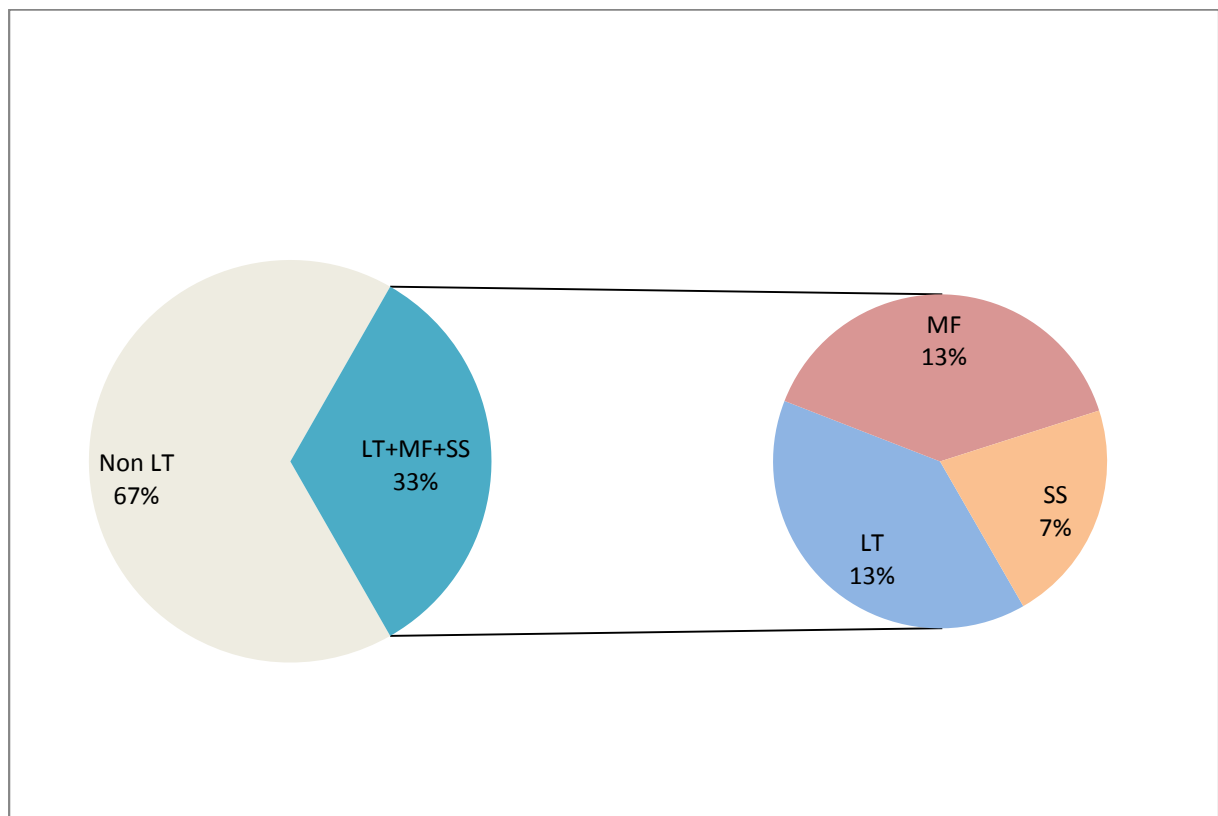


Figure 10 : Répartition des patients en fonction de leur diagnostic au sein de la cohorte d'étude

Dans le groupe SS, l'âge médian est de 83 ans, le ratio homme/femme est de 2,8.

Dans le groupe MF, l'âge médian est de 71 ans et le ratio homme/femme est de 4,43.

Dans le groupe des autres lymphomes T cutanés l'âge médian est de 67 ans et le ratio homme/femme est de 3,2.

Dans le groupe non LT, l'âge médian est de 67 ans et le ratio homme/femme est de 1,54.

Certains patients ont été prélevés plusieurs fois au cours de leur suivi. Le pourcentage de patients ayant eu un nombre de prélèvements donné est indiqué dans le diagramme ci-dessous (figure 11).

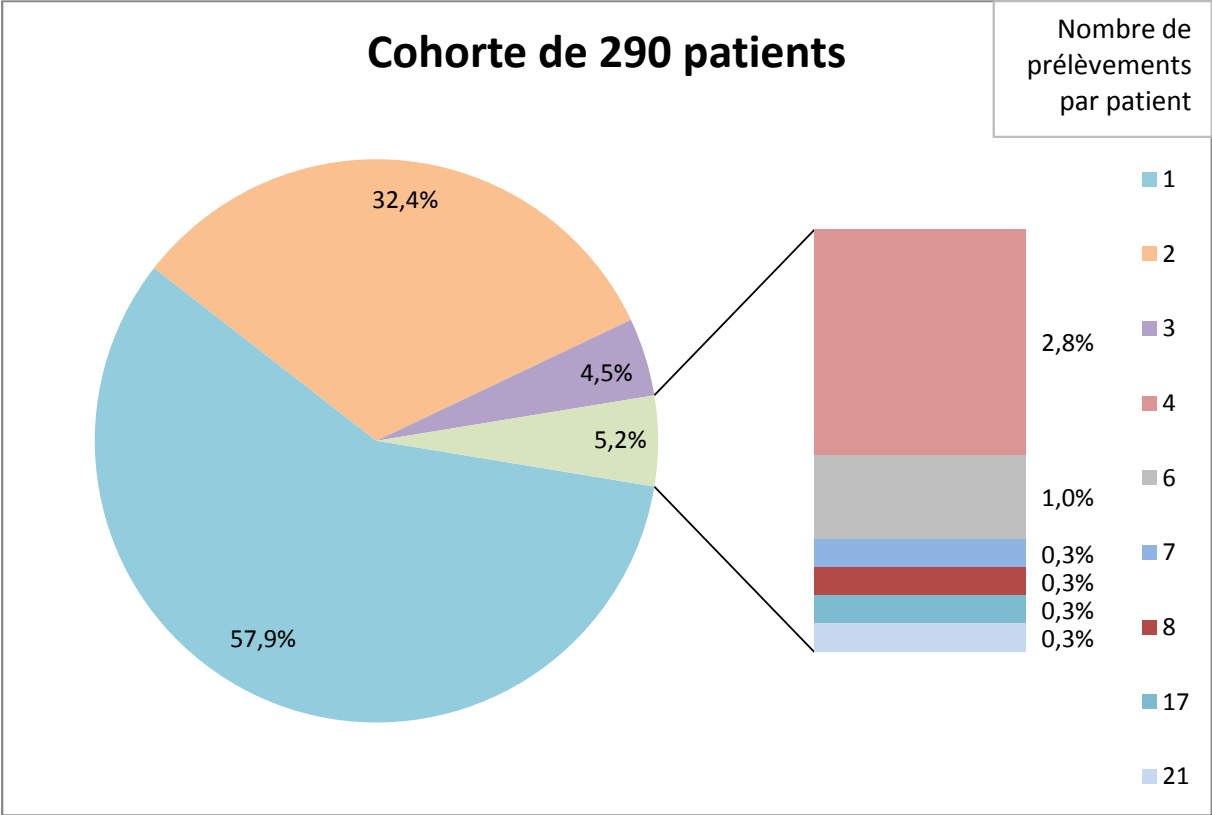


Figure 11 : Pourcentage de patients ayant eu un nombre donné de prélèvements

Plus de 50 % des patients n’ont qu’un seul prélèvement. Les patients SS sont généralement suivis au cours du temps et ont un nombre de prélèvements plus important (figure 12).

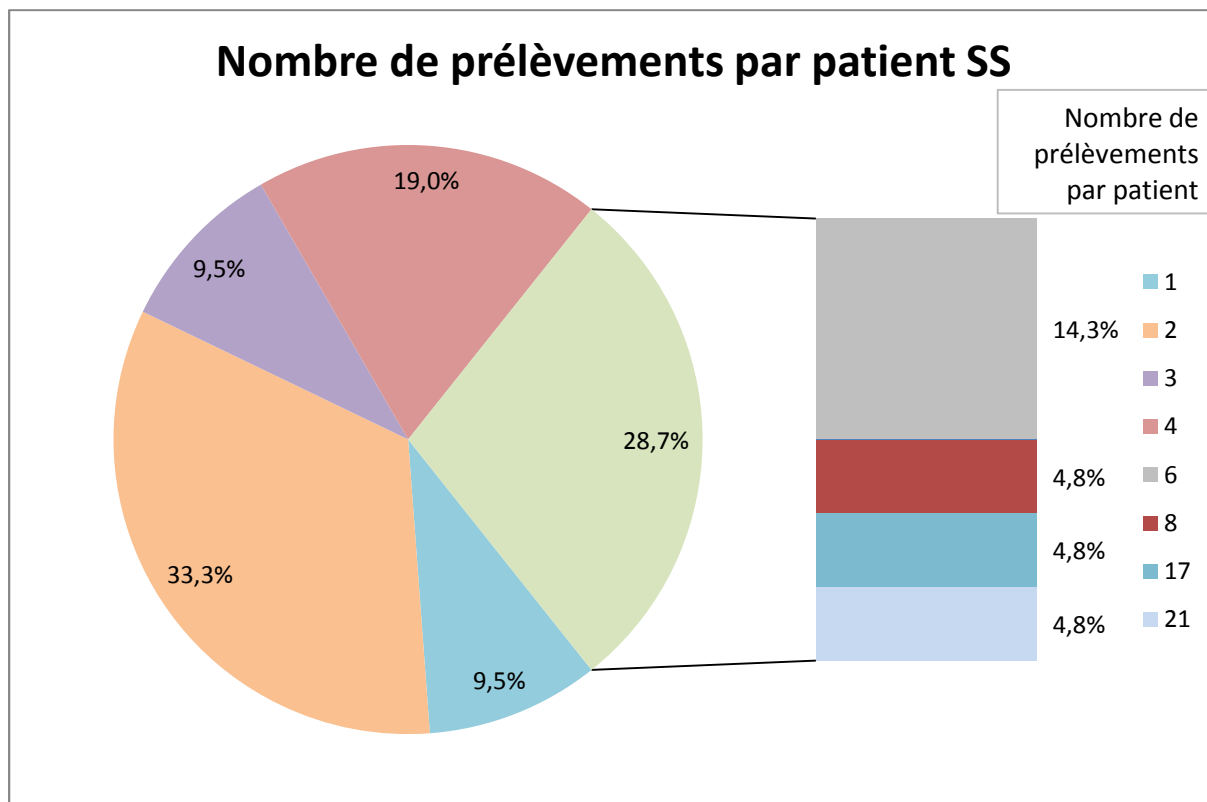


Figure 12 : Pourcentage de patients ayant un SS associé au nombre de prélèvements effectués.

Parmi les 21 patients SS, seulement 18 sont utilisés pour la suite de l'étude. Les 3 patients exclus ont des diagnostics trop antérieurs à la date de leur premier prélèvement dans l'étude.

4.2 Evaluation du taux de lymphocytes en fonction des différents groupes de patients

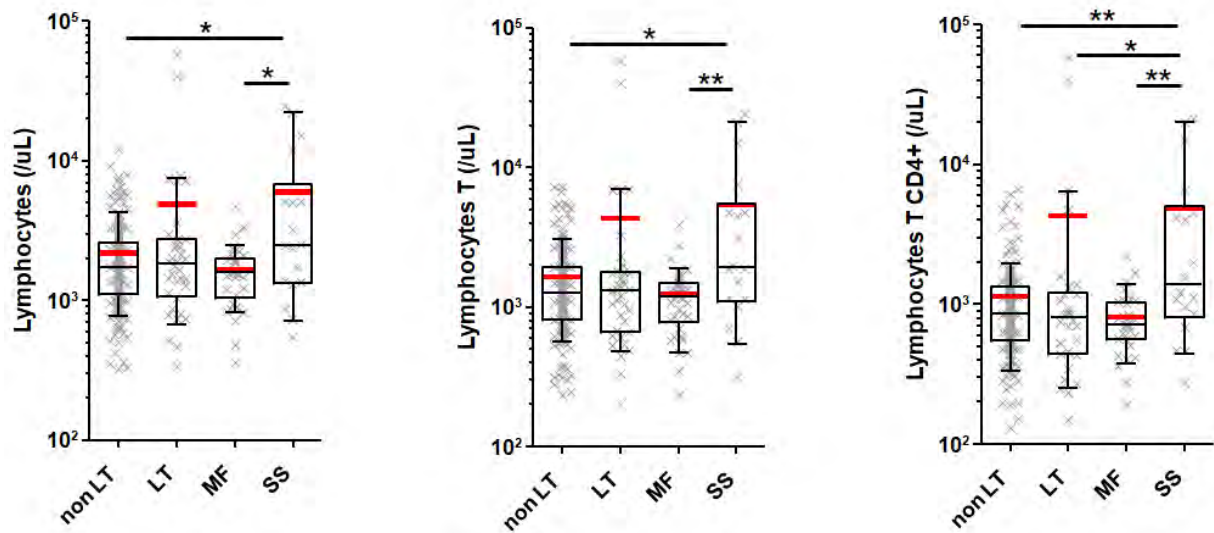


Figure 13 : Taux de lymphocytes dans les différents groupes étudiés.

Les différentes analyses statistiques ont été faites avec le test de Mann-Whitney. Chaque croix représente un patient. En rouge est représentée la moyenne de chaque groupe.

Les patients SS ont statistiquement un taux plus élevé de lymphocytes et de lymphocytes T par rapport aux groupes ayant un MF et ceux n'ayant pas de lymphome T. Les patients SS ont un taux de lymphocytes T CD4+ plus élevé par rapport aux autres groupes de patients. Cette différence est d'autant plus importante quand on compare le groupes SS au groupe MF et le groupe SS au groupe non LT (figure 13).

4.3 Evaluation des critères diagnostiques définis par l'ISCL

4.3.1 Evaluation du ratio CD4/CD8 en fonction des groupes de patients

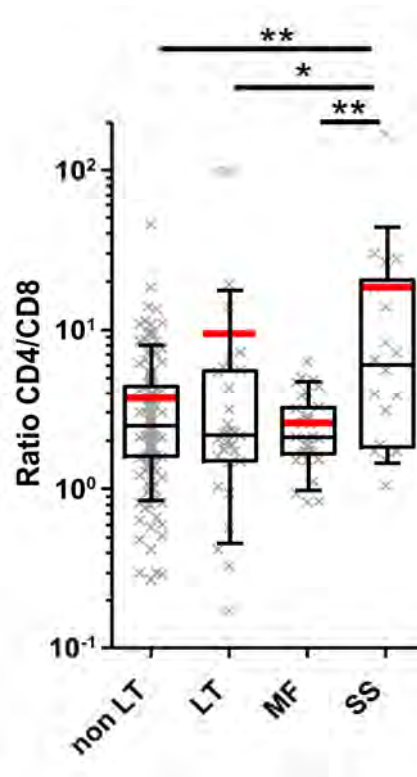


Figure 14 : Ratio CD4/CD8 dans les différents groupes étudiés.

Le ratio CD4/CD8 est plus élevé chez les patients SS en comparaison avec les autres groupes de patients, et surtout en comparaison avec les patients MF et non LT (figure 14). Cela est en accord avec les critères diagnostiques de l'EORTC indiquant qu'un ratio ≥ 10 est en faveur d'un SS. Lorsqu'on fixe le seuil de positivité du ratio CD4/CD8 supérieur ou égal à 10, la valeur prédictive positive (VPP) est de 43 % et la valeur prédictive négative (VPN) est de 93 % quand on compare les patients SS *versus* non LT.

La première étape consiste à définir le pourcentage de cellules malignes au sein de la population lymphocytaire T CD4+. Le pourcentage est défini par les lymphocytes CD3+CD4+CD26-. Comme vu précédemment, les recommandations de l'ISCL montrent qu'un pourcentage de lymphocytes CD3+CD4+CD26- ≥ 30 % est un argument en faveur d'un SS. Nous avons évalué ce pourcentage ainsi que le taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-/ μ L dans les différentes catégories de patients.

4.3.2 Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26- en fonction des groupes de patients

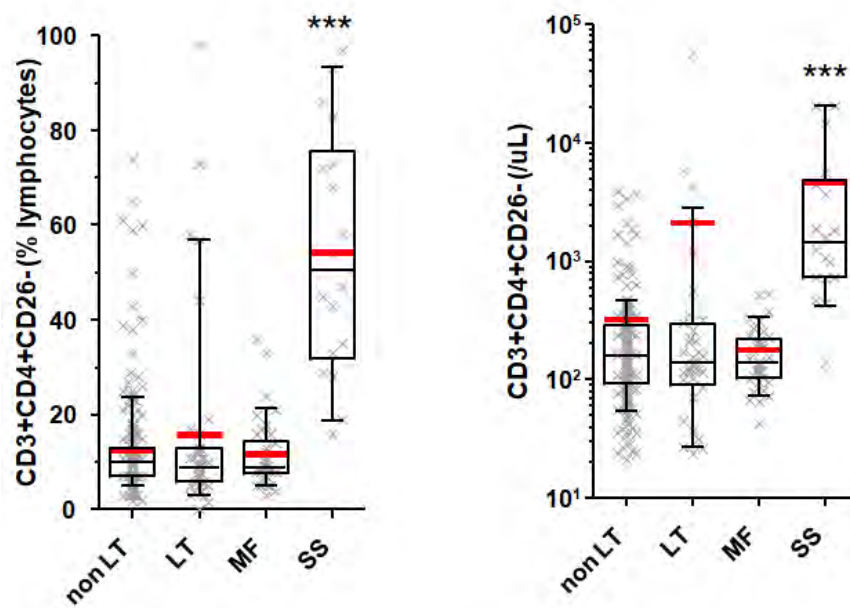


Figure 15 : Comparaison des pourcentages et du nombre de lymphocytes CD3+CD4+CD26-

Le pourcentage et le nombre de lymphocytes CD3+CD4+CD26-/μL sont augmentés chez les patients SS en comparaison avec les autres patients (figure 15). En appliquant un seuil à 30 % de lymphocytes CD3+CD4+CD26-, on obtient une VPP à 56 % et une VPN à 98 %.

4.3.3 Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD7- en fonction des groupes de patients

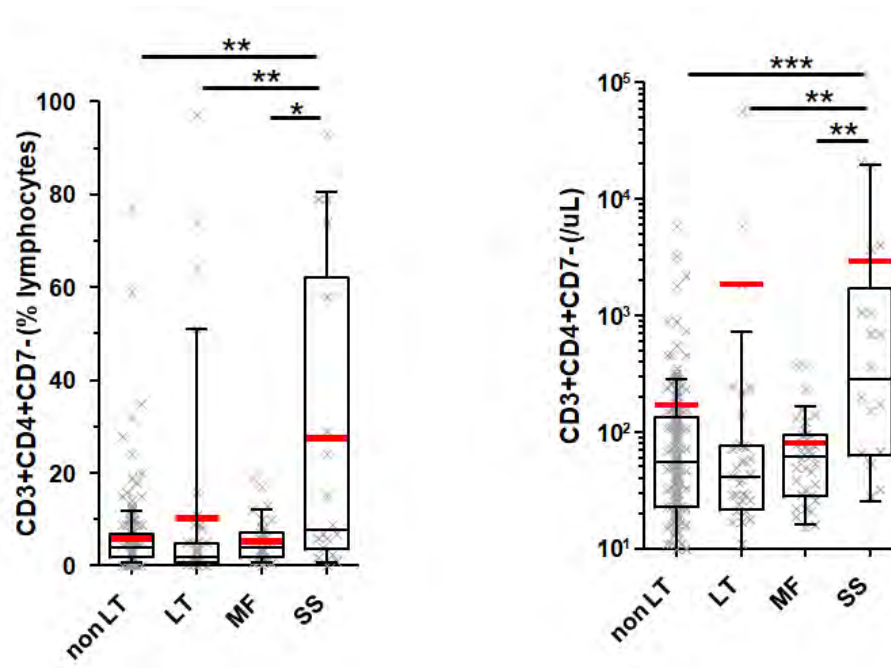


Figure 16 : Comparaison des pourcentages et du nombre de lymphocytes CD3+CD4+CD7-

Nous avons étudié le pourcentage et le nombre de lymphocytes CD3+CD4+CD7-/μL. Nous observons une augmentation de cette population lymphocytaire au sein du groupe SS en comparaison avec les autres patients (figure 16). Les recommandations de l'ISCL montrent qu'un pourcentage de lymphocytes CD3+CD4+CD7- ≥ 40 % est un argument en faveur d'un SS. Lorsque nous respectons ces seuils, nous obtenons une VPP de 71 % et une VPN de 94 %. Bien que l'on retrouve une augmentation de cette population lymphocytaire au sein du SS, ces seuils restent insuffisants pour établir un diagnostic. Ils permettent en revanche d'éliminer avec quasi-certitude le diagnostic de SS lorsque le seuil n'est pas atteint.

4.3.4 Evaluation des performances diagnostiques des différents paramètres

Nous avons calculé les courbes ROC (Receiver Operating Characteristic) pour déterminer les paramètres ayant les meilleures performances diagnostiques entre le groupe SS et le groupe non LT (figure 17).

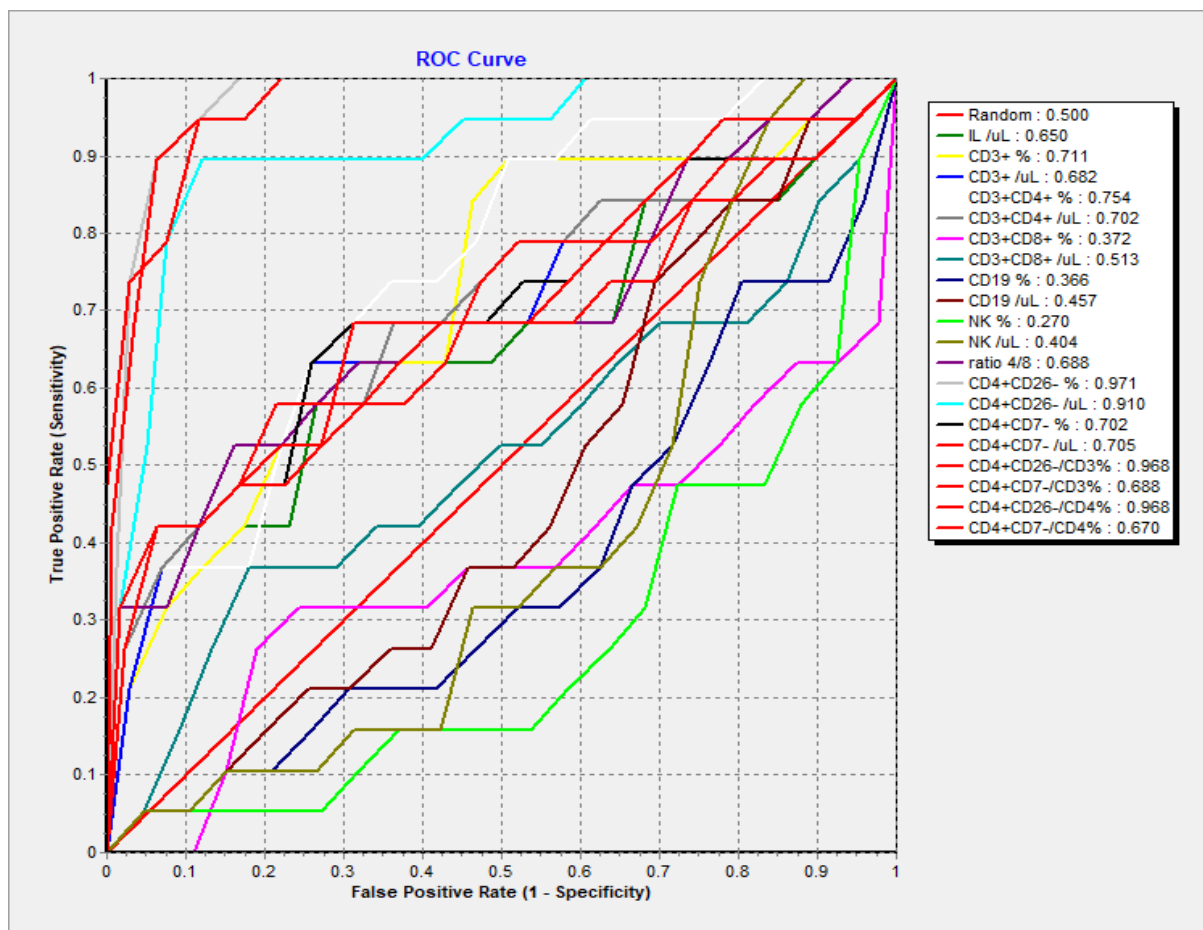


Figure 17 : Courbes ROC et AUC correspondantes pour les différents paramètres

Le pourcentage de cellules CD4+CD26- est le paramètre ayant les meilleures performances diagnostiques. Le pourcentage de cellules CD4+CD26-/CD4+, le pourcentage de cellules CD4+CD26-/CD3+ et le taux de cellules CD4+CD26-/μL présentent également de bonnes performances diagnostiques. Ces paramètres peuvent être utilisés pour aider au diagnostic.

4.3.5 Evaluation des seuils des différents paramètres

Nous avons utilisé la méthode de Fayyad et Irani (76) afin d'établir les seuils diagnostiques pour chaque paramètre entre la cohorte de patients SS et non LT. Ces résultats sont en accord avec les recommandations de l'ISCL. Le seuil pour le ratio CD4/CD8 est calculé à 13,7 (contre 10 selon les recommandations de l'ISCL). Le seuil de cellules CD4+CD26- est fixé à 27,5 % (contre 30 % selon les recommandations de l'ISCL) et le seuil de cellules CD4+CD7- est fixé à 36 % (contre 40 % selon les recommandations de l'ISCL). Nos seuils correspondent bien aux recommandations de l'ISCL.

Dans un second temps, afin de différencier les patients ayant un SS des autres patients, nous avons évalué l'expression de CD158k, de CD279 et de CD28 au sein de la population de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible.

4.4 Evaluation de l'expression des différents marqueurs en fonction des groupes de patients

4.4.1 Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD28-

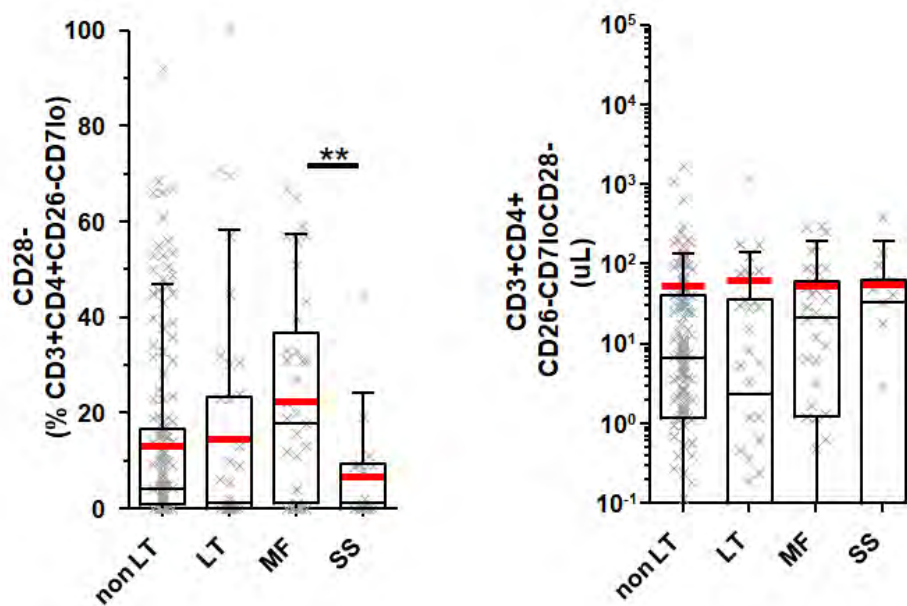


Figure 18 : Comparaison des pourcentages et des taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD28-

Une augmentation du pourcentage de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD28- est retrouvée au sein du groupe de patients MF en comparaison avec les patients SS (figure 18). Aucune différence statistiquement significative n'est retrouvée quand on compare le taux de cellules CD3+ CD4+ CD26-CD7 faible CD28 - entre les différents groupes de patients.

4.4.2 Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+

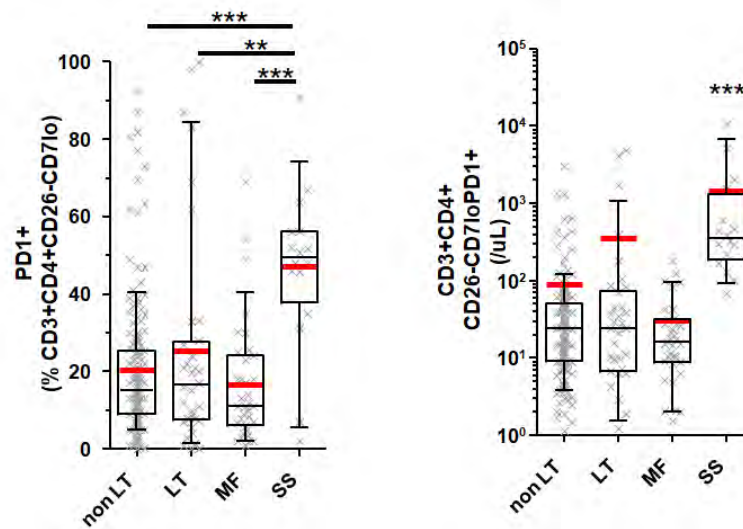


Figure 19 : Comparaison des pourcentages et des taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+

Le pourcentage d'expression et le taux de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+ est augmenté chez les patients SS en comparaison avec les autres groupes (figure 19). De tels résultats sont similaires à ceux montrés par Samimi *et al.* (75).

4.4.3 Evaluation du pourcentage et du nombre de cellules CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+

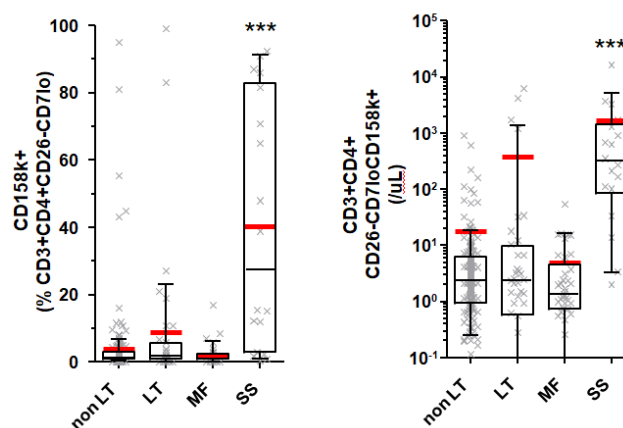


Figure 20 : Comparaison des pourcentages et des taux de lymphocytes CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+

Concernant le pourcentage d'expression de CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+, celui-ci est significativement augmenté chez les patients ayant un SS (figure 20). Cela est en accord avec les différentes études citées précédemment.

4.4.4 Evaluation des performances diagnostiques du pourcentage et du nombre de cellules CD158k+, PD-1+ ou CD28-

Nous avons ensuite évalué pour chacun des 3 marqueurs la courbe ROC et les seuils diagnostiques.

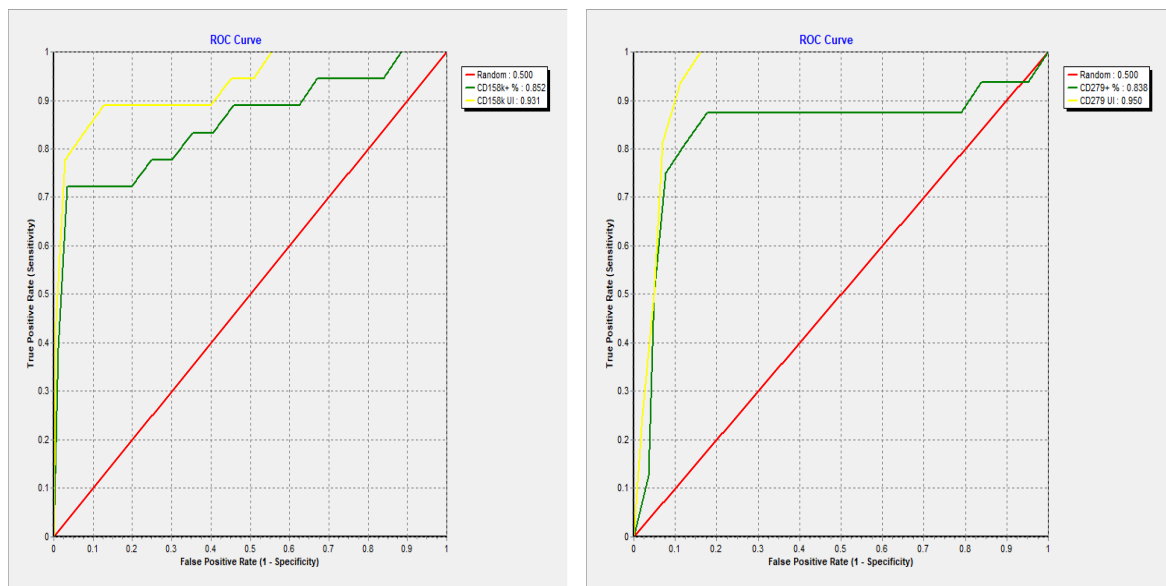


Figure 21 : Courbes ROC des pourcentages et des taux de cellules CD158k+ et de cellules CD279+

Le seuil diagnostique est fixé à 12 % et 99 cellules/ μ L pour les cellules CD158k+ et à 44 % et 66 cellules/ μ L pour les cellules PD-1 selon la méthode de discrétisation de Fayyad et Irani (76).

D'après les courbes ROC, le pourcentage et le taux de cellules CD158k+ et PD-1+ présentent de bonnes performances diagnostiques et peuvent contribuer au diagnostic (figure 21).

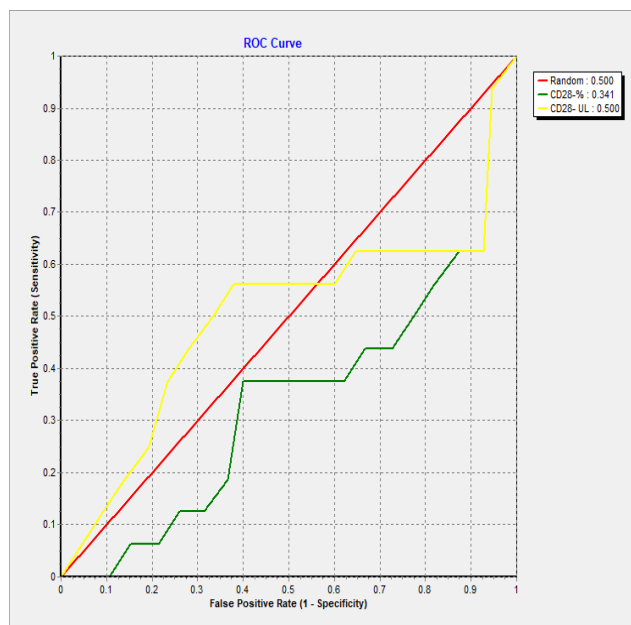


Figure 22 : Courbe ROC des pourcentages et des taux de cellules CD28-

En revanche, le pourcentage et le taux de cellules CD28- ne présentent pas de bonnes performances diagnostiques (figure 22). Il ne peut donc pas être utilisé comme un argument diagnostique dans le SS.

4.4.5 Établissement d'un score diagnostique en fonction des résultats des performances diagnostiques

Afin d'aider au diagnostic du SS, nous avons établi un score diagnostique en fonction des AUC des courbes ROC (tableau 6). Le score maximal est de 12.

Tableau 6 : Score en fonction des performances diagnostiques des différents marqueurs

Item	seuil	AUC	score
CD4+CD26-	>30 % des lymphocytes	0.971	3
CD4+CD26-	>450/ μ L	0.910	2
CD4+CD7-	>40 % des lymphocytes	0.702	0.5
CD4+CD7-	>350/ μ L	0.705	0.5
CD4+CD26-PD-1+	>70/ μ L	0.950	2
CD4+CD26-PD-1+	>40 %	0.838	1
CD4+CD26-CD158+	>100/ μ L	0.931	2
CD4+CD26-CD158+	>10 %	0.852	1
			12

La répartition des groupes de patients en fonction de leur score est la suivante :

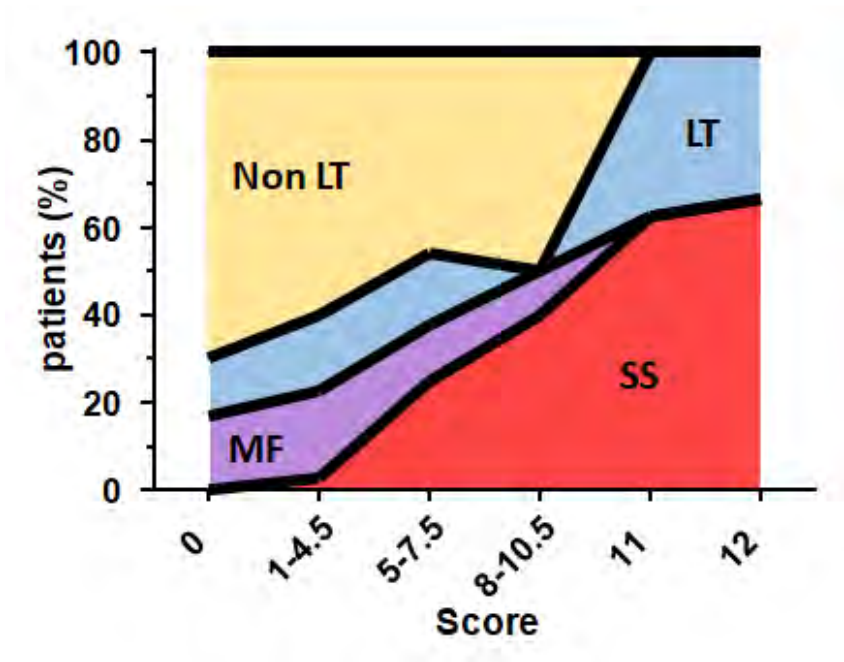


Figure 23 : Pourcentage de l'ensemble des patients ayant un SS, un MF, un LT ou sains en fonction du score calculé

Plus le score est élevé plus le pourcentage de patients SS augmente (figure 23). A l'inverse, plus le score est bas, plus le pourcentage de patients non LT est élevé.

Les ¾ des patients SS ont un score supérieur à 8.

4.5 Etude de la co-expression des marqueurs de surface au sein de la population lymphocytaire

Nous avons évalué l'expression des marqueurs au sein de la population lymphocytaire pour chaque groupe de patients.

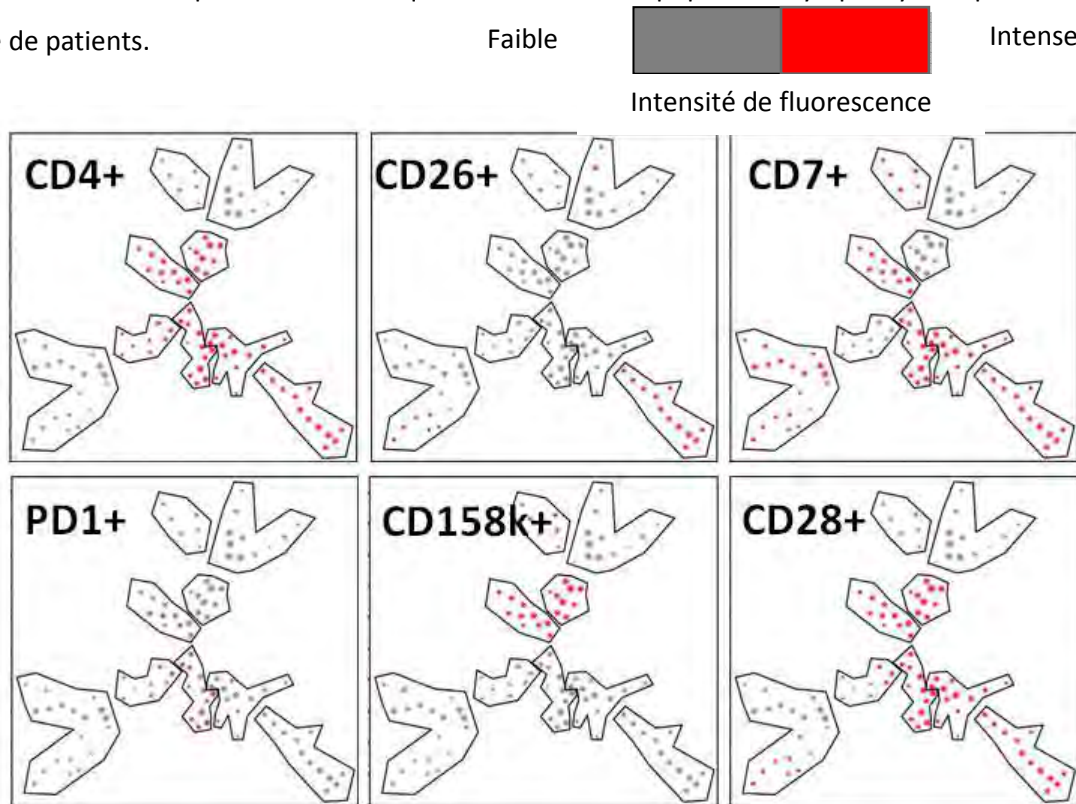
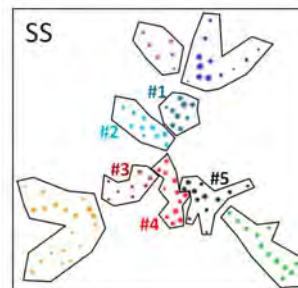
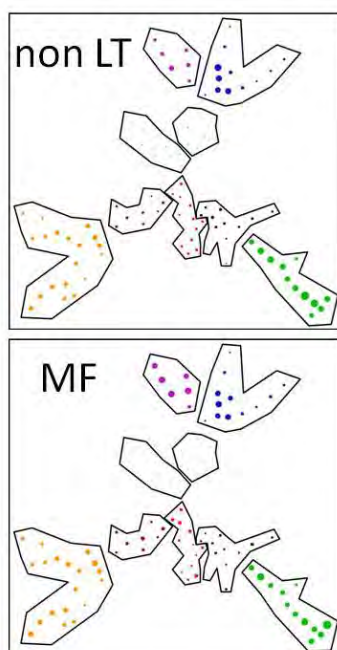


Figure 24 : Différents groupes de lymphocytes en fonction de l'intensité d'expression des marqueurs



Groupe de cellules	Marqueurs exprimés
1	CD4+ CD26- CD7- PD1- CD158k+
2	CD4+ CD26- CD7+ PD1- CD158k+
3	CD4+ CD26- CD7- PD1- CD158k-
4	CD4+ CD26- CD7+ PD1+ CD158k-
5	CD4+ CD26- CD7+ PD1- CD158k-

Figure 25 : Différents groupes de cellules chez les patients SS, non LT et MF

La population lymphocytaire est analysée à l'aide de FlowSOM (77). FlowSOM est un logiciel d'analyse multivariée non supervisée qui permet le regroupement, sous forme de nœuds, des cellules ayant des phénotypes similaires. Chaque zone, correspondant à un groupe de lymphocytes identiques, est définie ensuite manuellement après analyse de l'expression des différents marqueurs (figure 24). L'intensité d'expression d'un marqueur est représentée en couleur : lorsque les cellules à l'intérieur d'une zone sont rouges, le marqueur est fortement exprimé. A l'inverse, lorsque les cellules sont grises, le marqueur est faiblement exprimé.

Chaque groupe de patients est ensuite analysé selon l'arbre de nœuds élaboré dans FlowSOM (figure 25). Pour les patients SS, nous avons identifié 5 groupes de cellules. Par exemple, les cellules du groupe 1 sont CD4+CD26- CD7- PD-1-CD158k+ et CD28+ (figure 25). A noter que les cellules des 5 groupes sont par définition CD4+CD26-.

Les patients non LT et MF, nous pouvons observer qu'ils présentent moins de cellules dans les groupes 1 à 5, notamment dans le groupe 1 et 2 (figure 25). La majorité de leurs cellules sont CD4+CD26+CD7+PD-1-CD158k- CD28+ (en vert, en bas à droite) ou n'expriment aucun des marqueurs (lymphocytes B en bleu, en haut à droite).

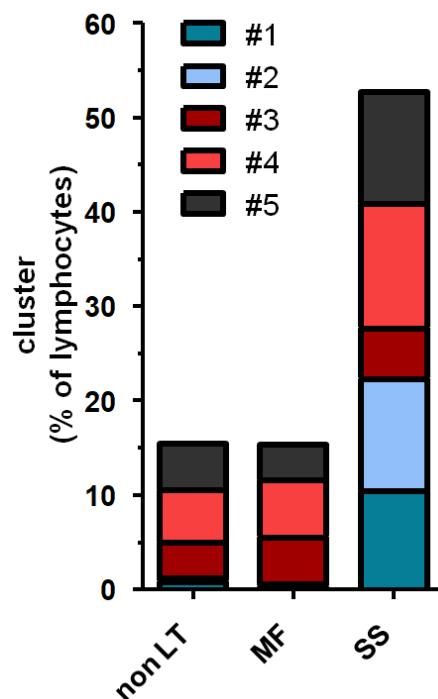


Figure 26 : Pourcentage des lymphocytes totaux contenus au sein des 5 groupes de cellules.

Lorsque l'on analyse le pourcentage de lymphocytes totaux qui sont dans les 5 groupes de cellules, nous pouvons observer que la somme des 5 groupes de cellules représente 15 % de l'ensemble des

lymphocytes dans les groupes non LT et MF (figure 26). Dans le groupe SS, la somme des 5 groupes de cellules représente 55 % de l'ensemble des lymphocytes.

L'ensemble des cellules de ces 5 groupes sont CD4+ CD26-. Nous avons de nouveau effectué l'analyse en se basant uniquement sur le pourcentage de cellules CD4+ CD26-.

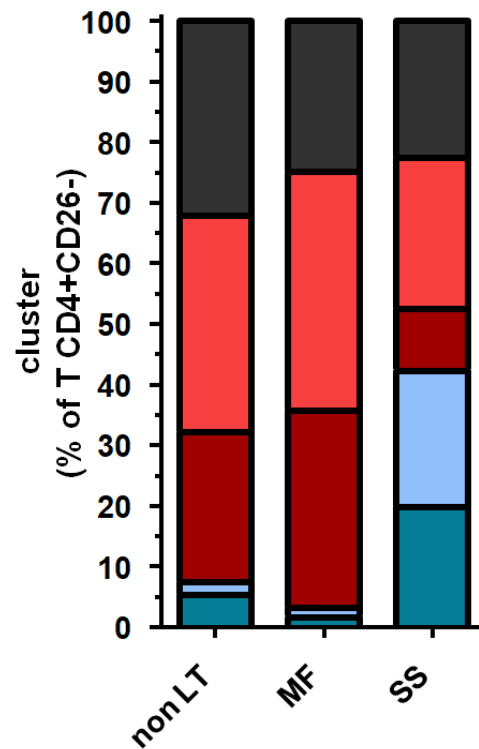


Figure 27 : Pourcentage des lymphocytes T CD4+ CD26- contenus au sein des 5 groupes de cellules.

Les patients non LT et MF présentent un profil similaire (figure 27). A l'inverse, les groupes de cellules 1 et 2 sont représentés quasi exclusivement chez les patients SS. La présence de ces cellules à un taux supérieur à 6 % permettrait donc d'orienter le diagnostic vers cette pathologie.

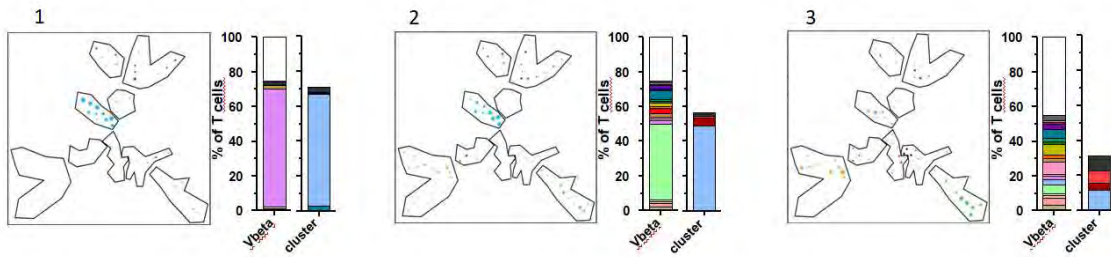
4.6 Etude de l'hétérogénéité de la population maligne pour chaque patient

L'expression de marqueurs différents au sein de la population CD4+CD26- est un argument en faveur de la présence de différentes sous-populations. Nous avons évalué la présence de différentes sous-populations au sein des cellules CD4+CD26- pour chaque patient SS.

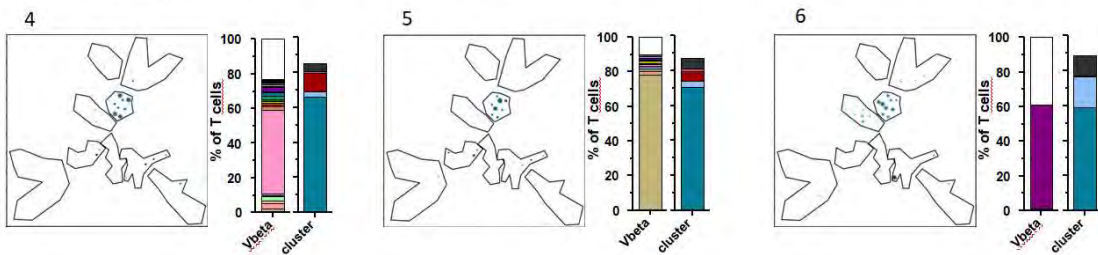
Nous avons comparé, parmi les lymphocytes totaux, le pourcentage du clone ayant un réarrangement des gènes β du TCR ($V\beta$) au pourcentage de cellules appartenant aux 5 groupes précédemment identifiés.

4.6.1 Evaluation de l'hétérogénéité de la population clonale par patient

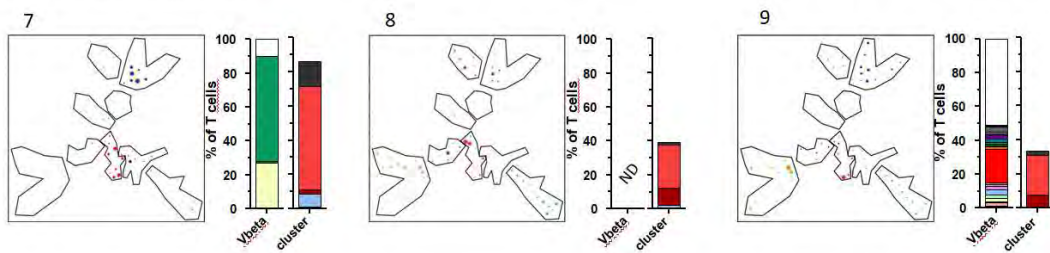
CD4+CD26-CD7+CD158k+PD1-



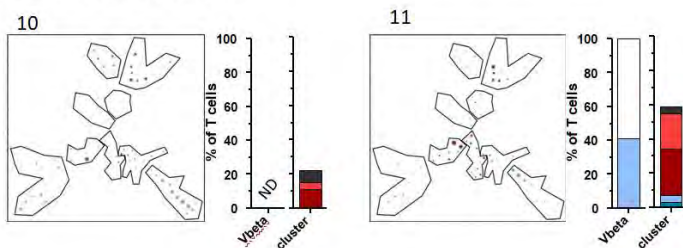
CD4+CD26-CD7-CD158k+PD1-



CD4+CD26-CD7+CD158k-PD1+



CD4+CD26-CD7-CD158k-PD1+



CD4+CD26-CD7+CD158k-PD1-

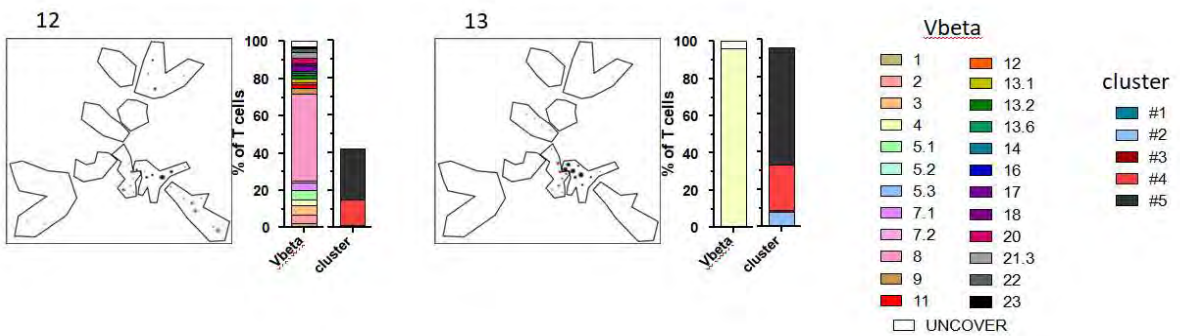


Figure 28 : Patients 1 à 13 classés selon la population CS majoritaire

Les graphes des 5 autres patients SS n'ont pas été présentés pour des raisons techniques (absence de fluorochromes pour les marqueurs étudiés).

Tableau 7 : Résumé des différentes populations lymphocytaires majoritaires pour chaque patient

Patients	Marqueur Majoritaire	Groupe de lymphocytes	% Groupe de lymphocytes	V Beta	% V Beta
Patient 1	CD4+ CD26- CD7+ PD-1- CD158k+	Groupe 2	64,3 %	7.1	68 %
Patient 2	CD4+ CD26- CD7+ PD-1- CD158k+	Groupe 2	48,5 %	5.1	44 %
Patient 3	CD4+ CD26- CD7+ PD-1- CD158k+	Groupe 2	11,2 %	-	-
Patient 4	CD4+ CD26- CD7- PD-1- CD158k+	Groupe 1	66,2 %	8	48 %
Patient 5	CD4+ CD26- CD7- PD-1- CD158k+	Groupe 1	70,5 %	1	78 %
Patient 6	CD4+ CD26- CD7- PD-1- CD158k+	Groupe 1	59 %	18	60 %
Patient 7	CD4+ CD26- CD7+ PD-1+ CD158k-	Groupe 4	60,4 %	4/13.6	27/62 %
Patient 8	CD4+ CD26- CD7+ PD-1+ CD158k-	Groupe 4	25 %	-	-
Patient 9	CD4+ CD26- CD7+ PD-1+ CD158k-	Groupe 4	23,4 %	11	20%
Patient 10	CD4+ CD26- CD7- PD-1- CD158k-	Groupe 3	10,6 %	-	-
Patient 11	CD4+ CD26- CD7- PD-1- CD158k-	Groupe 3	27,2 %	5.3	41 %
Patient 12	CD4+ CD26- CD7+ PD-1- CD158k-	Groupe 5	27,4 %	8	47 %
Patient 13	CD4+ CD26- CD7+ PD-1- CD158k-	Groupe 5	62,4 %	4	96 %

➤ Groupe 2 : CD3+CD4+CD26-CD7+CD158k+PD-1lo

Le patient 1 présente un pourcentage de cellules clonales estimé à 68 % lorsqu'on cible son récepteur V β . 64,3 % de ces lymphocytes sont également représentés par les cellules du groupe 2.

Le patient 2 possède un pourcentage de cellules clonales estimé à 44 % lorsqu'on cible son récepteur V β . 48,5 % de ces lymphocytes sont également représentés par les cellules du groupe 2.

Chez ces 2 patients, il a été possible d'identifier ses CS par ces 2 méthodes. A l'inverse, il existe une grande diversité de clone V β chez le patient 3. La population majoritaire de cellules du groupe 2 représente seulement 11,2 % des lymphocytes. Nous retrouvons également une hétérogénéité des cellules clonales puisque 3 groupes de cellules sont présentes chez ce patient.

Seulement 70 % des réarrangements de gènes peuvent être mis en évidence. Deux hypothèses sont probables pour le patient 3 :

- ✓ ce patient présente une réelle hétérogénéité de sa population clonale ou
- ✓ le clone fait partie des 30 % non identifiés.

➤ Groupe 1 : CD3+CD4+CD26-CD7-CD158k+PD-1lo

Pour les patients 4,5 et 6, le pourcentage de la population cellulaire majoritaire retrouvée en V β et dans le groupe 1 est sensiblement le même.

➤ Groupe 4 : CD3+CD4+CD26-CD7+CD158k-PD-1+

Le patient 7 présente 2 clones différents identifiés par les 2 techniques différentes. Les pourcentages du clone majoritaire sont similaires (60,4% *versus* 62%).

Pour le patient 9, les pourcentages de lymphocytes clonaux sont similaires avec les 2 techniques. Pour le patient 8, la recherche de clone n'a pas été effectuée car le clone représentait moins de 50 % de la population lymphocytaire.

✓ Groupe 3 : CD3+CD4+CD26-CD7-CD158k-PD-1-

Pour le patient 10 la recherche de clone n'a pas été effectuée.

Le patient 11 présente 41 % de cellules V β et 27,2 % du groupe 3.

✓ Groupe 5 : CD3+CD4+CD26-CD7+CD158k-PD-1-

Pour les patients 12 et 13, il existe un clone majoritaire facilement identifiable.

En conclusion, pour la majorité des patients il y a une bonne corrélation entre le pourcentage de cellules V β et le pourcentage de cellules majoritaires présentes dans un groupe. Cette population est homogène.

4.7 Etude de la population maligne et de la population clonale majoritaire au cours du traitement

4.7.1 Suivi de 2 patients SS

Nous avons suivi 2 patients au cours de leur traitement.

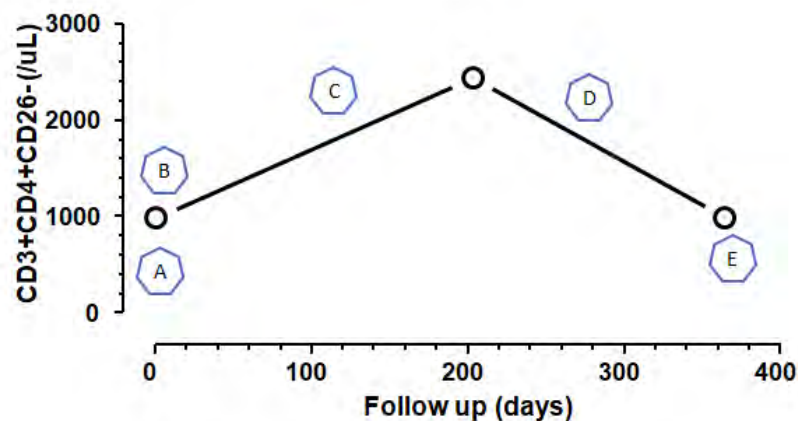
A. PEC : 2 séances toutes les 2 semaines + application de dermocorticoïdes

B. Augmentation nombre de CS sans retentissement clinique

C. Majoration du rapport CD4/CD8 et de l'atteinte clinique : + Méthotrexate 15 mg/semaine

D. Bon contrôle clinique et biologique, prise en charge à l'identique

E. Amélioration biologique poursuite du même traitement



Patient 1

Figure 29 : Suivi clinique et biologique du patient 1 au cours du temps.

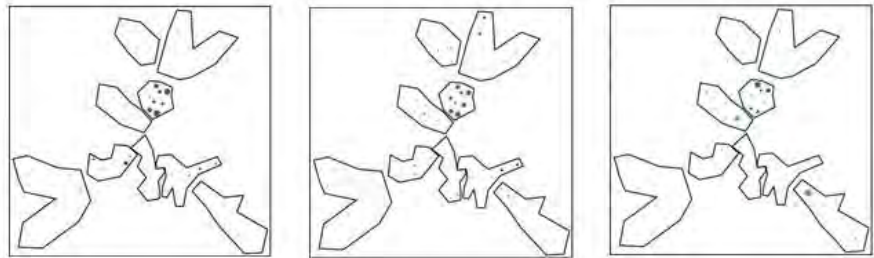
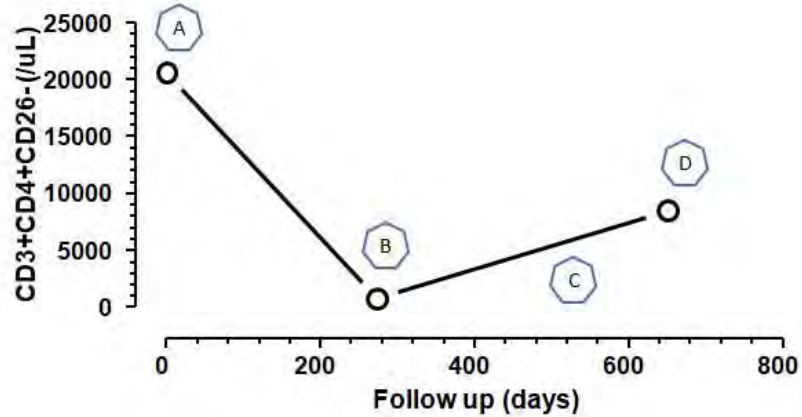
Il existe une bonne corrélation entre les rechutes cliniques et biologiques. Cependant, le pourcentage de cellules dans le groupe 2 est sensiblement le même après augmentation des lymphocytes CD3+CD4+CD26-. Il y a une légère diminution du pourcentage de cellules de la zone 2 lorsque les lymphocytes CD3+CD4+CD26- diminuent.

A. PEC : 2 séances par semaines toutes les 2 semaines et photothérapie UVB 2 cures par semaines et dermocorticoïdes

B. Bonne amélioration clinique : poursuite PEC et photothérapie 1 fois par semaine

C. Aggravation des lésions papulo-nodulaires malgré l'amélioration de l'érythrodermie

D. Majoration des ADP cervicales et inguinales



Patient 4

Figure 30 : Suivi clinique et biologique du patient 4 au cours du temps

Pour le patient 4, le pourcentage de cellules situées dans le groupe 1 ne varie pas comme le nombre de cellules CD3+CD4+CD26-. En effet, alors que nous observons une diminution importante du nombre de cellules CD3+CD4+CD26- en un peu moins de 280 jours, le pourcentage de cellules du groupe 1 ne semble pas varier. A l'inverse, celui-ci semble diminuer entre les jours 280 et 640 alors que le nombre de cellules CD3+CD4+CD26- augmente.

Les améliorations et les rechutes cliniques et biologiques semblent être corrélées. En revanche, le pourcentage de cellules dans la zone majoritaire ne suit pas la même évolution que le taux de lymphocytes CD4+CD26-. Ce pourcentage ne permet pas de suivre l'évolution clinique et biologique des patients.

4.7.2 Suivi des groupes de patients SS selon l'expression combinée des marqueurs

Nous avons ensuite étudié, au sein des groupes de patients ayant un SS, l'expression combinée des marqueurs CD158k et PD-1 au sein de la population lymphocytaire CD3+CD4+CD26-CD7 faible.

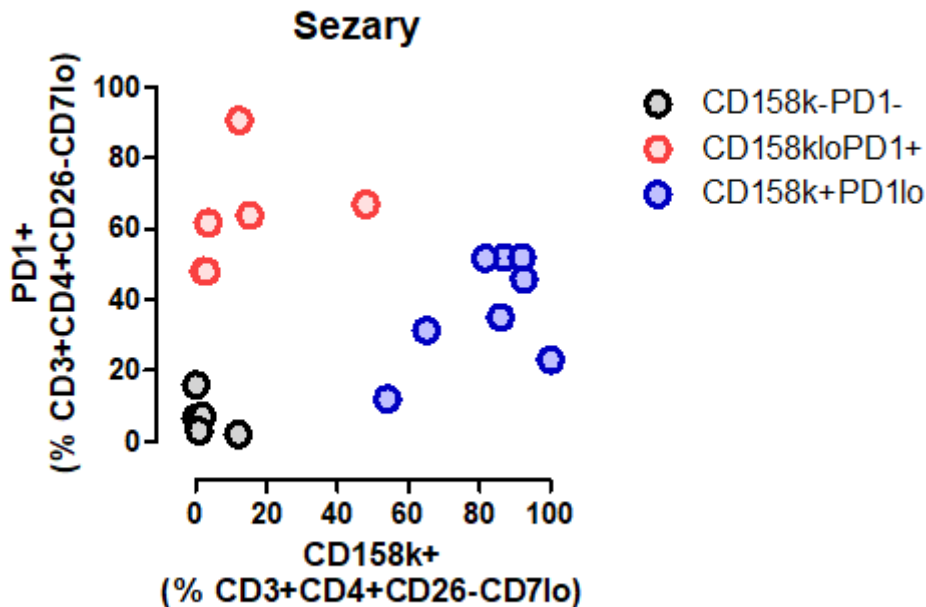


Figure 31 : Pourcentage d'expression de CD3+CD4+CD26-CD7 faible PD-1+ en fonction du pourcentage d'expression de CD3+CD4+CD26-CD7 faible CD158k+ chez les patients ayant un SS.

Chaque rond représente un patient. Test de Mann-Whitney.

3 groupes sont identifiés :

- ✓ En bleu, les patients expriment fortement CD158k et faiblement PD-1 ;
- ✓ En rouge, les patients qui expriment fortement PD-1 et faiblement CD158k ;
- ✓ En noir, les patients n'expriment ni PD-1, ni CD158k.

Les patients SS ont donc une expression variable des différents marqueurs ce qui explique la difficulté diagnostique.

Pour chacun de ces groupes, l'évolution du pourcentage des cellules CD3+CD4+CD26- a été suivie au cours du traitement. Le nombre de cellules CD3+CD4+CD26- lors du premier prélèvement correspond au 100 %.

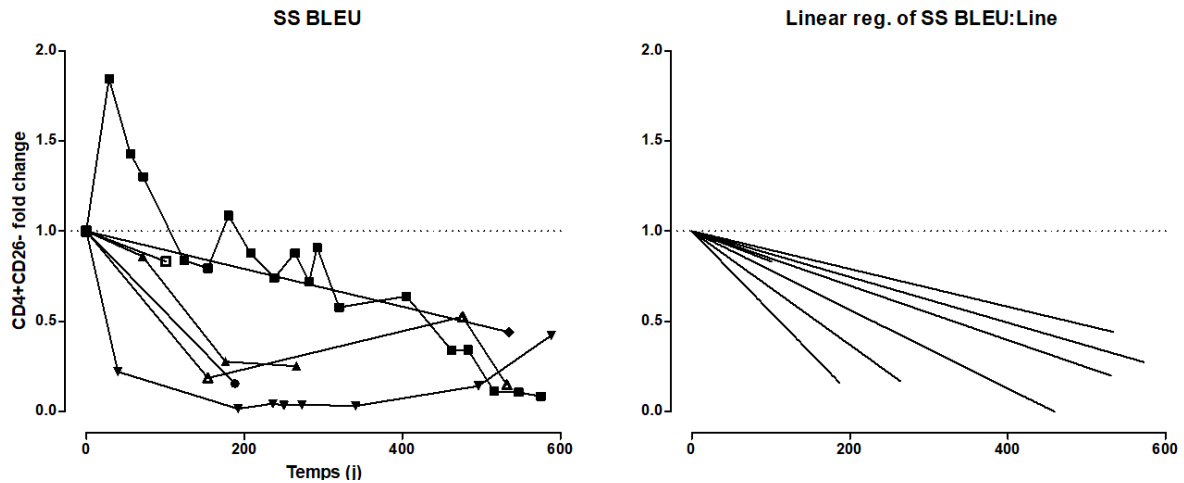


Figure 32 : Évolution du pourcentage de cellules CD4+CD26- au cours du temps chez les patients ayant un SS exprimant fortement CD158k et faiblement PD-1 au diagnostic associé à la courbe de régression linéaire.

Les patients exprimant fortement CD158k et faiblement PD-1 diminuent leur pourcentage de cellules CD4+CD26- au cours du temps. Il semblerait que ces patients répondent bien au traitement.

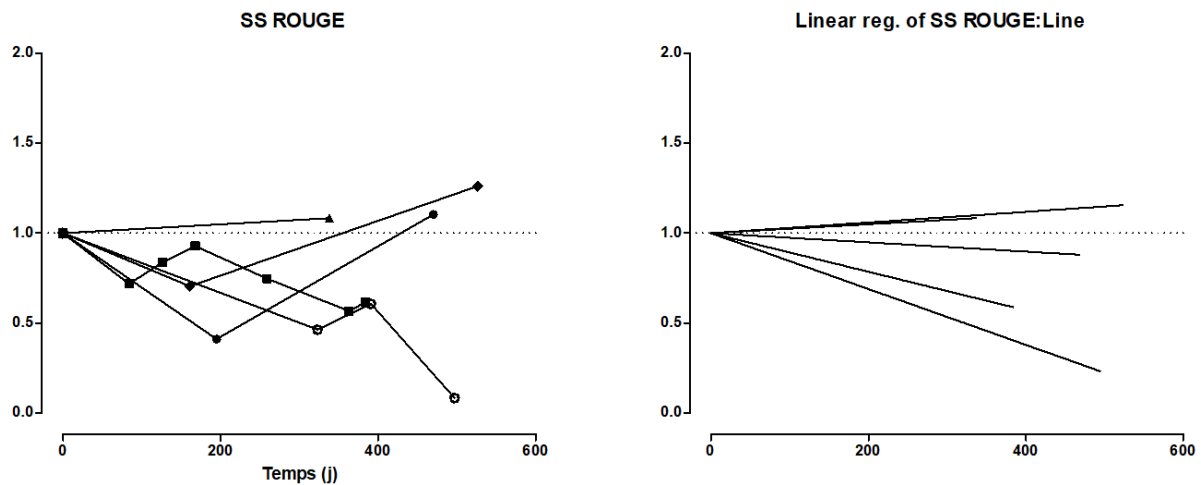


Figure 33 : Évolution du pourcentage de cellules CD4+CD26- au cours du temps chez les patients ayant un SS exprimant fortement PD-1 et faiblement CD158k au diagnostic associé à la courbe de régression linéaire.

Le pourcentage de cellules CD4+CD26- a tendance à moins diminuer chez les patients exprimant fortement PD-1 et faiblement CD158k en comparaison avec ceux exprimant fortement CD158k et faiblement PD-1.

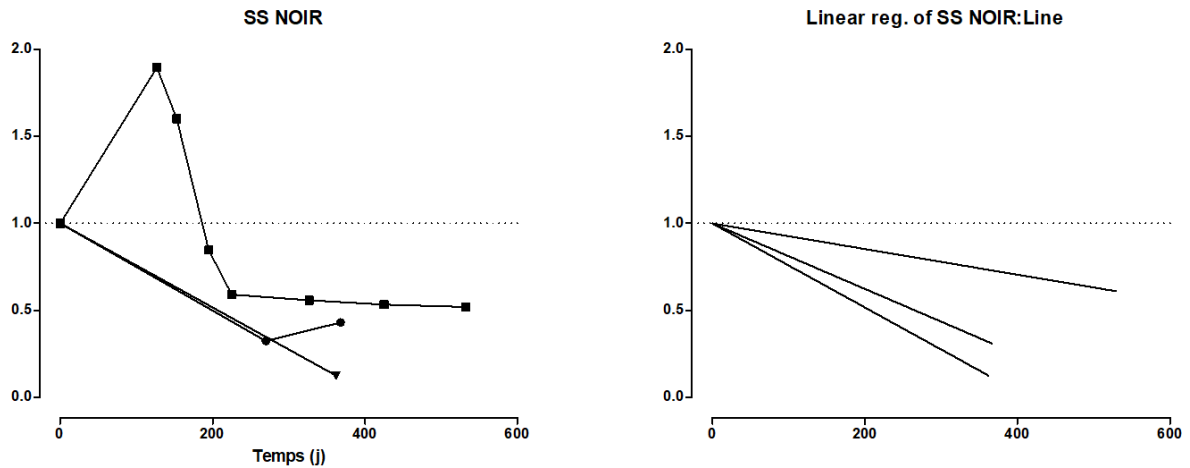


Figure 34 : Évolution du pourcentage de cellules CD4+ CD26- au cours du temps chez les patients ayant un SS n'exprimant ni CD158k ni PD-1 au diagnostic associé à la courbe de régression linéaire.

Les patients n'exprimant aucun des 2 marqueurs présentent une diminution globale des cellules CD4+CD26- au cours du temps.

Nous avons évalué la pente de régression pour chacun des groupes.

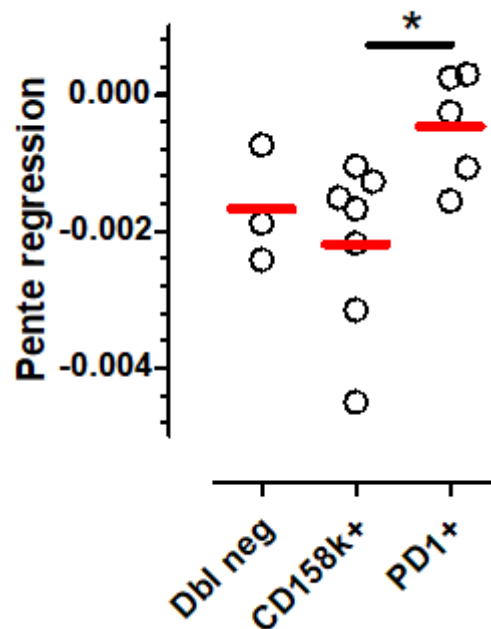


Figure 35 : Pente de régression pour chacun des groupes précédemment définis.

La pente de régression chez les patients exprimant fortement CD158k est plus éloignée de zéro par rapport à la pente de régression des patients exprimant PD-1.

Les patients qui expriment CD158k ont une diminution plus importante de leur pourcentage de cellules CD4+CD26- par rapport aux patients qui expriment PD-1+. Il existe donc une meilleure réponse au traitement chez les patients exprimant le marqueur CD158k en comparaison avec les patients exprimant fortement PD-1. Il n'existe pas de différence significative entre les patients exprimant CD158k et les patients n'exprimant ni CD158k ni PD-1. L'expression de PD-1 serait donc un facteur de mauvais pronostic.

Discussion

Le SS est un variant leucémique des lymphomes T cutanés, caractérisé par une érythrodermie, des adénopathies et un clone T circulant. Les arguments cliniques, anatomopathologiques et biologiques (cellules de Sézary) sont à la fois très évocateurs mais aussi peu spécifiques, conduisant à une suspicion bioclinique rapide mais une errance diagnostique relativement fréquente des patients. Dans ce cadre, des réunions pluridisciplinaires sont mises en place afin de croiser les différentes informations et de discuter des cas. Dans cette pathologie, la cytométrie en flux arrive en soutien des arguments majeurs que sont la clinique, l'anatomopathologie et la génétique (7,78).

➤ Analyse des résultats selon les recommandations de l'ISCL

Dans ce cadre, le premier objectif de cette étude est d'évaluer les recommandations de l'ISCL concernant l'utilisation de la CMF dans le diagnostic de patients atteints d'un SS.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons collecté les données de CMF de 426 prélèvements sur 290 patients consécutifs, suspectés de lymphome T cutané. Au final, le nombre de patients SS inclus dans l'étude est de 21 (7 % de la cohorte). Bien que relativement faible, ce nombre reste comparable à celui retrouvé dans de nombreuses publications sur le sujet (55,61,75,79).

L'AUC du marqueur CD4+CD26⁻ est de 0,971 (VPP=56 % VPN= 98 %). Cela fait de lui le marqueur le plus performant parmi ceux que nous avons évalué. Nous avons trouvé, tout comme Vonderheid *et al.* (80) et Novelli *et al.* (56) que le pourcentage de cellules CD4+CD26⁻ a de meilleures performances diagnostiques que le pourcentage de cellules CD4+CD7⁻. Il semble donc dans un premier temps plus intéressant d'évaluer le taux de cellules CD4+CD26⁻. Une analyse non-supervisée (Fayyad et Irani (76)) des données de notre cohorte retrouve le seuil décisionnel de 27,5 % proche des 30 % issus des recommandations de l'ISCL, pour différencier les patients SS des patients non LT (7). Ce résultat, similaire à celui attendu, valide notre approche analytique et notre cohorte de patients. Nous pouvons tout de même remarquer que le critère CD4+CD26⁻%, tout comme les autres critères diagnostiques de CMF (nombre et taux des cellules CD4+CD26⁻ ou CD4+CD7⁻, ratio CD4/CD8), est impacté par la faible fréquence du SS parmi les patients suspects : il faut l'analyser comme un critère d'exclusion. En effet ce test a une VPN très élevée (98 %), ce qui nous permet d'éliminer avec *quasi*-certitude le diagnostic de SS lorsque le seuil diagnostique n'est pas atteint. En contrepartie, sa VPP faible (56 %) indique qu'il n'est pas suffisant, à lui seul, pour poser le diagnostic de SS.

Ainsi, dans notre cohorte de patients non-LT, 11 patients (sur 193) ont un pourcentage de CD3+CD4+CD26⁻ supérieur au seuil diagnostique à 30%. Ces patients avaient des lymphomes B

parfois associés à des syndromes d'activation macrophagique, ou étaient en errance diagnostique pour érythrodermie, prurit chronique ou eczéma. Sur 10 de ces patients, une clonalité V β par cytométrie en flux a été recherchée dans le sang. Cette analyse a mis en évidence des clones V β chez 3 patients, un trou phénotypique chez 4 patients et un profil polyclonal chez 3 patients. Ceci met en évidence la complexité du diagnostic de LTC et de SS ; une population CD4+CD26- et un clone sanguin peuvent être détecté sans que les autres arguments diagnostiques ne soient présents ou suffisants pour poser le diagnostic.

Plusieurs stratégies sont envisageables afin d'améliorer la puissance diagnostique de la cytométrie en flux dans le diagnostic du SS. Dans le cadre de ce travail, nous avons imaginé de (i) rechercher de nouveaux marqueurs spécifiques du SS et (ii), d'associer les critères en créant un score diagnostique.

➤ Expression des nouveaux marqueurs

Le deuxième objectif est d'étudier la distribution de marqueurs membranaires à la surface des cellules pour identifier de nouveaux marqueurs spécifiques du SS au sein de la population maligne CD3+CD4+CD26-CD7 faible. Ces nouveaux marqueurs sont CD158k, PD-1 et CD28.

Au sein de la population maligne CD4+CD26-, les marqueurs CD158k et PD-1 présentent de bonnes performances diagnostiques et confirment leur utilité pour aider au diagnostic. Leurs AUC sont respectivement de 0,852 et de 0,838 lorsqu'on évalue le pourcentage de cellules CD158k+ (seuil de positivité à 12 %) et de PD-1+ (seuil de positivité à 44 %).

En revanche, l'utilisation du CD28 n'apporte aucune aide au diagnostic du SS. Il est exprimé par plus de 90% des cellules CD4+CD26-CD7lo des patients SS, en accord avec la nature de ces lymphocytes T. En effet, il a été montré que les CS présentent un phénotype de T mémoire central (T_{CM}) contrairement aux cellules de MF, qui ressemblent à des T mémoires effecteurs (T_{EM}) (81). Le marqueur CD28 s'inscrit dans ce cadre, avec une expression élevée par les T_{CM} et une perte d'expression par les T_{EM}. A ce titre, si le CD28 n'a pas trouvé sa place dans le diagnostic du SS, il devrait être analysé dans la cohorte de patients MF. Dans cette cohorte de 37 patients, nous observons une grande hétérogénéité d'expression du CD28 dans la population CD4+CD26-CD7lo (33 à 100% des cellules sont positives). Horna *et al.* ont récemment émis l'hypothèse que le phénotype T_{CM}/T_{EM} n'était pas dû à l'origine du LTC mais à des états fonctionnels différents (74). Notre phénotype CD28 pourrait alors permettre de classer les MF CD28- (T_{EM}) ou CD28+ (T_{CM}). Ces 2 groupes (médiane d'expression du CD28 à 18% des cellules CD4+CD26-CD7lo) pourraient être étudiés dans le cadre d'un autre travail.

➤ **Score cytométrique de diagnostic des SS**

A ce jour, il n'existe pas de score diagnostique par cytométrie en flux pour le SS ou les LTC. Mais ceci est réalisable, comme il l'a été pour la leucémie lymphoïde chronique. En effet, le score de Matutes (ou score du Royal Marsden Hospital) est couramment utilisé aujourd'hui. En 1994, les marqueurs phénotypiques classiques des LLC ont été évalués chez 666 patients dont 400 LLC. Dans l'étude de Matutes *et al.* (82), 87 % des LLC ont un score de 4 ou 5 et seulement 3,4 % ont un score entre 0 et 2. 89 % des leucémies lymphoïdes B et 72 % des lymphomes ont un score de 0 ou 1 et seulement 0,3 % ont un score de 4. Aucune autre pathologie excepté la LLC n'a un score à 5. Cette étude a donc permis d'établir un score diagnostique permettant de distinguer dans la plupart des cas une LLC d'une autre hémopathie lymphoïde B.

Nous avons utilisé les marqueurs les plus classiques du SS, sélectionnés pour leur pouvoir discriminant dans notre cohorte (CD4+CD26-, CD4+CD7-, expression de PD-1 et de CD158k). Dans tous les cas, un score très élevé (≥ 11) est en faveur d'un lymphome T cutané. 75% des SS ont un score supérieur ou égal à 8 contre 3,5% des patients non-LT (VPP=71%). 99,5% des scores inférieurs ou égaux à 5 ne sont pas des SS (VPN=99.5%). Malgré ces résultats, notre score entretient une zone « grise », de difficulté diagnostique, puisqu'entre 5 et 8, environ 50 % des patients n'ont pas de lymphome T (SS/MF/LT). Il serait néanmoins intéressant de suivre les patients non LT ayant un score élevé (>8) au cours du temps pour évaluer si leur score régresse ou si ils développent un lymphome T cutané. Ce score améliore les valeurs prédictives sans être suffisamment discriminant. Il pourrait néanmoins être utilisé en routine pour faciliter le diagnostic d'exclusion du SS (VPN=99.5%).

➤ **Hétérogénéité d'expression des marqueurs et difficulté diagnostique**

Récemment, l'étude de centaines de marqueurs a mis en évidence l'hétérogénéité du clone SS (55). Même si les marqueurs que nous avons regardés sont beaucoup moins nombreux, nous avons essayé d'évaluer l'hétérogénéité de la population clonale pour les patients SS, MF et non LT en utilisant une nouvelle méthode d'analyse multivariée, non supervisée, par cytométrie en flux (77). Avec notre stratégie, nous ne mettons pas en évidence différentes sous-populations clonales chez les patients SS. Toutefois, nous montrons l'existence de plusieurs groupes de patients SS selon leur expression du CD7, du CD158k et de PD-1. Cela nous a permis de mettre en évidence 5 sous-groupes de patients atteints de SS. La diversité d'expression de ses différents marqueurs pourrait être expliquée par différentes hypothèses impliquant :

- ✓ L'hétérogénéité des anomalies génétiques. En effet, des anomalies génétiques différentes peuvent conduire à des phénotypes différents. Aucune anomalie génétique spécifique n'a été mise en évidence dans le SS. De nombreuses anomalies chromosomiques clonales de

nombre ou de structure ont été décrites, pouvant être l'origine de la variabilité phénotypique (83) ;

- ✓ Le phénotype de maturation. Selon le stade auquel la cellule clonale s'est arrêtée, des profils phénotypiques peuvent être différents. Le récepteur PD-1 s'exprime tardivement dans la régulation des lymphocytes T. Son expression élevée persisterait au contact régulier et chronique des antigènes tumoraux (84). Il pourrait donc être un marqueur de blocage tardif.
- ✓ La nature de la cellule d'origine. Le SS pourrait dériver d'un lymphocyte Th2 (85) ou d'un lymphocyte T régulateur (86) ou encore d'un lymphocyte Th17 (87). Cette variabilité de fonction peut expliquer un profil phénotypique différent. Par exemple, il a été montré que le CD158k était impliqué dans la différenciation Th17 des lymphocytes T CD4+ de la spondylarthrite (88).

Au cours du suivi, les patients SS exprimant CD158k semblent diminuer davantage leur population maligne que les patients exprimant PD-1. L'expression de PD-1 serait donc de mauvais pronostic. Il serait intéressant de confirmer le lien entre l'expression phénotypique de certains marqueurs et des différences d'agressivité tumorale.

➤ **Hétérogénéité de la population clonale pour chaque patient**

Nous avons également évalué cette hétérogénéité pour chaque patient SS au moyen de notre phénotype limité à 5 marqueurs (CD4/CD26/CD7/CD158k/PD-1). Contrairement à ce qu'ont montré Buus *et al.* (55), nous avons retrouvé une population clonale relativement homogène chez la majorité des patients. L'utilisation d'un nombre bien plus faible de marqueurs dans notre étude permettrait d'expliquer en partie cette discordance. Pour la plupart des patients, cette population est corrélée à la population clonale mise en évidence grâce à l'expression spécifique d'un Vβ.

De plus, Buus *et al.* ont étudié, à partir des cellules de 6 patients SS, la répartition des différentes populations cellulaires après traitement des cellules clonales *in vitro* par des concentrations croissantes d'inhibiteur d'histone désacétylase. La réponse au traitement est proportionnelle à la concentration d'histone désacétylase : plus la concentration d'inhibiteur désacétylase incubée avec la population clonale est importante, plus la population clonale principale est éliminée. A l'inverse, les sous-populations minoritaires ne sont pas éliminées quelle que soit la concentration d'inhibiteur désacétylase incubée *in vitro*. Dans notre étude, nous avons suivi le pourcentage de cellules clonales retrouvé *in vivo* chez 2 patients SS après mise en place de différents traitements. Contrairement à Buus *et al.*, nous n'avons pas mis en évidence d'élimination de la population clonale principale au cours des différents traitements. Ces résultats suggèrent que la résistance aux traitements *in vivo* n'est pas conduite par l'émergence de sous-clones phénotypiques, mais plutôt par la nature du SS

(anomalies génétiques/stade de blocage/cellule d'origine). Il serait intéressant d'évaluer ces résultats sur un plus grand nombre de patients.

Au-delà de l'intérêt diagnostique de l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques de cette pathologie, l'identification de marqueurs spécifiques de CS permettrait de cibler la thérapie des patients en utilisant un anticorps dirigé contre le marqueur présent à la membrane de la cellule maligne. De telles thérapies sont actuellement en cours de développement. En effet, l'IPH4102 est un anticorps anti-CD158k en cours de phase II. L'utilisation de l'IPH4102 serait intéressante chez les patients exprimant fortement le CD158k puisque cela permettrait d'éliminer les CS tout en limitant les effets indésirables.

Conclusion

Ce travail a permis d'élaborer un score phénotypique applicable au diagnostic de SS en routine. Il a de plus mis en évidence l'existence de plusieurs sous-types phénotypiques de SS ayant des réponses thérapeutiques différentes. Ce travail rétrospectif devra être validé sur une plus large cohorte de SS et pourra être enrichi par l'étude anatomopathologique des biopsies cutanées des patients à la lumière de cette classification. Une évaluation de la réponse au traitement adapté pour chaque patient en fonction de l'expression des marqueurs pourra également être réalisée.

ANNEXES

Annexe 1 : Lymphomes et hémopathies de présentation cutanée primitive selon la classification OMS-EORTC 2005, fréquence et survie estimée (3)

Classification OMS-EORTC	Provisoire	Fréquence (%)	Survie à 5 ans (%)
Lymphomes T cutanés			
<i>Lymphomes indolents</i>			
Mycosis fungoïde (MF)		44	88
MF pilotrope		4	80
Réticulose pagétoïde		<1	100
MF granulomateux		<1	100
Lymphome T à grandes cellules anaplasiques		8	95
Papulose lymphomatoïde		12	100
Lymphome T sous-cutané de type panniculite		1	82
Lymphome T cutané pléomorphe à petites et moyennes cellules		2	75
<i>Lymphomes agressifs</i>			
Syndrome de Sézary		3	24
Lymphome NK/T de type nasal cutané primitif		<1	-
Lymphome T CD8+ agressif cutané primitif	oui	<1	18
Lymphome T $\gamma\delta$ cutané primitif	oui	<1	-
Lymphome T non classé	oui	2	16

Annexe 2 : Classification des lymphomes T cutanés primitifs selon la classification World Health Organization (WHO) mise à jour en 2018 (2)

Table 1. Relative frequency and prognosis of primary cutaneous lymphomas included in the 2018 update of the WHO-EORTC classification

WHO-EORTC Classification 2018	Frequency, %*	5-y DSS, %*
CTCL		
MF	39	88
MF variants		
Folliculotropic MF	5	75
Pagetoid reticulosis	<1	100
Granulomatous slack skin	<1	100
SS	2	36
Adult T-cell leukemia/lymphoma	<1	NDA
Primary cutaneous CD30 ⁺ LPDs		
C-ALCL	8	95
LyP	12	99
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	1	87
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type	<1	16
Chronic active EBV infection	<1	NDA
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, rare subtypes		
Primary cutaneous γ/δ T-cell lymphoma	<1	11
CD8 ⁺ AECTCL (provisional)	<1	31
Primary cutaneous CD4 ⁺ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder (provisional)	6	100
Primary cutaneous acral CD8 ⁺ T-cell lymphoma (provisional)	<1	100
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, NOS	2	15

Annexe 3 : Recommandations concernant les critères de réponse sanguine pour le MF/SS (57).

Table 4

Recommendations for blood response criteria for MF/SS.

Response	Definition	Change from end-points 2011
Complete response (CR)	<ul style="list-style-type: none"> • B0, B1 no CR possible • B2 to B0 	B1 to B0 no longer considered CR
Partial response (PR)	<ul style="list-style-type: none"> • B0, B1 no PR possible • B2 as 50% reduction in absolute count 	No change
Stable disease (SD)	<ul style="list-style-type: none"> • B0,B1, B2 fails to attain CR, PR or PD 	No change
Progressive disease (PD)	<ul style="list-style-type: none"> • B0 or B1 to B2 with an increase in absolute counts of $\geq 50\%$ • B2 with an increase in absolute counts of $\geq 50\%$ • Loss of response with an increase in absolute counts $\geq 1000/\mu\text{L}$ and $\geq 50\%$ from nadir 	Remove the need for at least 5000 neoplastic cells/ μL for PD
Relapse	<ul style="list-style-type: none"> • Increase in absolute counts of $\geq 1000/\mu\text{L}$ in those with CR 	Relapse not possible in B0-1 as no CR in these patients

Abbreviations: Absolute count, absolute flow counts using CD4+CD7-, CD4+CD26-or other aberrant phenotype; B0, absolute counts of either CD4+CD7-or CD4+CD26-are $< 250/\mu\text{L}$ cells; B1, CD4+CD7-or CD4+CD26-counts are between $250/\mu\text{L}$ – $< 1000/\mu\text{L}$ cells; B2, CD4+CD7-cells or CD4+CD26-cells or other aberrant phenotype $\geq 1000/\mu\text{L}$ in the presence of a relevant T-cell clone in blood.

1. Boonk SE, Zoutman WH, Marie-Cardine A, van der Fits L, Out-Luiting JJ, Mitchell TJ, et al. Evaluation of Immunophenotypic and Molecular Biomarkers for Sézary Syndrome Using Standard Operating Procedures: A Multicenter Study of 59 Patients. *J Invest Dermatol.* juill 2016;136(7):1364-72.
2. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood.* 1 janv 2019;blood-2018-11-881268.
3. Willemze R. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 15 mai 2005;105(10):3768-85.
4. JIM.fr - Lymphomes T cutanés : les « bons » et les « mauvais » [Internet]. Disponible sur: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:myRmT71_BL&J:https://www.jim.fr/e-docs/lymphomes_t_cutanes_les_bons_et_les_mauvais__112654/document_mise_point.phtml+%&cd=1&hl=fr&ct=clnk&gl=fr
5. Beylot-Barry M, Dereure O, Vergier B, Barete S, Laroche L, Machet L, et al. Prise en charge des lymphomes T cutanés : recommandations du Groupe français d'étude des lymphomes cutanés. *Ann Dermatol Vénéréologie.* oct 2010;137(10):611-21.
6. Korgavkar K, Xiong M, Weinstock M. Changing Incidence Trends of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *JAMA Dermatol.* 1 nov 2013;149(11):1295-9.
7. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary 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.* 15 sept 2007;110(6):1713-22.
8. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, et al. Clinical End Points and Response Criteria in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: A Consensus Statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol.* 20 juin 2011;29(18):2598-607.
9. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, et al. 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.* 20 sept 2010;28(31):4730-9.
10. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, et al. 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.* 10 nov 2015;33(32):3766-73.
11. Shakeri A. Albert Sézary—The Man, the Cell, and the Syndrome. *JAMA Dermatol.* 1 avr 2018;154(4):496.
12. Vakiti A, Singh D. Sezary Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499874/>

13. Bernengo MG, Quaglino P, Novelli M, Cappello N, Doveil GC, Lisa F, et al. Prognostic factors in Sézary syndrome: a multivariate analysis of clinical, haematological and immunological features. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. août 1998;9(8):857-63.
14. Orphanet: Syndrome de Sézary [Internet]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=3162&lng=FR
15. Phan A, Veldman R, Lechowicz MJ. T-cell Lymphoma Epidemiology: the Known and Unknown. *Curr Hematol Malig Rep*. 1 déc 2016;11(6):492-503.
16. Spicknall KE. Sézary syndrome—clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. mars 2018;37(1):18-23.
17. Mangold AR, Thompson AK, Davis MD, Saulite I, Cozzio A, Guenova E, et al. Early clinical manifestations of Sézary syndrome: A multicenter retrospective cohort study. *J Am Acad Dermatol*. 1 oct 2017;77(4):719-27.
18. Caudron A, Marie-Cardine A, Bensussan A, Bagot M. Actualités sur le syndrome de Sézary. *Ann Dermatol Vénérologie*. janv 2012;139(1):31-40.
19. Fragkos KC. Plantar keratoderma of Sézary syndrome. *Clin Case Rep*. 29 août 2017;5(10):1726-7.
20. CD164 helps physicians to diagnose and treat cancer in Sézary Syndrome | Atlas of Science [Internet]. Disponible sur: <https://atlasofscience.org/cd164-helps-physicians-to-diagnose-and-treat-cancer-in-sezary-syndrome/>
21. Mirvish ED, Pomerantz RG, Geskin LJ. Infectious agents in cutaneous T-cell lymphoma. *J Am Acad Dermatol*. févr 2011;64(2):423-31.
22. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2017;92(10):1085-102.
23. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 15 mai 2005;105(10):3768-85.
24. Klemke CD, Booken N, Weiss C, Nicolay JP, Goerdt S, Felcht M, et al. 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*. 2015;173(1):93-105.
25. Delfau-Larue M-H, Laroche L, Wechsler J, Lepage E, Lahet C, Asso-Bonnet M, et al. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood*. 1 nov 2000;96(9):2987-92.
26. da Silva Almeida AC, Abate F, Khiabani H, Martinez-Escala E, Guitart J, Tensen CP, et al. The mutational landscape of cutaneous T-cell lymphoma and Sézary syndrome. *Nat Genet*. déc 2015;47(12):1465-70.
27. Prasad A, Rabionet R, Espinet B, Zapata L, Puiggros A, Melero C, et al. Identification of Gene Mutations and Fusion Genes in Patients with Sézary Syndrome. *J Invest Dermatol*. 1 juill 2016;136(7):1490-9.

28. Lamprecht B, Kreher S, Möbs M, Sterry W, Dörken B, Janz M, et al. The tumour suppressor p53 is frequently nonfunctional in Sézary syndrome. *Br J Dermatol.* 2012;167(2):240-6.
29. Iżykowska K, Przybylski GK. Genetic alterations in Sezary syndrome. *Leuk Lymphoma.* 1 mai 2011;52(5):745-53.
30. Wang L, Ni X, Covington KR, Yang BY, Shiu J, Zhang X, et al. Genomic profiling of Sézary syndrome identifies alterations of key T cell signaling and differentiation genes. *Nat Genet.* déc 2015;47(12):1426-34.
31. Kiel MJ, Sahasrabudhe AA, Rolland DCM, Velusamy T, Chung F, Schaller M, et al. Genomic analyses reveal recurrent mutations in epigenetic modifiers and the JAK–STAT pathway in Sézary syndrome. *Nat Commun.* 29 sept 2015;6:8470.
32. Vaqué JP, Gómez-López G, Monsálvez V, Varela I, Martínez N, Pérez C, et al. PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood.* 27 mars 2014;123(13):2034-43.
33. Saulite I, Hoetzenecker W, Weidinger S, Cozzio A, Guenova E, Wehkamp U. Sézary Syndrome and Atopic Dermatitis: Comparison of Immunological Aspects and Targets. *BioMed Res Int [Internet].* Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4886049/>
34. Mistry N, Gupta A, Alavi A, Sibbald RG. A Review of the Diagnosis and Management of Erythroderma (Generalized Red Skin). *Adv Skin Wound Care.* mai 2015;28(5):228.
35. Nagler AR, Samimi S, Schaffer A, Vittorio CC, Kim EJ, Rook AH. Peripheral blood findings in erythrodermic patients: Importance for the differential diagnosis of Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1 mars 2012;66(3):503-8.
36. Duncan SC, Winkelmann RK. Circulating Sézary cells in hospitalized dermatology patients. *Br J Dermatol.* 1978;99(2):171-8.
37. Prince HM, Whittaker S, Hoppe RT. How I treat mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Blood.* 12 nov 2009;114(20):4337-53.
38. Prince HM, Querfeld C. Integrating novel systemic therapies for the treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol.* 1 sept 2018;31(3):322-35.
39. Leuchte K, Schlaak M, Stadler R, Theurich S, Bergwelt-Baildon M von. Innovative Treatment Concepts for Cutaneous T-Cell Lymphoma Based on Microenvironment Modulation. *Oncol Res Treat.* 2017;40(5):262-9.
40. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol.* 1 févr 2014;70(2):223.e1-223.e17.
41. Piekarczyk RL, Frye R, Turner M, Wright JJ, Allen SL, Kirschbaum MH, et al. Phase II Multi-Institutional Trial of the Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin As Monotherapy for Patients With Cutaneous T-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 10 nov 2009;27(32):5410-7.
42. Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome – Update 2017. *Eur J Cancer.* 1 mai 2017;77:57-74.

43. AL Hothali GI. Review of the treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome: A stage-based approach. *Int J Health Sci.* juin 2013;7(2):220-39.
44. Gibson JF, Huang J, Liu KJ, Carlson KR, Foss F, Choi J, et al. Cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): Current practices in blood assessment and the utility of T-cell receptor (TCR)-V β chain restriction. *J Am Acad Dermatol.* 1 mai 2016;74(5):870-7.
45. The diagnosis of Sézary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers - Klemke - 2008 - *British Journal of Dermatology* - Wiley Online Library [Internet]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2133.2008.08739.x>
46. Roelens M, Delord M, Ram-Wolff C, Marie-Cardine A, Alberdi A, Maki G, et al. Circulating and skin-derived Sézary cells: clonal but with phenotypic plasticity. *Blood.* 21 sept 2017;130(12):1468-71.
47. Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, Duvic M, Heald P, Laroche L, et al. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: Report of the international society for cutaneous lymphomas. *J Am Acad Dermatol.* 1 janv 2002;46(1):95-106.
48. Vonderheid EC, Kotecha A, Boselli CM, Bigler RD, Lessin SR, Bernengo MG, et al. Variable CD7 Expression on T Cells in the Leukemic Phase of Cutaneous T Cell Lymphoma (Sézary Syndrome). *J Invest Dermatol.* 1 sept 2001;117(3):654-62.
49. Kelemen K, Guitart J, Kuzel TM, Goolsby CL, Peterson LC. The Usefulness of CD26 in Flow Cytometric Analysis of Peripheral Blood in Sézary Syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1 janv 2008;129(1):146-56.
50. Hristov AC, Vonderheid EC, Borowitz MJ. Simplified Flow Cytometric Assessment in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1 déc 2011;136(6):944-53.
51. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, et al. Clinical End Points and Response Criteria in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: A Consensus Statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol.* 20 juin 2011;29(18):2598-607.
52. Bernengo MG, Novelli M, Quaglino P, Lisa F, Matteis AD, Savoia P, et al. The relevance of the CD4+ CD26- subset in the identification of circulating Sézary cells. *Br J Dermatol.* 2001;144(1):125-35.
53. Hurabielle C, Thonnart N, Ram-Wolff C, Sicard H, Bensussan A, Bagot M, et al. Usefulness of KIR3DL2 to Diagnose, Follow-Up, and Manage the Treatment of Patients with Sézary Syndrome. *Clin Cancer Res.* 15 juill 2017;23(14):3619-27.
54. Oshtory S, Apisarnthanarax N, Gilliam AC, Cooper KD, Meyerson HJ. Usefulness of flow cytometry in the diagnosis of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* 1 sept 2007;57(3):454-62.
55. Buus TB, Willerslev-Olsen A, Fredholm S, Blümel E, Nastasi C, Glud M, et al. Single-cell heterogeneity in Sézary syndrome. *Blood Adv.* 28 août 2018;2(16):2115-26.

56. Novelli M, Fava P, Sarda C, Ponti R, Osella-Abate S, Savoia P, et al. Blood Flow Cytometry in Sézary Syndrome: New Insights on Prognostic Relevance and Immunophenotypic Changes During Follow-up. *Am J Clin Pathol*. 1 janv 2015;143(1):57-69.
57. Scarisbrick JJ, Hodak E, Bagot M, Stranzenbach R, Stadler R, Ortiz-Romero PL, et al. Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur J Cancer*. 1 avr 2018;93:47-56.
58. Bagot M, Moretta A, Sivori S, Biassoni R, Cantoni C, Bottino C, et al. CD4+ cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140–killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 1 mars 2001;97(5):1388-91.
59. Bouaziz J-D, Remtoula N, Bensussan A, Marie-Cardine A, Bagot M. Absolute CD3+ CD158k+ lymphocyte count is reliable and more sensitive than cytomorphology to evaluate blood tumour burden in Sézary syndrome. *Br J Dermatol*. 2010;162(1):123-8.
60. Wechsler J, Bagot M, Nikolova M, Parolini S, Martin-Garcia N, Boumsell L, et al. Killer cell immunoglobulin-like receptor expression delineates in situ Sézary syndrome lymphocytes. *J Pathol*. 2003;199(1):77-83.
61. Klemke C-D, Brade J, Weckesser S, Sachse MM, Booken N, Neumaier M, et al. The diagnosis of Sézary syndrome on peripheral blood by flow cytometry requires the use of multiple markers. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):871-80.
62. Poszepczynska-Guigné E, Schiavon V, D'Incan M, Echchakir H, Musette P, Ortonne N, et al. CD158k/KIR3DL2 Is a New Phenotypic Marker of Sezary Cells: Relevance for the Diagnosis and Follow-Up of Sezary Syndrome. *J Invest Dermatol*. 1 mars 2004;122(3):820-3.
63. Bahler DW, Hartung L, Hill S, Bowen GM, Vonderheid EC. CD158k/KIR3DL2 is a useful marker for identifying neoplastic T-cells in Sézary syndrome by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74B(3):156-62.
64. Thonnart N, Caudron A, Legaz I, Bagot M, Bensussan A, Marie-Cardine A. KIR3DL2 is a coinhibitory receptor on Sézary syndrome malignant T cells that promotes resistance to activation-induced cell death. *Blood*. 20 nov 2014;124(22):3330-2.
65. Nicolay JP, Felcht M, Schledzewski K, Goerdts S, Géraud C. Sézary syndrome: old enigmas, new targets. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 2016;14(3):256-64.
66. Krummel MF. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1 août 1995;182(2):459-65.
67. Yin L, Schneider H, Rudd CE. Short cytoplasmic SDYMMN segment of CD28 is sufficient to convert CTLA-4 to a positive signaling receptor. *J Leukoc Biol*. 2003;73(1):178-82.
68. Ungewickell A, Bhaduri A, Rios E, Reuter J, Lee CS, Mah A, et al. Genomic analysis of mycosis fungoides and Sézary syndrome identifies recurrent alterations in TNFR2. *Nat Genet*. sept 2015;47(9):1056-60.
69. Sekulic A, Liang WS, Tembe W, Izatt T, Kruglyak S, Kiefer JA, et al. Personalized treatment of Sézary syndrome by targeting a novel CTLA4:CD28 fusion. *Mol Genet Genomic Med*. mars 2015;3(2):130-6.

70. Wada DA, Wilcox RA, Harrington SM, Kwon ED, Ansell SM, Comfere NI. Programmed death 1 is expressed in cutaneous infiltrates of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Am J Hematol.* 2011;86(3):325-7.
71. Nguyen GH, Olson LC, Magro CM. Upregulation of inhibitory signaling receptor programmed death marker-1 (PD-1) in disease evolution from cutaneous lymphoid dyscrasias to mycosis fungoides and Sezary's syndrome. *Ann Diagn Pathol.* 1 juin 2017;28:54-9.
72. Kantekure K, Yang Y, Raghunath P, Schaffer A, Woetmann A, Zhang Q, et al. Expression patterns of the immunosuppressive proteins PD-1/CD279 and PD-L1/CD274 at different stages of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)/mycosis fungoides (MF). *Am J Dermatopathol.* févr 2012;34(1):126-8.
73. Çetinözman F, Jansen PM, Willemze R. Expression of programmed death-1 in skin biopsies of benign inflammatory vs. lymphomatous erythroderma. *Br J Dermatol.* 2014;171(3):499-504.
74. Horna P, Moscinski LC, Sokol L, Shao H. Naïve/Memory T-Cell Phenotypes in Leukemic Cutaneous T-Cell Lymphoma: Putative Cell of Origin Overlaps Disease Classification. *Cytometry B Clin Cytom* [Internet]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cyto.b.21738>
75. Samimi S, Benoit B, Evans K, Wherry EJ, Showe L, Wysocka M, et al. Increased Programmed Death-1 Expression on CD4+ T Cells in Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Arch Dermatol.* déc 2010;146(12):1382-8.
76. Fayyad UM, Irani KB. Multi-Interval Discretization of Continuous-Valued Attributes for Classification Learning. *Int Jt Conf Artif Intell.* 1993;2:1022-9.
77. Gassen SV, Callebaut B, Helden MJV, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A.* 2015;87(7):636-45.
78. Pulitzer M. Cutaneous T-cell Lymphoma. *Clin Lab Med.* sept 2017;37(3):527-46.
79. Çetinözman F, Jansen PM, Vermeer MH, Willemze R. Differential Expression of Programmed Death-1 (PD-1) in Sézary Syndrome and Mycosis Fungoides. *Arch Dermatol.* 1 déc 2012;148(12):1379-85.
80. Vonderheid EC, Hou JS. CD4+CD26- lymphocytes are useful to assess blood involvement and define B ratings in cutaneous T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1 févr 2018;59(2):330-9.
81. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 5 août 2010;116(5):767-71.
82. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia.* oct 1994;8(10):1640-5.
83. Chevret E, Merlio J-P. Sézary Syndrome: Translating Genetic Diversity into Personalized Medicine. *J Invest Dermatol.* juill 2016;136(7):1319-24.

84. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 22 mars 2012;12(4):252-64.
85. Dummer R, Heald PW, Nestle FO, Ludwig E, Laine E, Hemmi S, et al. Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain). *Blood*. 15 août 1996;88(4):1383-9.
86. Krejsgaard T, Gjerdrum LM, Ralfkiaer E, Lauenborg B, Eriksen KW, Mathiesen A-M, et al. Malignant Tregs express low molecular splice forms of FOXP3 in Sézary syndrome. *Leukemia*. déc 2008;22(12):2230-9.
87. Krejsgaard T, Ralfkiaer U, Clasen-Linde E, Eriksen KW, Kopp KL, Bonefeld CM, et al. Malignant cutaneous T-cell lymphoma cells express IL-17 utilizing the Jak3/Stat3 signaling pathway. *J Invest Dermatol*. juin 2011;131(6):1331-8.
88. Ridley A, Hatano H, Wong-Baeza I, Shaw J, Matthews KK, Al-Mossawi H, et al. Activation-Induced Killer Cell Immunoglobulin-like Receptor 3DL2 Binding to HLA-B27 Licenses Pathogenic T Cell Differentiation in Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol Hoboken Nj*. 28 mars 2016;68(4):901-14.

STUDY OF PHENOTYPIC MARKERS IN THE DIAGNOSIS AND THE FOLLOW-UP OF CUTANEOUS T CELLS LYMPHOMAS BY FLOW CYTOMETRY

The Sézary syndrome is a rare aggressive cutaneous T cell lymphoma. Its prognosis is poor. Its diagnosis is difficult and needs to combine clinical, pathology and biology features. Based on a retrospective cohort of patients from Toulouse University Hospital, 4 groups have been compared: patients with a Sézary syndrome, with a Mycosis Fungoid, with another clonal T CD4+ blood disease or with a benign dermatosis.

Firstly, we validated the Sézary syndrome criteria of diagnosis using flow cytometry in our daily practice. We designed a phenotypic score applicable to the Sézary syndrome diagnosis. The score was composed by the percentage and rate of CD4+CD26-, CD4+CD7-, CD4+CD26-CD158k+ and CD4+CD26-PD-1+ cells.

Furthermore, this work highlighted the existence of several phenotypic sub-types of Sézary syndrome that differentially responded to therapies. This work will have to be further validated by using a larger cohort of Sézary syndrome patients.

ETUDE DES MARQUEURS PHENOTYPIQUES DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES LYMPHOMES T CUTANES PAR CYTOMETRIE EN FLUX

RESUME en français

Le syndrome de Sézary est un lymphome T cutané peu fréquent dont le pronostic reste sombre. Son diagnostic, difficile, est à la fois clinique, anatomopathologique et biologique. A partir d'une cohorte de patients du CHU de Toulouse, 4 groupes de populations différentes ont été définis : les patients ayant un syndrome de Sézary, ceux ayant un mycosis fongoïde, les patients ayant d'autres hémopathies lymphoïdes T CD4+ et ceux qui ont une dermatose inflammatoire réactionnelle. Nous avons dans un premier temps validé les critères diagnostiques du syndrome de Sézary par cytométrie en flux dans notre pratique courante. Nous avons élaboré un score phénotypique applicable au diagnostic de syndrome de Sézary en routine. Ce score comprend le pourcentage et le taux de cellules CD4+CD26-, CD4+CD7-, CD4+CD26-CD158k+ et CD4+CD26-PD-1+. Ce travail a de plus mis en évidence l'existence de plusieurs sous-types phénotypiques de syndrome de Sézary ayant des réponses thérapeutiques différentes. Ce travail rétrospectif devra être validé sur une plus large cohorte de syndrome de Sézary.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

DISCIPLINE administrative : Pharmacie-Biologie médicale

MOTS-CLES : Lymphomes T cutanés / Syndrome de Sézary / Cytométrie en flux

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR : Université Toulouse III-Paul Sabatier-Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 35 Chemin des Maraîchers 31 062 Toulouse Cedex 9

Directeur de thèse : Dr VERGEZ François