

Proliférations T gamma delta dans les tularémies

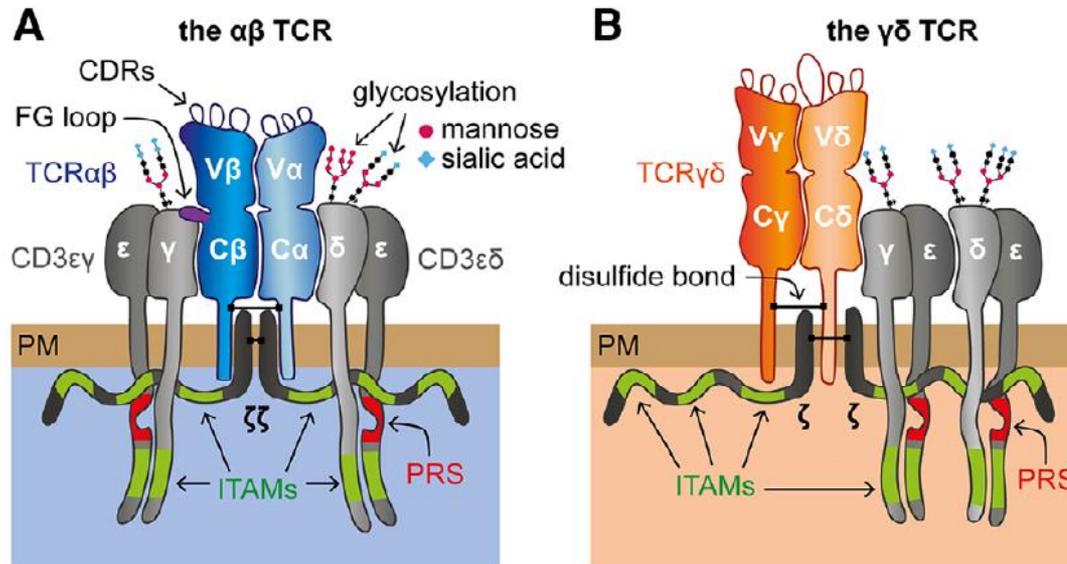
Réunion des Centres de Référence & de Compétence des Maladies
Vectorielles liées aux Tiques du Grand Ouest, Quimper 02 juin 2022

Bertrand ARNAUD

Laboratoire d'Hématologie CH Cornouaille

Lymphocytes T $\gamma\delta$

Deux types de lymphocytes T



- Lymphocytes T $\alpha\beta$
 - Majoritaires
 - Immunité adaptative
 - TCR $\alpha\beta$, associé au CD3 et au CD4 ou au CD8
- Lymphocytes T $\gamma\delta$
 - Peu nombreux (environ 5% des lymphocytes T circulants)
 - Immunité innée ou adaptative
 - TCR $\gamma\delta$, associé au CD3, mais **n'exprime pas le CD4 et pas (ou peu) le CD8**

Fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$

- Réponse immunitaire indépendante du CMH
- Reconnaissance directe d'Ag
- Reconnaissance de produits issus du métabolisme bactérien (phosphoantigènes)

- Impliqués dans la défense contre les agents infectieux intracellulaires
- Défense antitumorale

T $\gamma\delta$: variations physiologiques

- Médiane 4.3% (1.2 – 15.4%) en % des lymphocytes T
- 63 /mm³ (9-253 /mm³)
- Excès : > 15% ou > 300 /mm³
- Taux augmentés chez les enfants
- Variations induites par les traitements
 - Taux augmentés par les biphosphonates
 - Taux diminués par les statines

T $\gamma\delta$: variations pathologiques

Taux augmentés dans de nombreuses circonstances

- Bactéries : tuberculose, salmonellose, brucellose, légionellose, listériose, **tularémie**
- CMV et autres Herpes virus
- HIV, HTLV-I, HBV, HCV
- Protozoaires : paludisme, toxoplasmose, leishmaniose
- Maladies auto-immunes : PR, thyroïdites, hépatites, myosites, maladies inflammatoires de l'intestin, lupus, SGS
- Néoplasies diverses (rôle suppresseur de tumeur)
- Rares lymphomes T gamma/delta

Intérêt de la recherche des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les tularémies ?

Adénopathie médiastinale chez une patiente de 33 ans

Mme O, 33 ans

- Antécédents
 - Thyroïdite de Hashimoto
 - Pyélonéphrite 2020
 - Amygdalectomie

- Entrée aux urgences (DZ) pour douleur thoracique évoluant depuis 2 jours

Hospitalisation

- A l'entrée aux urgences
 - Douleur thoracique rétro-sternale augmentée à l'inspiration (en fait déjà présente depuis plusieurs semaines, mais s'aggravant)
 - Fébricule 38°C
 - Sueurs nocturnes
 - Nausées
 - Anorexie
- Bio
 - Tropono, BNP normaux
 - D-Dimères = 608 ng/mL
 - CRP = 50 g/L
 - NFS normale
- Réalisation d'un angioscanner pour éliminer une EP (avis cardio)
 - Pas d'argument pour une EP
 - Découverte fortuite d'une masse sous-carénaire péri-oesophagienne 40 x 17 mm, suspecte

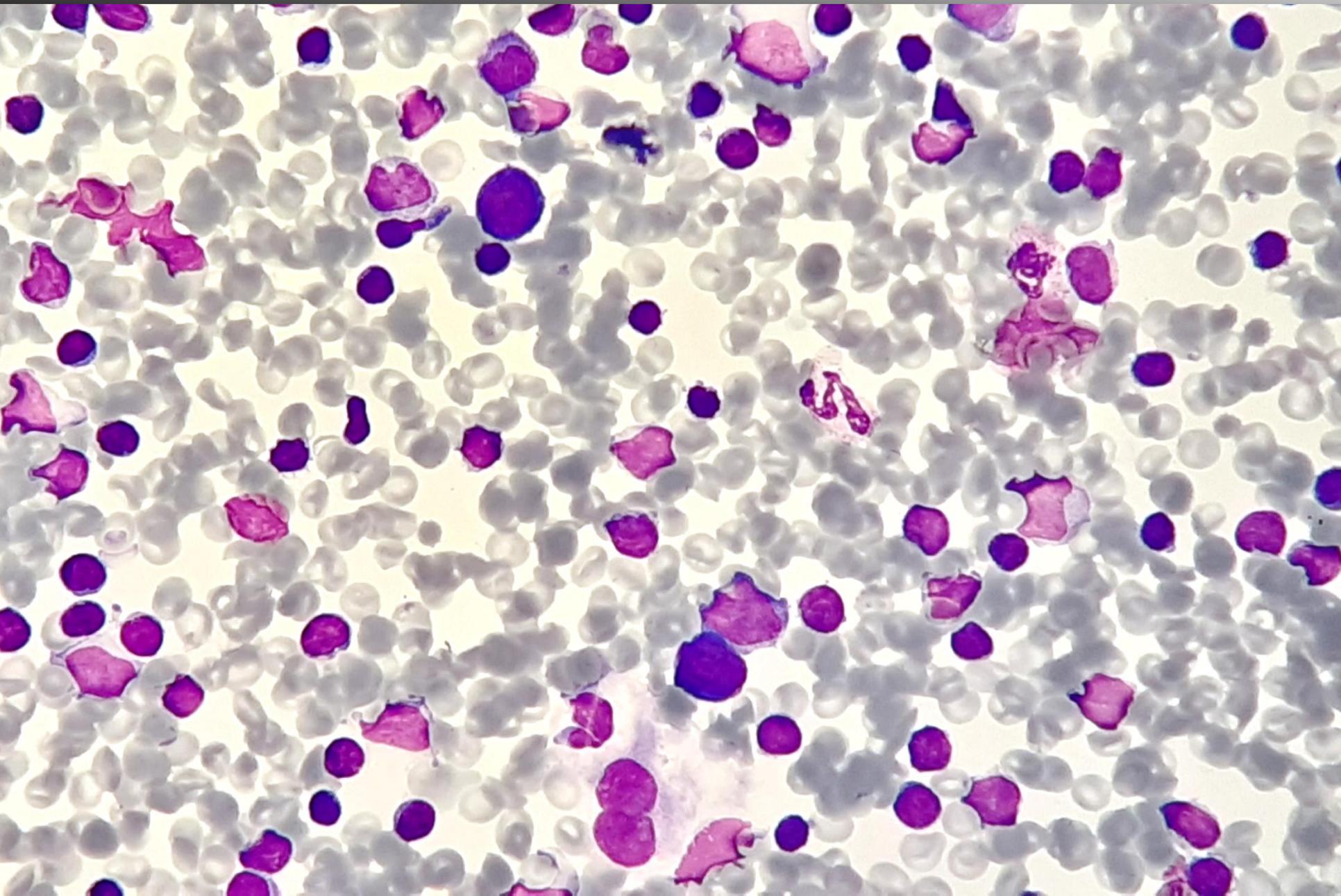
TEP Scanner

Masse sous-carénaire hypermétabolique 45 mm (SUV max = 23.7)
+ autres fixations ganglionnaires médiastinales

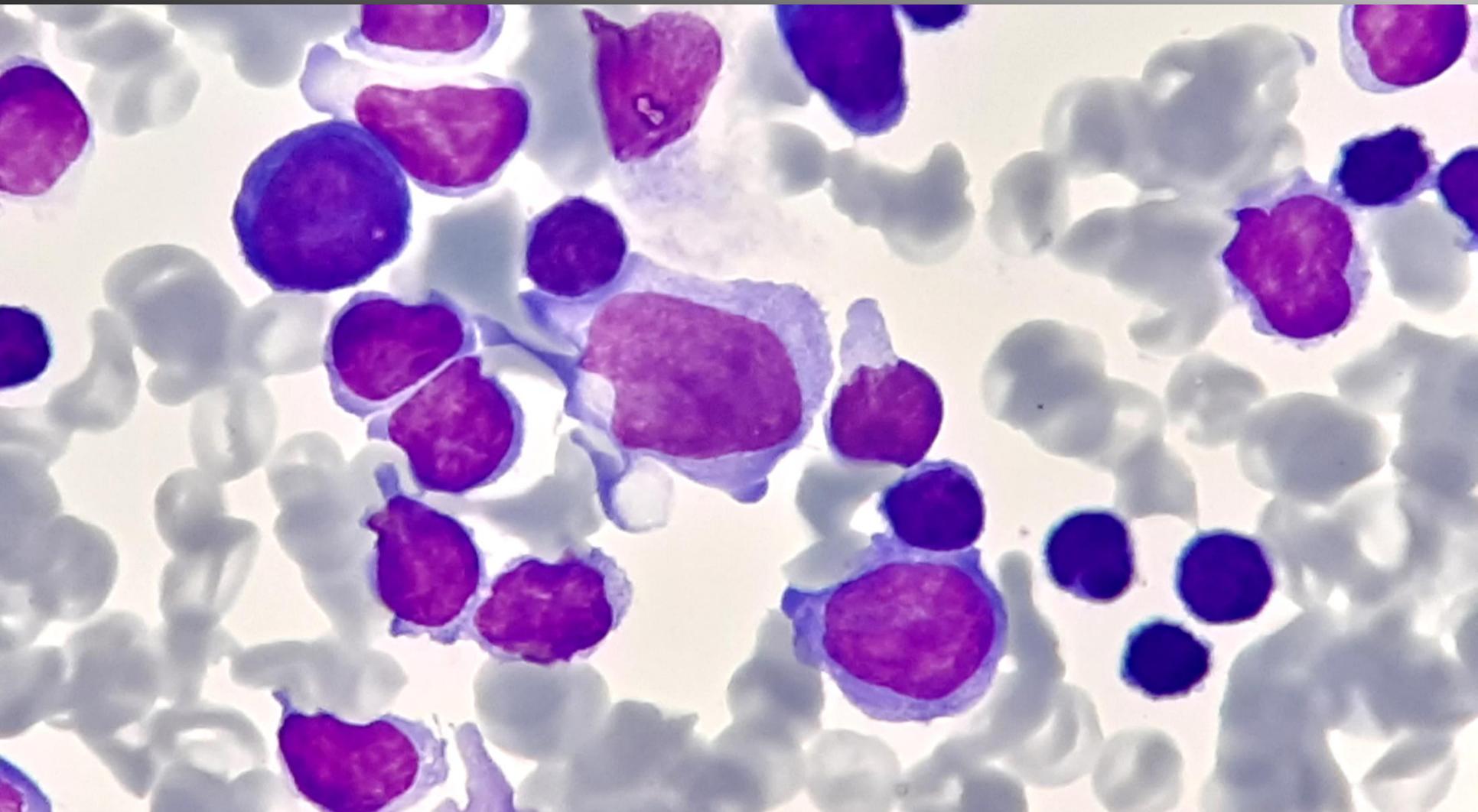


Hypothèse tumorale : lymphome ? Carcinome ?

Fibroskopie bronchique avec cytoponction

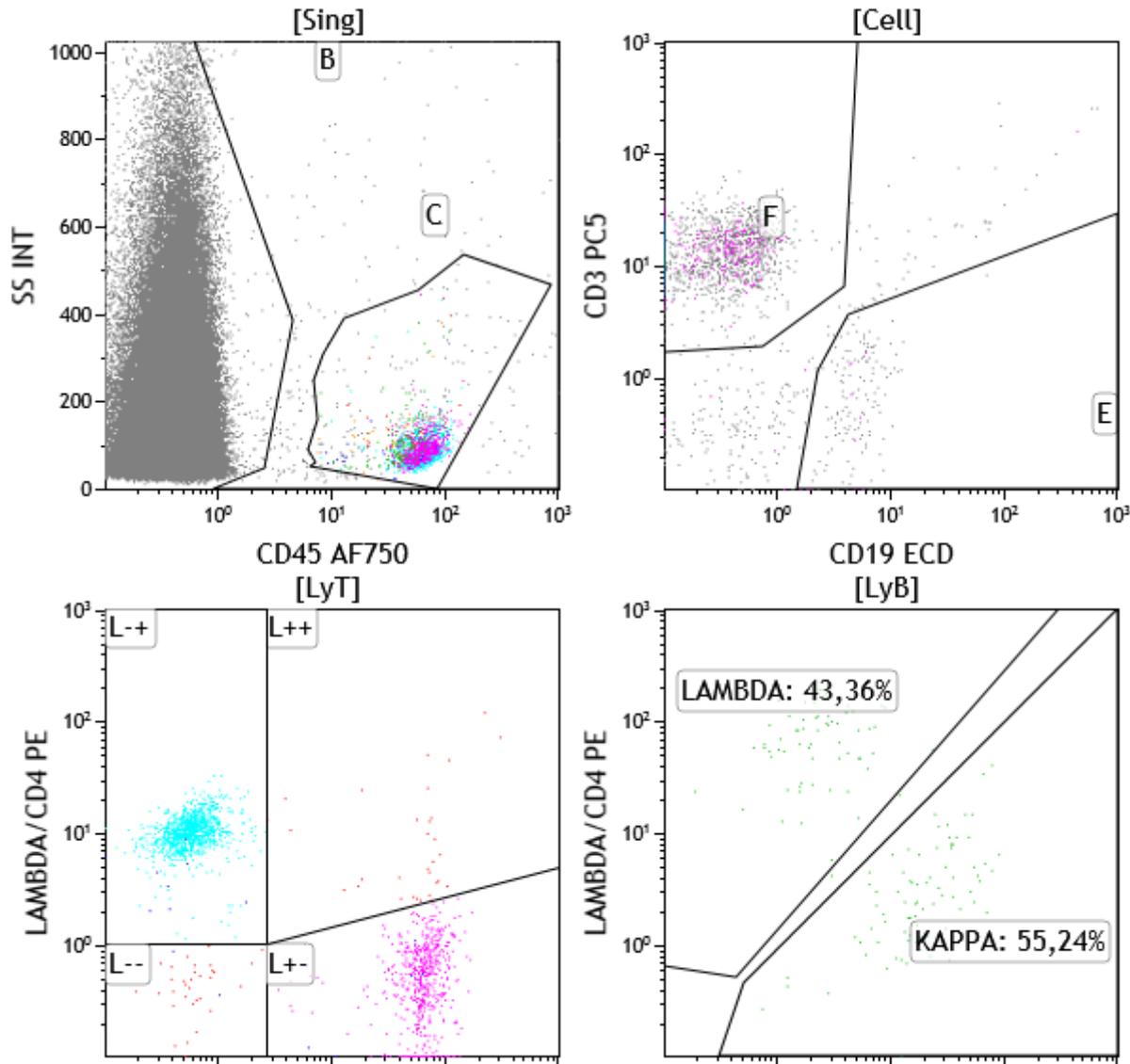


Fibroskopie bronchique avec cytoponction



Population lymphoïde polymorphe, sans atypie
Aspect réactionnel

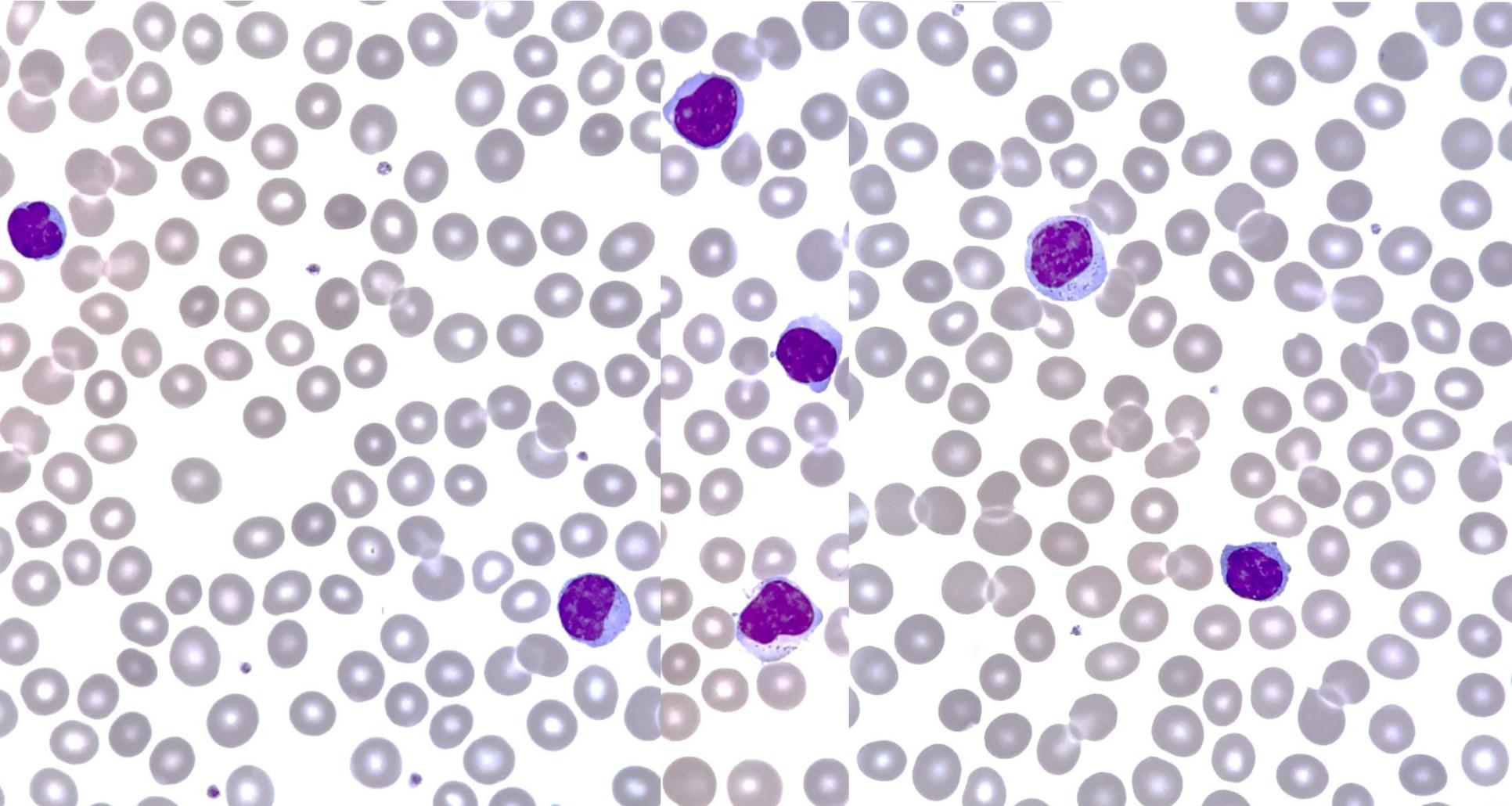
Phénotypage sur micro fragments



Lymphocytes
polytypiques

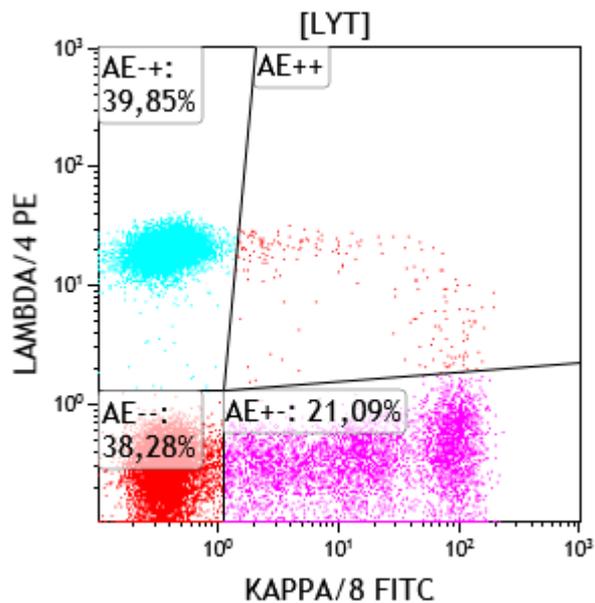
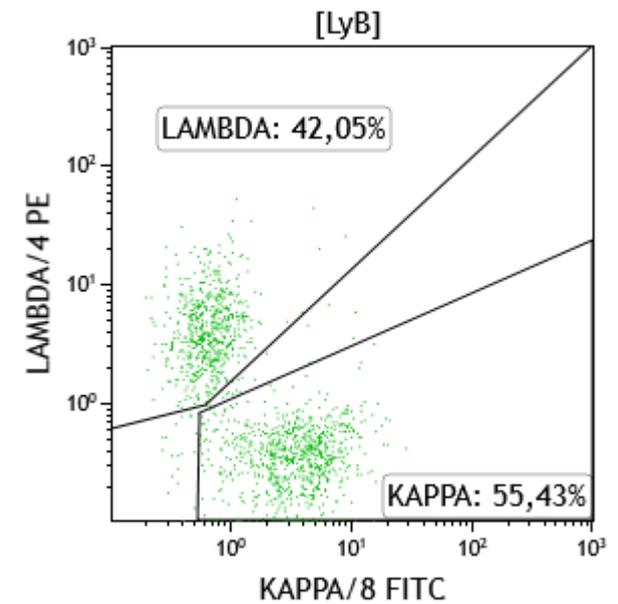
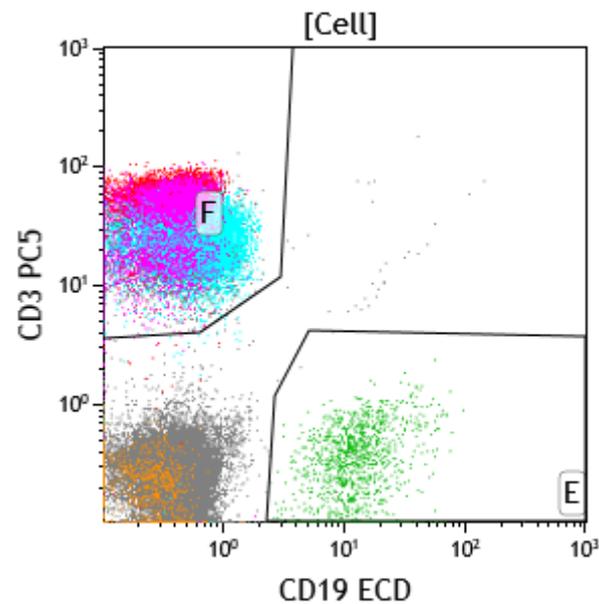
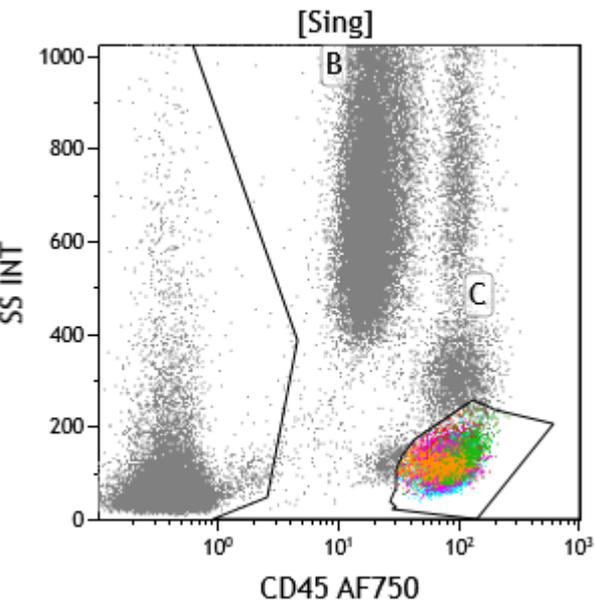
Anatomo-pathologie : ganglion réactionnel

Morphologie des lymphocytes circulants



Lymphocytes polymorphes, sans atypie

Phénotypage des lymphocytes circulants

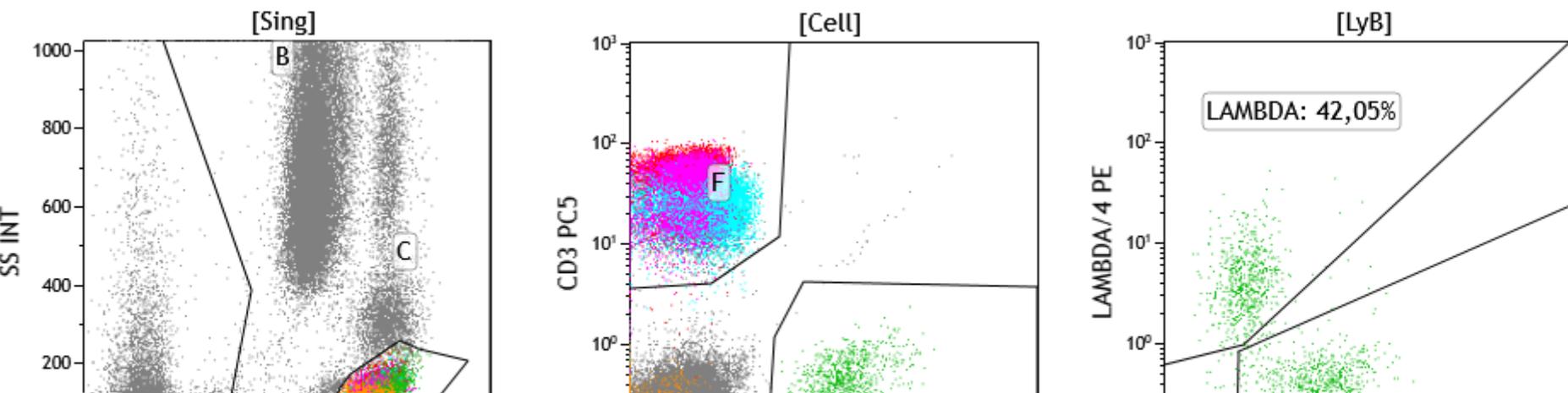


Excès de T CD4- CD8-
38% des lymphocytes T

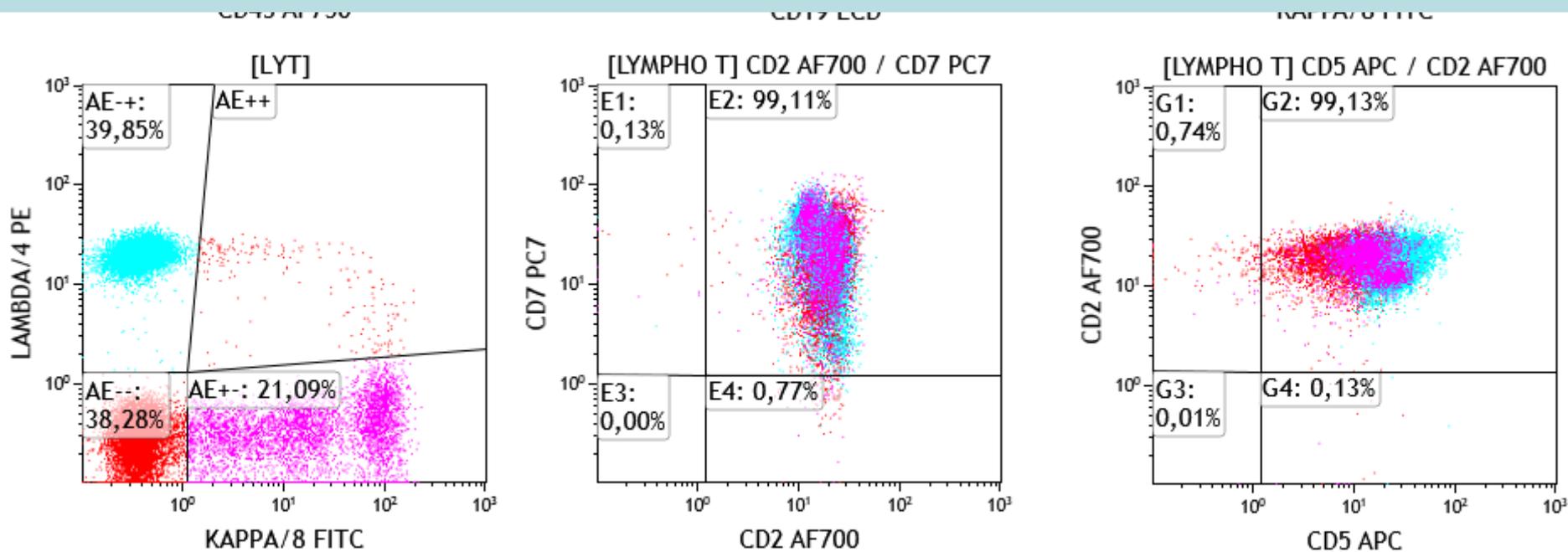
Phénotypage des lymphocytes circulants

Etude complémentaire des marqueurs T : CD2, CD5 et CD7

Phénotypage des lymphocytes circulants



Absence d'anomalie d'expression des marqueurs T testés



Origine des lymphocytes T CD4- CD8- circulants

- Lymphome ?
 - Lymphomes T gamma/delta
 - Lymphome T primitif de l'intestin : 36% de type T $\gamma\delta$
 - Lymphome T hépato-splénique : morphologie spécifique (noyau en trèfle)
 - Lymphome T cutané primitif gamma/delta
 - Rares MF type gamma/delta
 - Peu probable :
 - Absence d'anomalie des marqueurs T
 - Morphologie des lymphocytes normale
 - Absence de localisation évidente autre que les adénopathies médiastinales, absence d'hépto-splénomégalie, absence d'atteinte cutanée
- Lymphocytose réactionnelle à lymphocytes T gamma/delta ?
 - Viroses : CMV, HIV, HCV, HHV8
 - Bactéries intracellulaires : mycobactéries, *Francisella*, *Brucella*
 - Tumeurs solides
 - Hémopathies : activité anti-leucémique/lymphomateuse en association avec les NK
 - Maladies inflammatoires : sarcoïdose

Bilan infectieux

- Sérologies HBV(immunité vaccinale), HCV, HAV, CMV, EBV, HIV, TPHA négatives

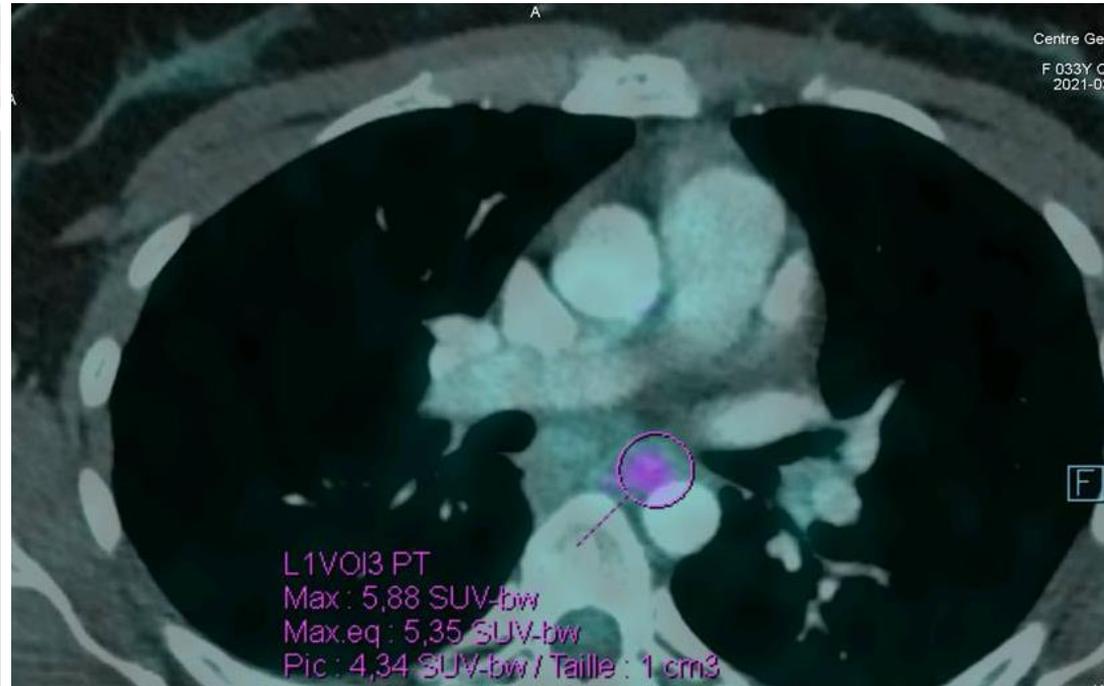
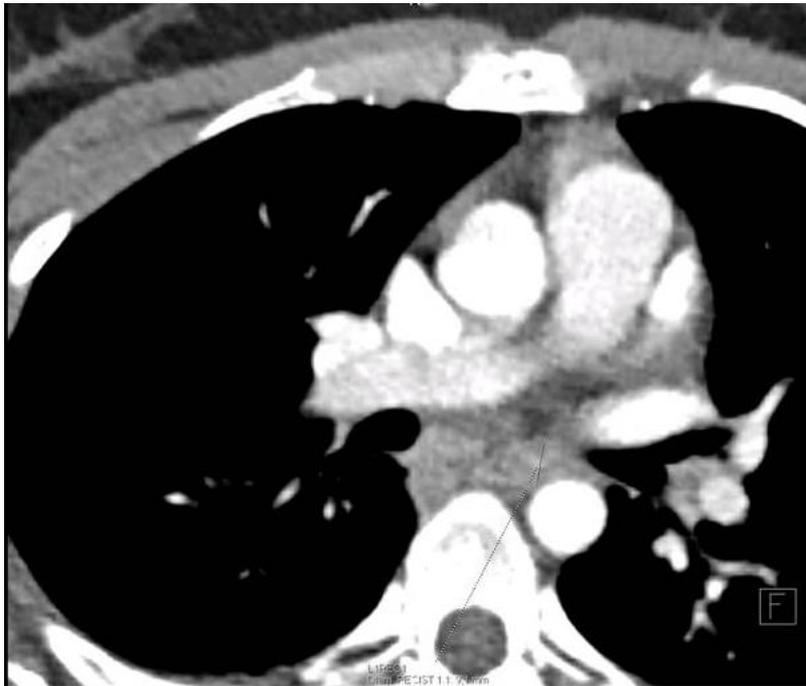
Sérologies complémentaires sont réalisées sur le sérum congelé

- Sérologie *Bartonella* négative
 - Sérologie *Francisella tularensis* positive (IFI, Marseille)
 - IgM 200 (N<50)
 - IgG 800 (N<100)
- Contrôle à J25
- IgM 200 (N<50)
 - IgG 1600 (N<100)
- PCR *Francisella* sur microfragment ganglionnaire
 - Négative (mais petit fragment, conservé 10j à TA)
 - Hémocultures négatives

Diagnostic retenu : **Tularémie**

Traitement

- Doxycycline 14 jours



- Contrôle 2 mois plus tard : nette régression des anomalies

Intérêt de la recherche de T $\gamma\delta$?

Etude rétrospective CD4-8-

Outils biologiques pour le diagnostic des tularémies

- Cultures bactériennes rarement positives (<10%)
- PCR
 - Permet un diagnostic précoce
 - Réalisable sur suppuration, chancre, biopsies (ganglion), LBA
- Sérologie +++
 - Microagglutination, IFI, ELISA
 - Ac apparaissent 10-15 j après l'apparition des symptômes : répéter la sérologie 2 semaines plus tard

Objectif

Comparer les taux de lymphocytes T CD4-8- des patients atteints de tularémie à ceux de la population générale

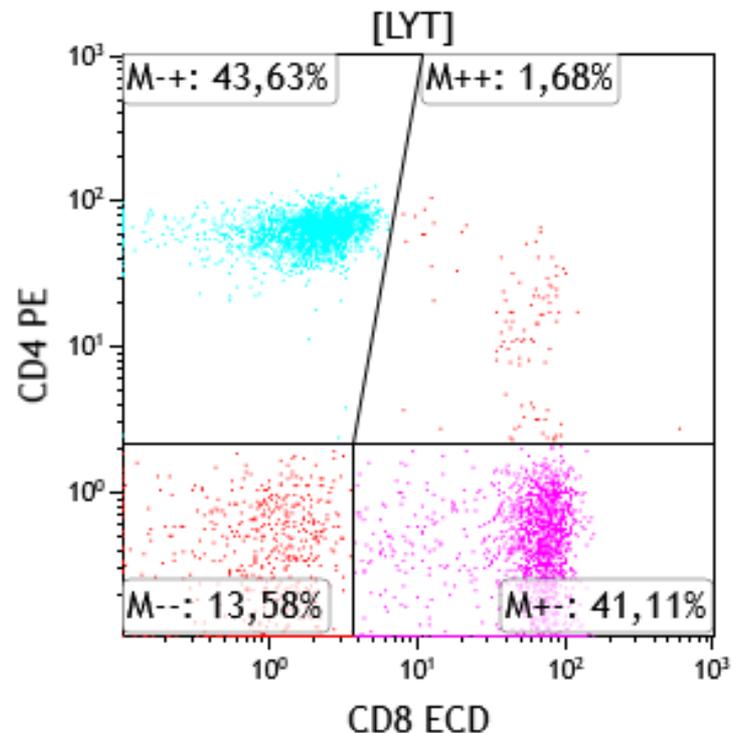
Données analysées

Reprise systématique de tous les phénotypages lymphocytaires réalisés entre juillet 2020 et janvier 2022

- Recherche et suivi de SLP : panel d'orientation CD3 CD4 CD8 CD19 CD56 CD5 CD23 CD10 kappa lambda CD45
- Sous-population lymphocytaires CD3 CD4 CD8 CD19 CD56 CD45
- Profil des patients concernés :
 - Suspicion / suivis de SLP, lymphomes
 - Recherche de déficits immunitaires
 - Suivis de traitements (immunosuppresseurs, anti-CD20)
 - En fin de période : suspicions de tularémie
- Remarque : les simples déterminations des taux de T CD4+ et T CD8+, essentiellement réalisées dans le cadre des suivis VIH, n'ont pas été exploitées

Données analysées : CD4-8-

- Recherche systématique sur le système informatique du laboratoire
- Calcul du taux approché de lymphocytes T CD4-8-
(CD3 – CD4 – CD8)/CD3x100 en %
- Réanalyse sur le logiciel de cytométrie de tous les phénotypes pour lequel le % approché > 10%
 - Elimination des populations CD4+8+
 - Meilleure précision sur le % de CD4-8-
 - Taux mesurés de CD4-8- retenus



Tularémies

Sélectionnées parmi les patients ayant bénéficié d'un phénotypage lymphocytaire

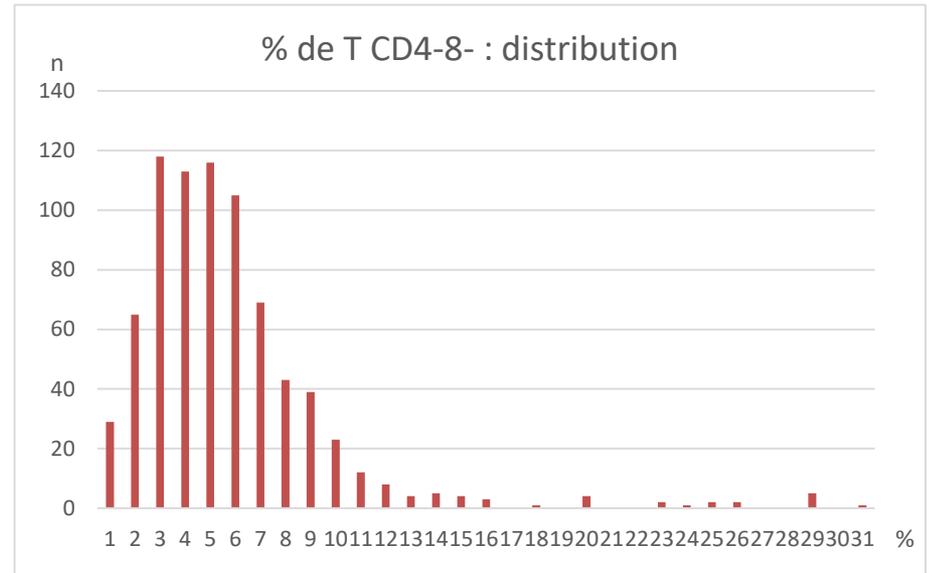
- Sérologie positive
- Et/ou PCR positive
- Et diagnostic de tularémie retenu par le clinicien

Résultats

- Total 781 analyses

CD4-8- en % des T

Médiane : 4,6%



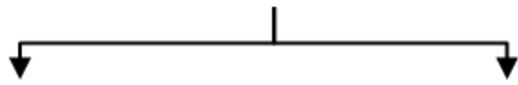
Patients totaux

781



Exclusion des doublons

612



CD4-8- < 10%

526



tularémies

1 (CD4-8- = 6,6%)

CD4-8- > 10%

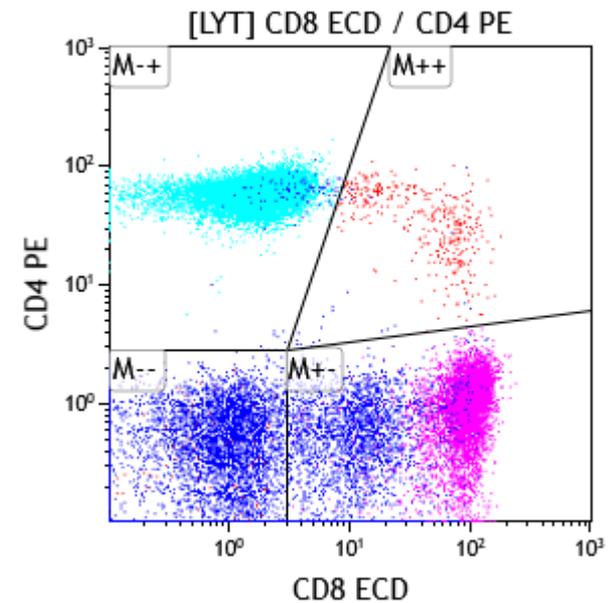
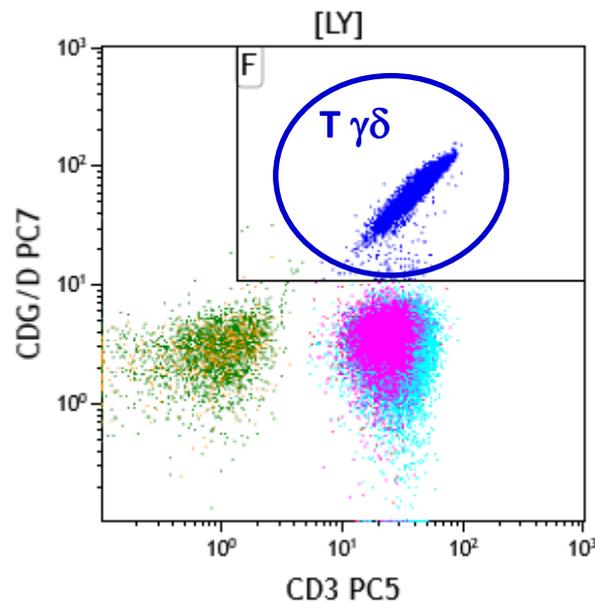
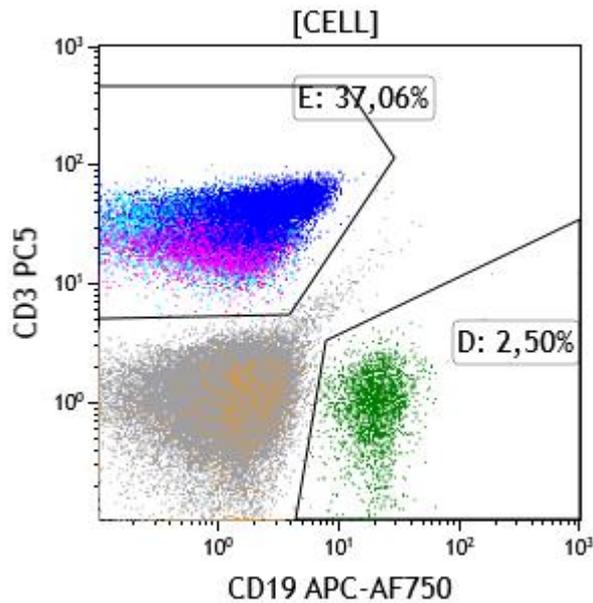
46



tularémies

16 (35%)

Les CD4-8- sont des lympho T $\gamma\delta$



- Expression de T $\gamma\delta$ mesurée dans 14/ 17 tularémies
- Les T CD4-8- expriment le TCR $\gamma\delta$
- Une petite fraction des T $\gamma\delta$ exprime faiblement le CD8
- Les T $\gamma\delta$ sont élevés chez le patient de notre série T CD4-8- < 10% (le CD8 est faiblement exprimé)

CD4-8-	T $\gamma\delta$
5,1	19,8
12	14,9
13,4	15,9
14,5	17,9
18,2	18,5
19,4	22
22,4	30,4
23,5	29
24,8	26,1
24,6	28,6
34,1	31,9
36,5	36,1
44,1	46,7
52,3	57

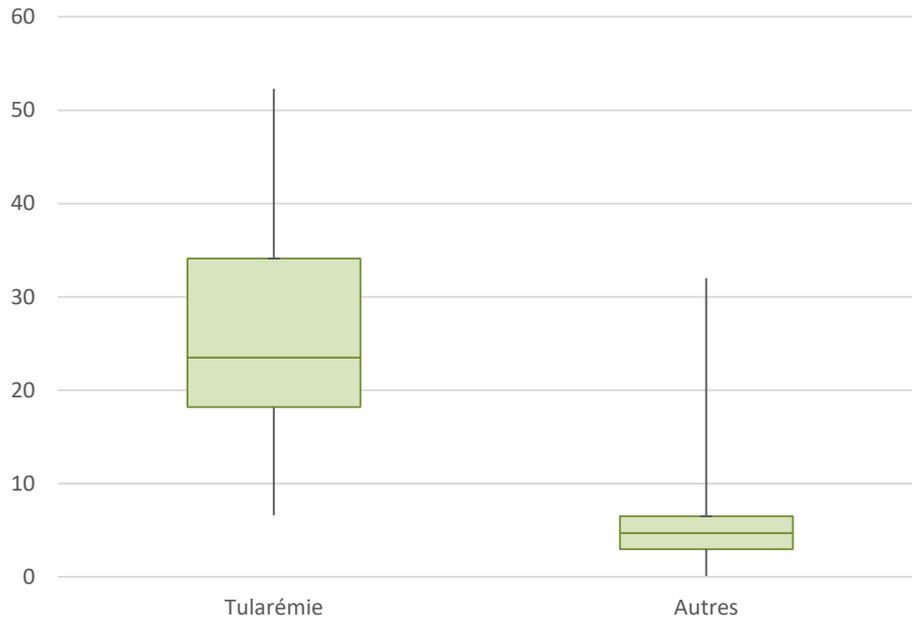
CD4-8- > 10% sans tularémie

30 patients

- Lymphome / SLP : 11
- Enfants < 10 ans : 5
- SEP, immunosuppresseurs : 5
- Divers
 - 1 DICV
 - 1 Infection M. avium
 - 1 VIH
- Absence de diagnostic : 6
 - Sérologie tularémie négative chez 3 des patients

Taux de CD4-8-

T CD4-8- %



	Tularémies	Autres
n	17	595
Lymphocytes	2,75 ± 1,17 G/L	4,39 ± 12,7 G/L
T CD4-8-	25,5 ± 12,2 %	5,2 ± 3,9 %

p = 0,000004

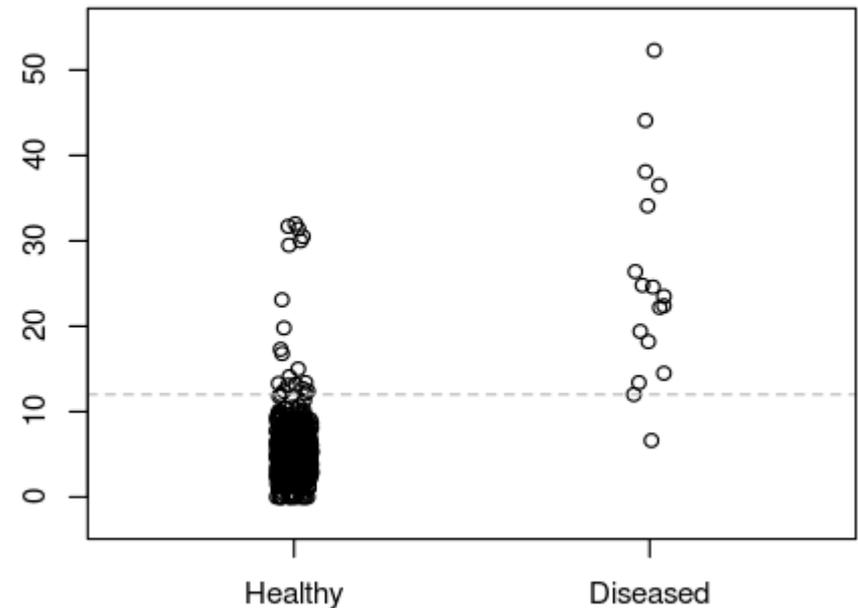
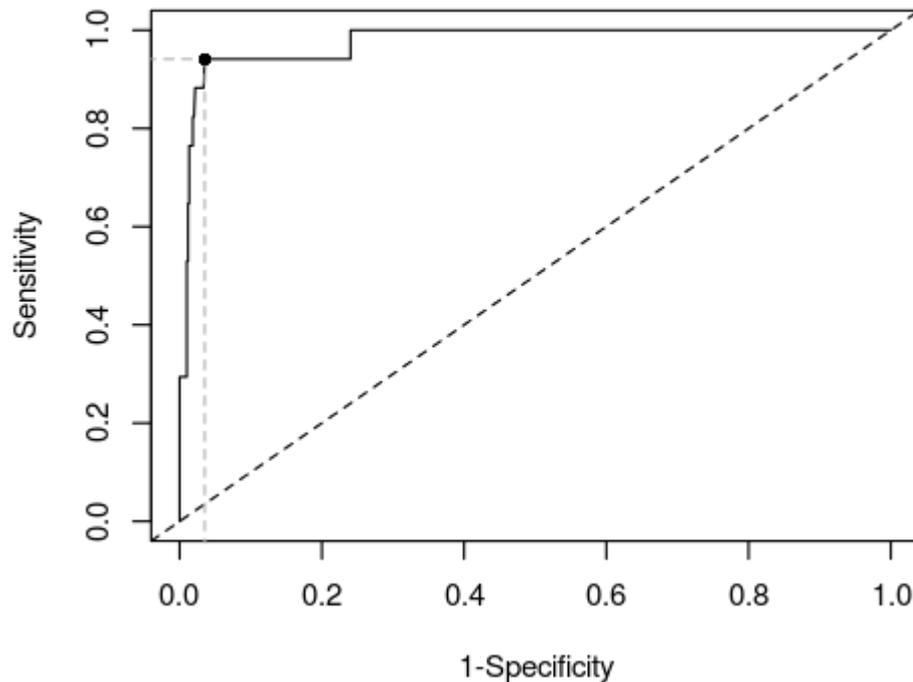
Taux de CD4-8- significativement augmentés dans les tularémies

Courbes ROC

Seuil optimal CD4-8- : 12%

- Sensibilité : 94%
- VPP : 43%

ROC Curve



Limites

- Statut sérologique vis-à-vis de *F. tularensis* inconnu chez les patients « sains »
- Biais de recrutement (hématologie, déficit immunitaire)
- Etudes prospectives nécessaires sur des témoins

Early Diagnosis of Tularemia by Flow Cytometry, Czech Republic, 2003–2015¹

Aleš Chrdle, Pavlína Tinavská, Olga Dvořáčková, Pavlína Filipová, Věra Hnetilová,
Pavel Žampach, Květoslava Batistová, Václav Chmelík, Amanda E. Semper, Nick J. Beeching

- Etude phénotypique T CD4- CD8- 2003-2015
- 64 tularémies / 342 cas contrôles séronégatifs
- Seuil 8% : sensibilité 95,3%, spécificité 89,5%
- L'apparition des T CD4- CD8- précède d'au moins 7 jours la positivité de la sérologie

Conclusion

- Tularémie : présentation clinique souvent non spécifique, parfois proche d'un lymphome
- La présence d'une population T CD4- CD8- est fréquemment associée à une tularémie
possible variations géographiques ?
- En cas de suspicion clinique de tularémie, la recherche de T CD4-8- est un argument en faveur du diagnostic
 - Réponse rapide (24h)
 - Examen disponible dans presque tous les centres hospitaliers
 - Une simple recherche des sous-populations CD4/CD8 suffit. Il faut bien préciser dans la demande « recherche de lymphocytes T CD4-8- ».
- Au laboratoire, la mise en évidence fortuite d'un excès de lymphocytes T CD4-8- doit faire évoquer une tularémie

Remerciements

Médecine interne

Jérémy KERAEN

Infectiologie

Brice Guerpillon

Nadia Saïdani

Jean-Philippe Talarmin

Lydie khatchatourian

Pneumologie

Nicolas BIZIEN

Laboratoire

Equipe de techniciens Hémato /
Séro / Bio moléculaire

Florence LE GALL

Marie-Sarah FANGOUS

Aurélie CHAUVEAU

Bruno LANSON