

Université de Montréal

**Caractérisation des lymphopénies post-chirurgies cardiaques de type Fontan**

Par

Jean-Nicolas Boursiquot

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de  
l'obtention du grade de maître (M.Sc.) en sciences biomédicales

Février 2013

© Jean-Nicolas Boursiquot

# Résumé

La thymectomie est un geste chirurgical fréquemment nécessaire lors des interventions cardiaques en période néonatale. Il est connu que la résection du thymus entraîne une lymphopénie ne semblant pas avoir de conséquences cliniques graves. La lymphopénie constatée serait plus importante chez les patients ayant eu une chirurgie cardiaque de type Fontan. Toutefois, on ignore si la lymphopénie est uniquement secondaire à la thymectomie ou si elle est liée à ce type particulier de chirurgie cardiaque.

La présente recherche porte sur 19 patients opérés selon l'approche Fontan; ils ont été comparés à 6 patients "contrôle" ayant eu une thymectomie au cours d'une chirurgie cardiaque d'un autre type. Les résultats indiquent que les patients de type Fontan accusent une diminution du nombre de cellules naïves CD4+ et CD8+ et plus particulièrement une baisse de leurs émigrants thymiques (CD45RA+CD31+/CD4+). On note en contrepartie une expansion du répertoire mémoire (CD45RO+). Ces altérations lymphocytaires sont comparables aux contrôles.

Il semble donc que les anomalies lymphocytaires relevées soient liées principalement à la thymectomie et non pas au type de chirurgie. Les infections plus importantes chez les Fontan, quant à elles, pourraient s'expliquer par une évolution post-opératoire défavorable.

**Mots-clés:** lymphopénie, thymectomie, Fontan, chirurgie cardiaque, lymphocytes, émigrants thymiques

# Abstract

The thymectomy is a surgical procedure often done during cardiac surgery. It is well known that the resection of the thymus can cause alterations of lymphocyte subpopulations without major clinical consequences. This lymphopenia could be more pronounced in patients who undergone a cardiac surgery named "Fontan". Nevertheless, it is not known if these alterations are due to the thymectomy or this specific type of cardiac surgery.

We recruited 19 patients with Fontan surgery and compared them to 6 patients who had a cardiac surgery of another type. Our results show decreased CD4+ and CD8+ naive T cells populations and more specifically, low numbers of thymic emigrants (CD45RA+CD31+/CD4+). Expansion of memory repertoire (CD45RO+) is also noted. These findings are also found in the control group.

Thus, perturbations of T cells populations seem to be related to the thymectomy rather than the type of cardiac surgery. Infections were more severe in the Fontan group but they can be explained by an unfavourable post-operative evolution in this group of patients.

**Keywords:** lymphopenia, thymectomy, Fontan, cardiac surgery, lymphocytes, thymic emigrants

# Tables des matières

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	vi
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS.....	xii
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I: Recension des écrits.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Le thymus .....</b>	<b>4</b>
1.1.1. L'anatomie.....	5
1.1.2. L'embryologie .....	5
1.1.3. La circulation sanguine et lymphatique .....	6
1.1.4. L'histologie .....	7
1.1.4.1. La structure générale .....	7
1.1.4.2. Le stroma .....	8
1.1.5. L'évolution du thymus avec l'âge .....	11
<b>1.2. La thymopoïèse .....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Le récepteur lymphocytaire T (TCR) .....	13
1.2.1.1. La structure des TCR .....	13
1.2.1.2. Les chaînes du TCR.....	16
1.2.1.3. La recombinaison des gènes V-D-J .....	18
1.2.1.4. Les TREC .....	19
1.2.2. Le complexe membranaire CD3.....	20
1.2.3. Les corécepteurs CD4 et CD8 .....	21
1.2.4. Les stades de différenciation des thymocytes .....	21
1.2.4.1. Le stade "double négatif" .....	23
1.2.4.2. Le stade "double positif" .....	25
1.2.4.3. Le stade "simple positif" .....	26
1.2.5. Les lymphocytes T à leur sortie du thymus .....	27
1.2.5.1. Les sous-populations des lymphocytes T .....	27

1.2.5.2. L'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique .....	38
<b>1.3 La thymectomie .....</b>	<b>44</b>
1.3.1. Les conséquences de la thymectomie sur les lymphocytes .....	45
1.3.1.1. Les Lymphocytes T totaux (CD3), CD4 et CD8 .....	45
1.3.1.2. Les lymphocytes naïfs et mémoires .....	46
1.3.1.3. Les autres populations lymphocytaires T .....	47
1.3.1.4. Les lymphocytes B et NK.....	48
1.3.1.5. Les conséquences en fonction de l'âge de la thymectomie .....	48
1.3.1.6. La thymectomie et le taux de cytokines .....	49
1.3.2. Les répercussions cliniques.....	50
<b>1.4 La lymphopénie .....</b>	<b>51</b>
1.4.1. Quelques causes primaires .....	52
1.4.2. Les principales causes secondaires.....	52
<b>1.5. La chirurgie cardiaque de type Fontan .....</b>	<b>55</b>
1.5.1. Description.....	55
1.5.2. Les complications.....	58
1.5.2.1. L'entéropathie exsudative.....	59
1.5.2.2. La lymphopénie post-chirurgicale.....	60
1.6. Les objectifs spécifiques du projet de recherche.....	61
<b>Chapitre II: Méthodologie .....</b>	<b>62</b>
<b>2.1. Le recrutement des patients et du groupe "contrôle" .....</b>	<b>63</b>
<b>2.2. Le déroulement de l'étude .....</b>	<b>64</b>
<b>2.3. L'identification des populations lymphocytaires .....</b>	<b>65</b>
2.3.1. Les anticorps monoclonaux.....	65
2.3.2. Les sous-populations lymphocytaires.....	65
2.3.3. Le marquage par immunofluorescence directe des cellules .....	66
2.3.4. L'acquisition et l'analyse des cellules à l'aide du cytomètre .....	66
<b>2.4. Les autres paramètres biologiques .....</b>	<b>67</b>
<b>2.5. L'étude statistique.....</b>	<b>68</b>

<b>Chapitre III: L'analyse des résultats .....</b>	<b>69</b>
<b>3.1. Le recrutement des patients et l'analyse des dossiers .....</b>	<b>70</b>
3.1.1. Le groupe Fontan.....	70
3.1.1.1. Les caractéristiques cliniques.....	70
3.1.1.2. Les caractéristiques biologiques et immunologiques .....	74
3.1.2. Le groupe "contrôle" .....	<b>84</b>
3.1.2.1. Les caractéristiques cliniques.....	84
3.1.2.2. Les caractéristiques biologiques et immunologiques .....	86
<b>3.2. La comparaison entre le groupe Fontan et le groupe "contrôle" .....</b>	<b>91</b>
<b>Chapitre IV: Discussion .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Les patients avec chirurgie de Fontan .....</b>	<b>94</b>
4.1.1. Le profil clinique .....	94
4.1.2. Le profil immunologique.....	97
<b>4.2. Les patients "contrôle" .....</b>	<b>103</b>
4.2.1. Le profil clinique .....	103
4.2.2. Le profil immunologique.....	104
<b>Conclusion .....</b>	<b>105</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>107</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>116</b>

# Liste des tableaux

**Tableau I.** Données démographiques et cliniques des patients du groupe "Fontan" \_\_\_\_\_ 73

**Tableau II.** Données biologiques des patients du groupe "Fontan" \_\_\_\_\_ 79

**Tableau III.** Variables normales et anormales pour les groupes "Fontan" et "contrôle" \_\_\_\_\_ 80

**Tableau IV.** Données démographiques et cliniques des patients du groupe « contrôle" \_\_\_\_\_ 86

**Tableau V.** Données biologiques et immunologiques des patients du groupe "contrôle" \_\_\_\_\_ 89

**Tableau VI.** Âge au recrutement et à la thymectomie pour les patients appariés des groupes "Fontan" et "contrôle". \_\_\_\_\_ 91

**Tableau VII.** Corrélacion des différences notées au plan des populations lymphocytaires entre les patients "Fontan" et "contrôle" \_\_\_\_\_ 92

# Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Le thymus _____	8
<b>Figure 2.</b> Le récepteur pour l'antigène des lymphocytes T _____	15
<b>Figure 3.</b> Structure des chaînes du complexe CD3/TCR _____	17
<b>Figure 4.</b> Les TREC _____	20
<b>Figure 5.</b> Les étapes de la thymopoïèse _____	22
<b>Figure 6.</b> Les différentes cellules effectrices CD4+ _____	35
<b>Figure 7.</b> Procédure de Fontan _____	58
<b>Figure 8.</b> Patients "Fontan" et patients "contrôle" en fonction du nombre de variables anormales (sous-population T) _____	81
<b>Figure 9.</b> Valeur relative des émigrants thymiques chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement _____	82
<b>Figure 10.</b> Valeur relative des lymphocytes CD8+ naïfs CD62L+ chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement _____	83
<b>Figure 11.</b> Valeur relative des lymphocytes CD4+ mémoires chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement _____	83
<b>Figure 12.</b> Valeur relative des lymphocytes CD8+ mémoires chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement _____	84



# Liste des sigles et des abréviations

**ADN:** acide désoxyribo nucléique

**APC:** allophycocyanine

**BC:** Beckman-Coulter

**BD:** Becton Dickinson

**CCL:** CC-chemokine ligand

**CCR:** C-chemokine receptor

**CD:** cluster differentiation

**CDR:** complementary determining region

**CHU :** centre hospitalier universitaire

**cjTREC:** coding-joints TREC

**CMH:** complexe majeur d'histocompatibilité

**CMV :** cytomégalovirus

**CPA:** cellule présentatrice d'antigène

**CTL:** cytotoxic T cell

**DN:** double négatif

**DP:** double positif

**EBV** : Epstein-Barr virus

**EDTA**: éthylène-diamine-tetraacétique

**FITC**: fluoresceine Iso Thio Cyanate

**FOXP3**: forkhead Box P3

**HEV**: high endothelial venules

**HLA**: human leucocyte antigen

**IFN**: Interféron

**Ig**: immunoglobuline

**IGF**: insulin growth factor

**IL**: interleukine

**ISP**: immature simple positif

**IVC**: veine cave supérieure

**LA**: oreillette gauche

**MIN**: minimum

**MEC**: matrice extra-cellulaire

**MAX**: maximum

**NK**: natural killer

**PBS**: phosphate buffer saline

**PECAM:** platelet endothelial cell adhesion molecule

**PHA:** phytohémagglutinine A

**PE:** phycoeritrine

**RA:** oreillette droite

**RAG:** recombination activating gene

**RPA:** artère pulmonaire droite

**RSS:** recombination signal sequence

**RTE:** recent thymic emigrant

**SCID:** severe combined immunodeficiency

**SIDA:** syndrome de l'immunodéficience acquise

**SjTREC:** signal joint TREC

**SP:** simple positif

**SVC:** veine cave supérieure

**TEC:** thymic epithelial cells

**TCM:** effector memory T cell

**TCR:** T cell receptor

**TdT:** Transférase déoxynucléotidyl terminale

**TEM:** T effectrice mémoire

**Th:** T cell helper

**TNF:** tumor necrosis factor

**TREC:** T cell Receptor Excision Circle

**Tregs :** regulatory T cell

**VDJ:** variable, diversity, junction

**VIH:** virus de l'immunodéficience humaine

# Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui d'une façon ou d'une autre m'ont permis de mener à terme ce projet de recherche auquel j'attache une grande importance.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à ma directrice de recherche, Dr Françoise Le Deist, pour m'avoir confié ce projet d'étude et m'avoir permis de mieux comprendre la complexité d'une recherche. Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le respect qu'elle m'a toujours témoignés tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Dr Suzanne Vobecky et Dr Anne Fournier pour leur support logistique lors de l'élaboration de ce projet de même que lors du recrutement des patients. Je m'en voudrais de ne pas avoir une pensée pour l'équipe du laboratoire d'immunologie de l'hôpital Ste-Justine, en particulier pour Madame Rose-Marie Brito, pour ce tout ce que j'ai appris grâce à eux et pour leur contribution indéniable dans la réalisation de ce projet. Je remercie M. Adil Nafii pour son aide à l'analyse statistique des données.

Enfin, cette maîtrise n'aura jamais pu être menée à terme sans le support indéfectible de mes proches parents et de ma conjointe. Je leur dis vivement merci pour leur patience et leurs encouragements.

---

# INTRODUCTION

# Introduction

Depuis plus de 20 ans, il est question dans la littérature médicale de l'apparition d'une lymphopénie survenant chez certains patients après une chirurgie cardiaque. Cependant, cette perturbation est le plus souvent rencontrée après un type particulier de chirurgie cardiaque appelée opération de Fontan.

Jusqu'à présent, les caractéristiques phénotypiques détaillées des lymphopénies survenant après une chirurgie de type Fontan demeurent inconnues. La littérature médicale ne donne aucun renseignement sur la proportion des patients qui ont subi ce type de chirurgie et qui souffrent de lymphopénie. Finalement, il n'est pas rapporté si cette lymphopénie se traduit au niveau clinique par une évolution moins favorable ou par des infections à répétition.

Plus de 30 patients opérés selon la méthode Fontan sont actuellement suivis à l'hôpital Ste-Justine. Cette recherche se propose de caractériser la lymphopénie qui survient chez les patients soumis à une opération de type Fontan et d'évaluer si possible le retentissement clinique.

---

# RECENSION DES ÉCRITS



# CHAPITRE I: Recension des écrits

## 1.1. Le thymus

Le thymus est un organe lymphoïde primaire dévoué à la différenciation des thymocytes ou lymphocytes T. Il assure donc un rôle essentiel au cœur du système immunitaire. Il permet la production de lymphocytes T dont les récepteurs (*T cell receptor* ou TCR) seront capables de réagir à des antigènes étrangers tout en demeurant « indifférents » à la présence d'antigènes issus de l'hôte. Historiquement, ce sont les travaux chez la souris publiés par Miller dans les années 60 et chez l'homme par Markert à la fin des années 90 qui ont permis d'identifier clairement la fonction du thymus et sa participation au système immunitaire par la génération des cellules T<sup>1-4</sup>.

Après une description de l'anatomie et de l'histologie du thymus, cette recherche s'intéressera d'une part aux différentes étapes phénotypiques par lesquelles passent les cellules T avant leur exportation et d'autre part aux processus nécessaires à la production de cellules immunitaires fonctionnelles. Enfin, elle abordera l'impact de la thymectomie et ses répercussions sur le système immunitaire.

### 1.1.1. L'anatomie

Le thymus est situé dans une région anatomique appelé le médiastin antérieur, derrière le sternum, entre les deux poumons et juste devant l'aorte et la veine cave supérieure. Sa vascularisation provient des artères thoraciques internes et des artères thyroïdiennes inférieures. Le thymus est innervé par le système sympathique et par le nerf vague.

### 1.1.2. L'embryologie

Les différentes étapes de l'organogénèse du thymus sont mieux définies et caractérisées chez la souris que chez l'homme. Chez la souris, l'épithélium thymique apparaît au 11<sup>e</sup> jour de vie embryonnaire par la fusion de tissus d'origine endodermique et ectodermique<sup>5</sup>. Tout d'abord, des rudiments endodermiques se développent de chaque côté de la 3<sup>e</sup> poche pharyngée. Ces rudiments sont alors entourés par une capsule mésenchymateuse dérivée des cellules de la crête neurale. Ces dernières favorisent la prolifération des rudiments de même que leur segmentation en domaines thymique et parathyroïdien. Puis, les premiers progéniteurs lymphoïdes issus du foie entrent dans cette ébauche thymique. Enfin, les rudiments thymiques migrent vers la cavité médiastinale<sup>6</sup>.

Des invaginations du mésenchyme périphérique pénètrent alors le rudiment thymique et le divisent en deux zones distinctes, le cortex et la médulla. Cette transformation survient après la rentrée des premiers progéniteurs lymphoïdes dans le rudiment thymique. Les deux lobes fusionnent par la suite pour former un organe unique,

entouré de tissu conjonctif. Enfin, le thymus est alors colonisé par les premières cellules hématopoïétiques<sup>5-7</sup>.

Chez l'être humain, l'organogénèse du thymus débute à la fin de la 4<sup>ème</sup> semaine de vie du fœtus et se termine aux alentours de la 20<sup>ème</sup> semaine<sup>6</sup>.

### 1.1.3. La circulation sanguine et lymphatique

La circulation sanguine du thymus est assurée par les artères interlobulaires qui cheminent dans les septa conjonctifs et qui donnent naissance à des artérioles intralobulaires situées à la frontière cortico-médullaire. Celles-ci se ramifient en capillaires qui s'enfoncent dans le cortex et la médulla. On retrouve à ce niveau une barrière hémato-thymique qui aurait comme rôle de protéger les thymocytes corticaux de tout contact nuisible avec des macromolécules (ex : des anticorps) pouvant s'y introduire via une voie trans-capsulaire. Après leur passage dans le cortex, les capillaires reviennent vers la jonction cortico-médullaire où ils confluent en veinules post-capillaires. Les veinules post-capillaires permettent l'entrée des cellules progénitrices thymiques et la sortie des lymphocytes T matures dans la circulation sanguine. Les veinules post-capillaires se réunissent en veines intramédullaires qui quittent le thymus par les septa conjonctifs. De façon intéressante, le thymus n'est pas traversé par la circulation lymphatique afférente mais possède de nombreux vaisseaux lymphatiques efférents qui partent de la médulla thymique et qui se drainent dans les ganglions médiastinaux<sup>8</sup>.

## 1.1.4. L'histologie

### 1.1.4.1. La structure générale

Le thymus est un organe constitué de deux lobes enveloppés par une capsule fibreuse. Les travées du tissu conjonctif qui envahissent chaque lobe les divisent en une multitude de lobules, considérés à juste titre comme étant l'unité morphologique et fonctionnelle du thymus<sup>9</sup>. Chaque lobule comporte une région externe (le cortex) et une région interne (médulla), tel que schématisé sur la **Figure 1** (page 8). La composition cellulaire est très différente entre ces deux compartiments. En effet, le cortex contient de nombreux petits lymphocytes immatures au milieu de cellules épithéliales éparpillées alors qu'il existe dans la médulla des thymocytes matures moins nombreux au milieu de cellules épithéliales. Cette différence de répartition définit dans le thymus des compartiments distincts qui assurent des fonctions propres au cours de la différenciation des thymocytes<sup>6,7,10</sup>. Les lymphocytes T intrathymiques (ou thymocytes) résultent du développement de cellules qui proviennent de la moelle osseuse au sein du thymus.

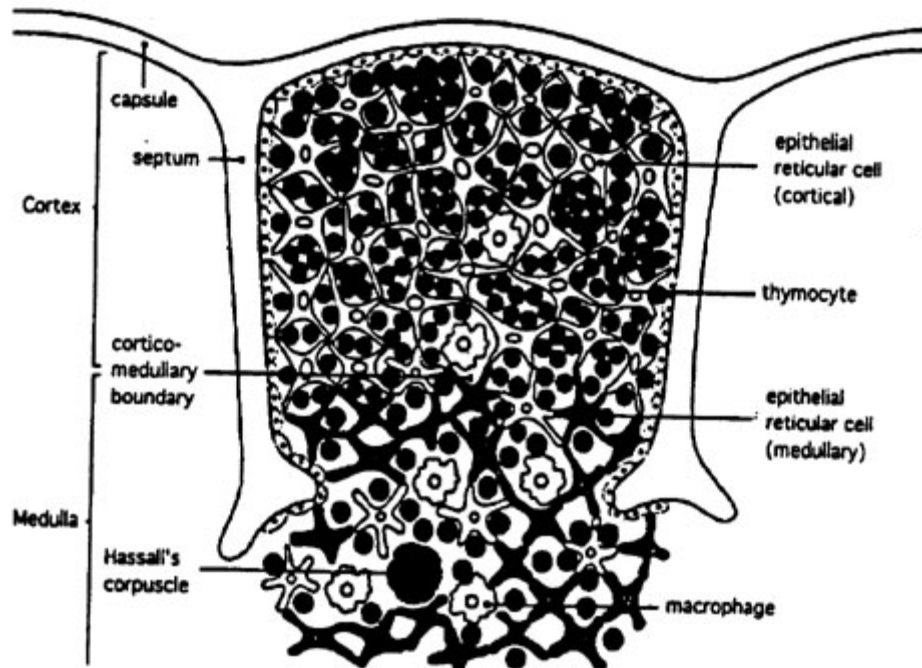


Figure 1. Le thymus. Le thymus est formé d'un ensemble de petits lobules délimités par une capsule. Chaque lobule est constitué de deux régions distinctes, le cortex (externe) et la médulla (interne). D'après Janeway Immunobiology 2007<sup>9</sup>.

#### 1.1.4.2. Le stroma

La base architecturale du thymus est le stroma thymique. Celui-ci est composé de tissu conjonctif, de cellules épithéliales thymiques et de cellules d'origine hématopoïétique (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B). Toutes ces cellules participent à la différenciation et à l'éducation des thymocytes. D'une part, le stroma thymique influence le développement des thymocytes en produisant des cytokines comme les interleukines 2 et 7 (IL-2 et IL-7) qui sont impliquées dans la prolifération et/ou la différenciation cellulaire<sup>11</sup>. D'autre part, il joue un rôle primordial dans la sélection du répertoire TCR grâce aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II présentes à la surface des différentes

cellules qui le composent. Le CMH porte aussi le nom d'antigènes des leucocytes humains (*human leucocyte antigen* ou HLA) chez l'humain.

### L'épithélium thymique

Trois types de cellules épithéliales peuvent être distinguées dans les lobules thymiques selon leur distribution, leur structure, leur fonction et leur phénotype. Les premières, appelées cellules épithéliales nourricières, sont situées dans le cortex. Elles soutiennent la prolifération des progéniteurs des cellules T, surtout par la production de cytokines (ex : IL-7). Les deuxièmes, les cellules épithéliales du cortex thymique (*thymic epithelial cells* ou TEC), sont responsables de la sélection positive des thymocytes en voie de différenciation, permettant ainsi la survie des cellules qui reconnaissent, par des TCR d'affinité intermédiaire, des peptides présentés par des molécules du CMH de classe I et II. Enfin, le 3e groupe, les TEC médullaires, exposent une grande variété de peptides spécifiques d'organes du "soi" initiant ainsi la sélection négative des lymphocytes autoréactifs.<sup>5,10</sup>

### Les macrophages

Les macrophages intrathymiques présentent les mêmes caractéristiques que les macrophages périphériques. Ils se retrouvent dans les différents compartiments thymiques. Les macrophages, situés au niveau du cortex, présentent dans leur cytoplasme de nombreux lysosomes et expriment les CMH de classe I et II. Les macrophages de la jonction cortico-médullaire n'ont pas de capacité phagocytaire

contrairement aux macrophages médullaires qui occupent un rôle majeur dans l'élimination des thymocytes apoptotiques.

#### Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (*dendritic cells* ou DC) sont concentrées au niveau de la jonction cortico-médullaire et au niveau de la médulla. Ces cellules présentatrices d'antigènes (ou CPA) jouent un rôle majeur dans le thymus. Elles se divisent en deux populations différentes (DC conventionnelles et DC plasmocytoïdes). Les DC conventionnelles jouent un rôle dans la sélection négative et dans l'induction de tolérance en permettant l'élimination des thymocytes auto-réactifs. Les DC plasmocytoïdes sont quant à elle impliquées dans la protection du thymus vis-à-vis des infections virales. Elles pourraient également induire la production de cellules T régulatrices<sup>12</sup>.

#### Le mésenchyme

Le mésenchyme constitue la capsule périthymique. Il est dérivé de cellules de la crête neurale. La matrice extracellulaire (MEC) désigne l'ensemble des macromolécules (polysaccharides, protéines fibreuses, élastiques, adhésives, etc.) présentes dans l'espace extracellulaire et sécrétées par les cellules mésenchymateuses. En plus d'une fonction dans le développement de l'épithélium, ces cellules mésenchymateuses pourraient aussi assurer la survie, la prolifération et la différenciation des précurseurs thymiques. En effet, elles présenteraient, par l'intermédiaire de la MEC, des facteurs de croissance solubles et des cytokines<sup>13-15</sup>.

### 1.1.5. L'évolution du thymus avec l'âge

Le thymus atteint son poids maximal un an après la naissance, soit environ 35 g. Dès l'âge de 1 an, les premiers signes d'involution apparaissent et s'accroissent vers l'âge de 4 ans. L'involution du thymus se caractérise par une diminution au niveau de son poids, de sa taille et de son activité fonctionnelle<sup>16</sup>. Ce processus est probablement la résultante des hauts taux d'hormones sexuelles présentes dans le corps après la puberté<sup>17</sup>. Il y a lieu de croire que la diminution des précurseurs dans la moelle osseuse et des changements dans l'environnement thymique participeraient à ce phénomène. Il est à noter qu'avec l'involution thymique chez le sujet âgé, la proportion du tissu graisseux devient plus importante dans le thymus mais celui-ci continue d'être le siège du développement de thymocytes<sup>16,18</sup>.

Par ailleurs, les travaux de Bertho et Demarquay ont démontré que malgré une baisse de la cellularité thymique, il n'y avait pas de différences dans les pourcentages des différentes sous-populations de cellules T dans les thymus adultes<sup>19</sup>. Contrairement à la souris, le thymus adulte humain est capable d'assurer une différenciation des thymocytes qualitativement comparable à celle observée dans le thymus de sujets jeunes bien qu'elle soit quantitativement réduite. D'autres part, chez les patients adultes ayant subi une greffe de la moelle osseuse, une augmentation de la cellularité et du volume du thymus apparaissent quelques mois après la greffe<sup>20</sup>. Ces découvertes montrent que le thymus est capable d'assurer son rôle clé dans le développement de lymphocytes T même si son aptitude à les produire s'amenuise dès la première année de vie.



Après cette caractérisation détaillée de l'environnement dans lequel évoluent les thymocytes, cette étude se penchera sur les différents phénomènes que ces cellules subissent afin de devenir, depuis des cellules progénitrices, des lymphocytes T matures capables d'assurer leur fonction en périphérie.

## **1.2 La thymopoïèse**

À l'instar des lymphocytes B, les cellules T n'effectuent qu'une partie restreinte de leur développement dans la moelle osseuse. Les lymphocytes T se différencient dans le thymus. Clé de voûte de la réponse immunitaire adaptative, ces cellules se divisent en différentes populations qui présentent des propriétés spécifiques.

La thymopoïèse est un processus complexe qui correspond à l'ensemble des événements conduisant à la différenciation des thymocytes. Cette différenciation au sein du thymus est marquée par une succession de stades caractéristiques. Les thymocytes immatures CD4<sup>-</sup> et CD8<sup>-</sup>, appelés double négatifs (DN) se différencient en thymocytes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double positifs ou DP) puis en thymocytes matures CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> (simple positif ou SP) tout en passant préalablement par un stade de cellules immatures simple positif (ISP). À la fin de cette différenciation, les cellules T matures CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> sont prêtes à quitter le thymus et rejoindre les organes lymphoïdes périphériques. Mais avant de discuter des stades de différenciation du

lymphocyte T, il est important de décrire les différents récepteurs membranaires de celui-ci soit le TCR, le complexe CD3 et les corécepteurs CD4 et CD8.

### 1.2.1. Le récepteur lymphocytaire T (TCR)

Le récepteur de surface à l'antigène des lymphocytes T (*T cell receptor* ou TCR) constitue la structure de reconnaissance des peptides antigéniques par les lymphocytes T. Les peptides antigéniques sont présentés à la surface d'une cellule présentatrice d'antigène (ou CPA). Ces peptides sont exprimés à la surface cellulaire au sein des molécules du CMH. Lorsqu'un TCR donné reconnaît spécifiquement le complexe peptide/CMH, il s'ensuit une cascade de signalisations dans la cellule T qui induit une réaction spécifique contre le peptide reconnu. Les premiers stades de différenciation du thymocyte incluent le réarrangement des gènes du TCR.

#### 1.2.1.1. La structure des TCR

Le TCR est un hétérodimère constitué de deux chaînes polypeptidiques. Ces chaînes, désignées  $\alpha$  et  $\beta$ , sont liées l'une à l'autre de façon covalente par des ponts disulfures<sup>9</sup>. Dans 95% des cas, les lymphocytes T expriment un TCR  $\alpha\beta$ . Les autres exprimeront un autre type de TCR, composé des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ .

En position germinale, les gènes codant pour les chaînes du TCR sont morcelés et doivent être réarrangés par un processus de recombinaison somatique, appelée recombinaison V(D)J, pour pouvoir être exprimés.

Ces deux chaînes ( $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ ) possèdent un domaine variable assurant ainsi la reconnaissance du peptide antigénique. Ces chaînes sont associées au complexe

invariant de transduction du signal CD3. Le TCR est exprimé de façon clonale à la surface des lymphocytes T. Avant d'exprimer ce complexe, les thymocytes en cours de différenciation expriment le complexe CD3 seul puis conjointement avec le pré-TCR.

Le pré-TCR se distingue du TCR par sa composition. Il est formé d'une chaîne invariante de substitution ( $pT\alpha$ ) et d'une chaîne  $\beta$ . Le complexe CD3, quant à lui, assure la transduction intracellulaire du signal d'interaction TCR/CMH+peptide.

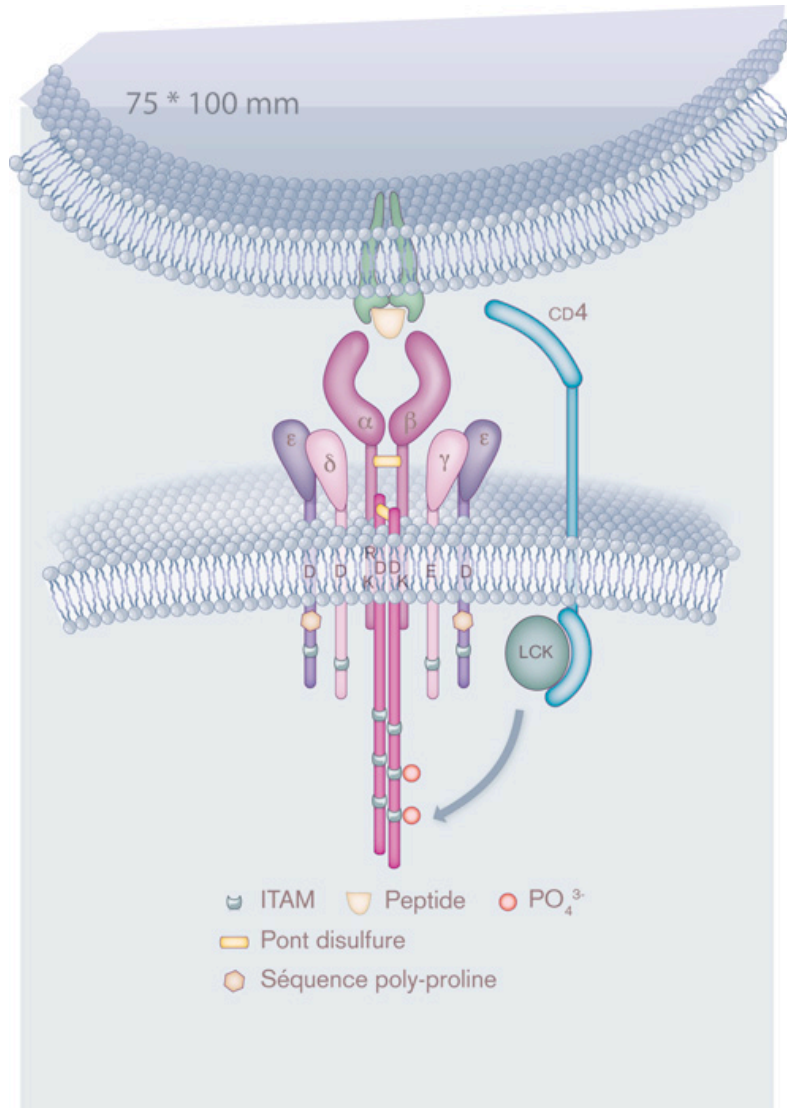


Figure 2 Le récepteur pour l'antigène des lymphocytes T (T-cell receptor, TCR). Tiré de Mingueneau M., et al. Nat Immunol 2008, 9: 522-32<sup>21</sup>

### **1.2.1.2. Les chaînes du TCR**

L'hétérodimère  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  est composé de 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne  $\alpha$  du TCR est une glycoprotéine acide de 40 à 60 kDa tandis que la chaîne  $\beta$  est une glycoprotéine basique de 40 à 50 kDa. Chacune des 2 chaînes est formée de 2 domaines en forme de boucle maintenus par un pont disulfure possédant ainsi une structure de type domaine d'immunoglobuline (Ig).

La partie extracellulaire de ces protéines comporte 2 domaines structuraux appelés domaine variable (V) et domaine constant (C). Le domaine variable est responsable de la reconnaissance du complexe formé par le peptide antigénique et le CMH. Les domaines variables sont codés par de multiples segments de gènes qui forment le transcrit codant à la suite de recombinaisons dits V(D)J (voir section suivante).

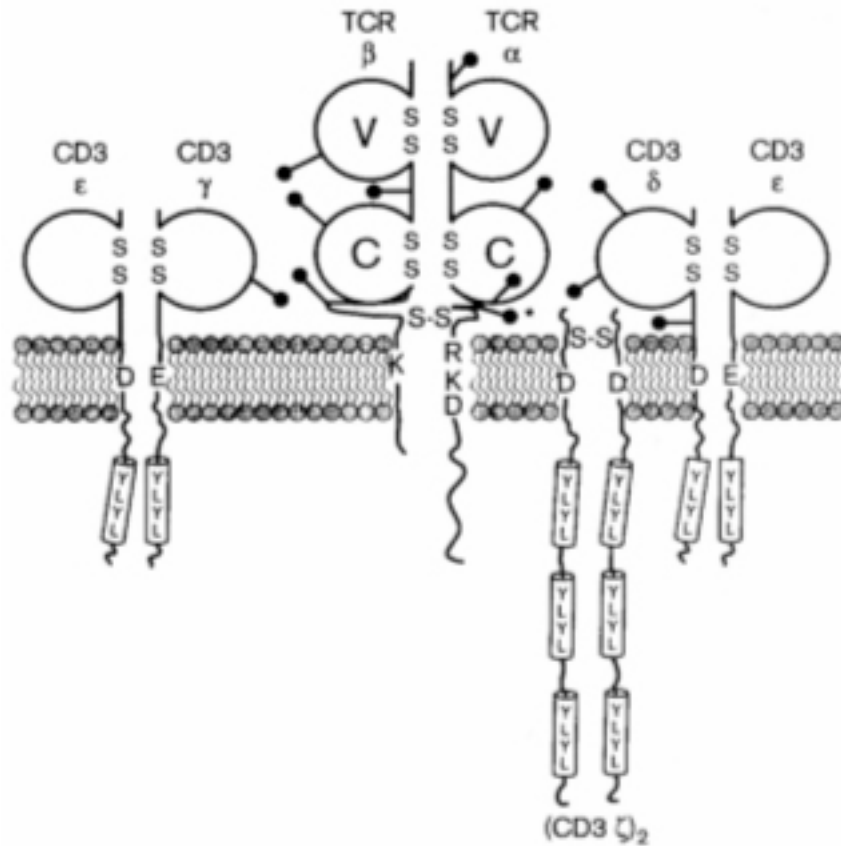


Figure 3 : La structure des chaînes du complexe CD3/TCR. Le récepteur Tαβ, lui est composé de deux chaînes α et β. Ces chaînes sont reliées par des ponts disulfures et présentent des ponts disulfures intra-chaînes. Chaque chaîne se compose de deux domaines principaux : le domaine variable (V) et le domaine constant (C). Tiré de Malissen B. *Curr Opin Immunol* 1996<sup>22</sup>

Le domaine variable de chaque chaîne du TCR se divise en 3 régions hypervariables CDR (*Complementary Determining Region*). Les régions CDR1 et CDR2 sont codées de façon germinale par les gènes V. La région CDR3 est codée par la juxtaposition des gènes V et J pour les chaînes α et γ et par la juxtaposition des gènes VD et VJ pour les chaînes β et δ. La région CDR1 interagit directement avec le peptide et le CMH. La région CDR2 interagit avec le CMH tandis que la région CDR3 reconnaît directement le peptide. La reconnaissance du complexe CMH/peptide est assistée

par les corécepteurs invariants CD4 pour les molécules du CMH de classe II et CD8, pour les molécules du CMH de classe I.

### **1.2.1.3. La recombinaison des gènes V-D-J**

La grande variété des TCR résulte de la diversité des segments qu'il est possible de réarranger mais surtout de la nature imprécise des jonctions de ces gènes et de l'ajout de nucléotides au niveau de ces jonctions. Ceci est rendu possible grâce à la recombinaison V(D)J.

La recombinaison V(D)J est un mécanisme commun aux lymphocytes T et B permettant l'assemblage des récepteurs des lymphocytes T (TCR) et des immunoglobulines à partir des gènes V (variable), D (diversité), J (jonction) préexistants et répartis sur une grande portion germinale au sein des différents loci. La recombinaison V(D)J est basée sur la reconnaissance spécifique de séquences signal de recombinaison (*recombination signal sequence* ou RSS) entre les gènes V(D)J et l'excision de la partie génique intercalée entre les deux gènes réarrangés.

Chaque gène V, D, et J est bordé par une séquence signal de recombinaison (RSS) qui est reconnue par des protéines spécifiques de la recombinaison, RAG1 et RAG2. Les RSS sont constitués de motifs heptamères et nonamères. Les protéines RAG assemblent des RSS non similaires pour former un complexe synaptique et générer une coupure d'ADN double brin entre les gènes V, D et J et l'heptamère. Cette coupure permet de générer une extrémité "codante" et une extrémité "signal"<sup>9</sup>.

Un réarrangement est terminé après la ligation des deux extrémités codantes V et J. Cette étape est précédée par l'action de l'enzyme transférase déoxynucléotidyl

terminale (ou TdT) et d'une nucléase au niveau de la jonction V-J et quand il y a VDJ. Une fois réarrangé, le gène est transcrit puis épissé en ARN messager et traduit en protéine membranaire.

On estime que  $10^{15}$  différents TCR peuvent ainsi être générés. Cependant, selon les données dont dispose la science aujourd'hui, il est raisonnable de croire que ce chiffre représente une surestimation du répertoire potentiel TCR $\alpha\beta$  puisque tous les réarrangements V(D)J ne sont pas fonctionnels<sup>23</sup>.

#### **1.2.1.4. Les TREC**

Les TREC (*T-cell receptor excision circles*) sont formés et organisés en cercle sous forme d'ADN épisomal excisé lors du réarrangement des gènes VDJ des chaînes du TCR (voir la **Figure 4**, page 20). Ces cercles sont maintenus stables pendant la division cellulaire et ne sont pas dupliqués. Leur présence s'amenuise donc lors des divisions cellulaires en périphérie.

Deux types de TREC sont produits suite à la délétion du locus  $\delta$  du locus  $\alpha$ . Il s'agit des signal-joints TREC (sjTREC) et des coding-joints TREC (cjTREC). Il ne peut y avoir au maximum que deux sjTREC et deux cjTREC dans une cellule si le réarrangement a eu lieu sur les deux allèles.

Les TREC ne sont produits que dans le thymus. La quantification des lymphocytes contenant des TREC en périphérie permet l'analyse de l'activité thymique chez l'homme<sup>24</sup>. Les TREC ont été utilisés pour confirmer l'involution thymique au cours du vieillissement. Ainsi, chez les sujets âgés qui présentent une fonction thymique moins



efficace, le nombre de TREC est réduit<sup>25</sup>.

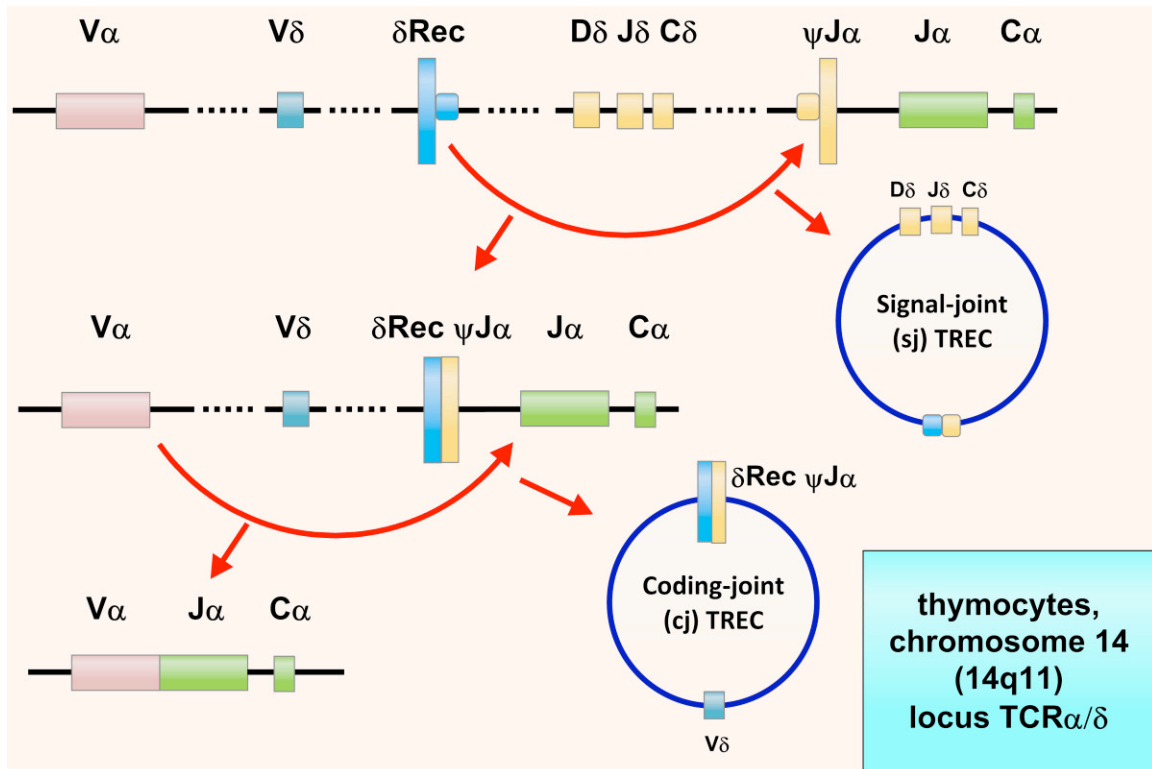


Figure 4 Les TREC (*T-cell receptor excision circles*). Tiré de : Cossu. Italian Journal of Pediatrics 2010 36:76<sup>26</sup>

### 1.2.2. Le complexe membranaire CD3

Le CD3 est un complexe membranaire présent sur tous les lymphocytes T. Il fait partie intégrante du complexe CD3/TCR. Il est composé de 4 chaînes polypeptidiques invariantes (CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ ) qui s'associent pour former 3 dimères : un hétérodimère  $\gamma\epsilon$ , un hétérodimère  $\delta\epsilon$  et un homodimère  $\zeta\zeta$ . Pour être

fonctionnels et exprimés en surface du lymphocyte T, les TCR doivent être associés au complexe CD3. Réciproquement, l'absence de chaîne TCR provoque un blocage du trafic intracellulaire du complexe CD3. Le complexe CD3 assure la transduction du signal TCR.

### 1.2.3. Les corécepteurs CD4 et CD8

Les corécepteurs CD4 et CD8 se lient avec les molécules CMH II et I respectivement. Ils jouent principalement un rôle dans la signalisation intracellulaire. Le CD4 est composé de 4 domaines de type immunoglobuline (Ig) regroupés dans une chaîne. Le CD8 est pour sa part composé de 2 chaînes associées en homodimère  $\alpha\alpha$  ou en un hétérodimère  $\alpha\beta$ . Chaque chaîne contient un domaine de type Ig.

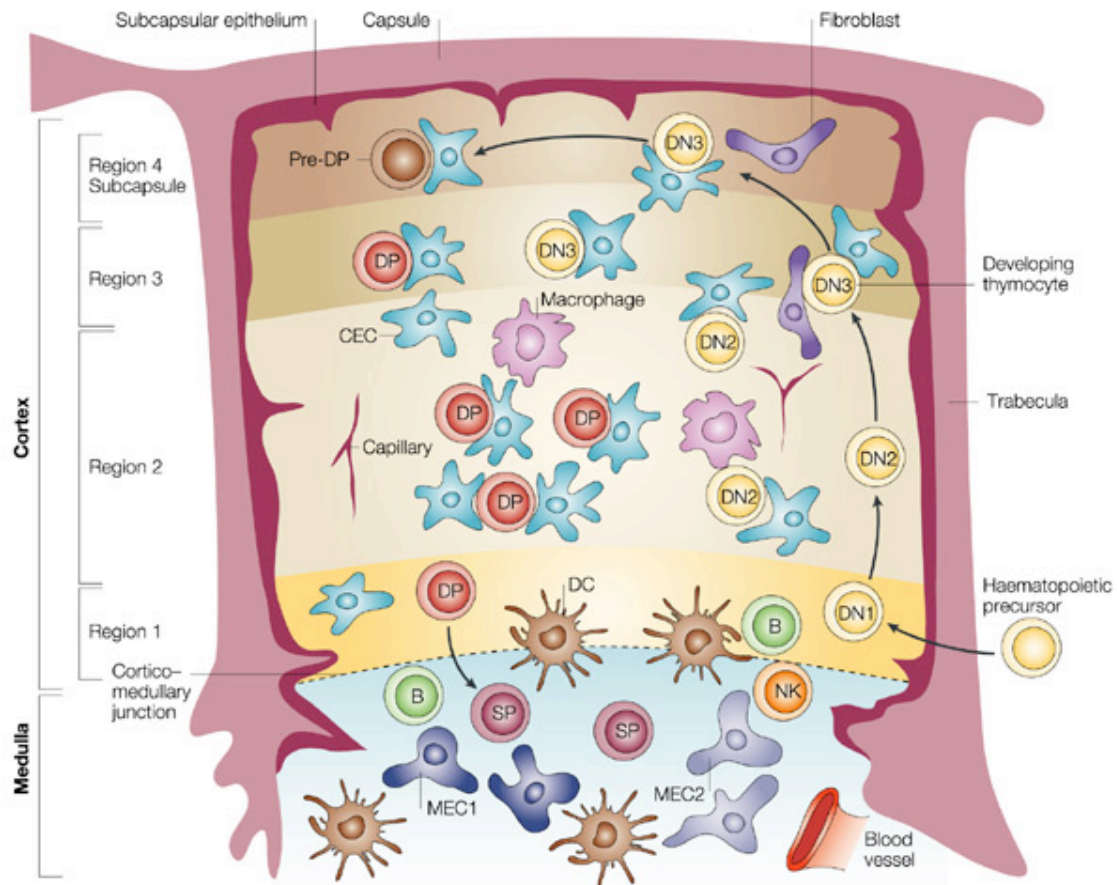
### 1.2.4. Les stades de différenciation des thymocytes

La moelle osseuse (ou le foie durant la vie foetale) approvisionne le thymus en précurseurs lymphoïdes destinés à devenir des lymphocytes T. Ces précurseurs sont recrutés à partir du sang et pénètrent dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire.

Les précurseurs lymphoïdes dérivent de cellules souches hématopoïétiques présentes dans le foie foetal et dans la moelle osseuse. Une cellule souche est définie par sa capacité d'auto-renouvellement et sa pluripotence dans la génération de différentes cellules matures. Elle donne naissance à des précurseurs multipotents qui ont perdu l'aptitude d'auto-renouvellement.

La différenciation de ces cellules en véritables lymphocytes T matures est un processus complexe caractérisé par l'expression séquentielle de nombreuses

molécules de surface (*cluster differentiation* ou CD). Les sous-populations lymphocytaires qui proviennent du thymus sont définies en fonction de l'expression de ces molécules.



Nature Reviews | Immunology

Figure 5. Les étapes de la thymopoïèse. Les précurseurs lymphoïdes accèdent au thymus par les vaisseaux de la jonction cortico-médullaire. Les thymocytes double-négatifs (DN) passent alors par des étapes de différenciation et de prolifération. Les thymocytes matures quittent le thymus par la circulation sanguine. Tiré de : Blackburn and Manley 2004<sup>27</sup>.

#### **1.2.4.1. Le stade "double négatif"**

Le stade "double négatif" (DN) marque la première étape d'un long processus menant à la différenciation complète du thymocyte. Les populations de thymocytes DN sont donc les plus immatures. Elles représentent environ 3 à 5% des cellules d'un thymus normal. Ces cellules sont dites "doubles négatives" car elles ne portent ni le CD4, ni le CD8 à leur surface. Elles sont parfois appelées "triples négatives" (TN) en référence à l'absence d'expression du complexe CD3<sup>9</sup>.

Ces thymocytes expriment les marqueurs de surface CD44 et CD25 chez la souris, et le CD34 et CD1a chez l'homme. L'expression de ces marqueurs permet en outre de différencier quatre sous-populations de thymocytes DN en cours de développement : DN1 (CD44+CD25-), DN2 (CD44+CD25+) DN3 (CD44-CD25+) DN4 (CD44-CD25-). Chez la souris, les cellules des stades DN1 et DN2 sont appelées cellules pré-T tandis que les cellules DN3 et DN4 sont appelées cellules pro-T.

Les thymocytes DN1 sont caractérisés par leur stade de différenciation peu avancé leur permettant ainsi de se différencier aussi bien en cellules T qu'en cellules myéloïdes, lymphocytes B et lymphocytes NK, suivant les signaux extérieurs qu'elles reçoivent. Elles sont de petite taille. Le passage de DN1 à DN2 s'accompagne d'une prolifération cellulaire soutenue.

Les thymocytes DN2 ne peuvent plus se différencier en lymphocytes NK, en cellules dendritiques ou en macrophages. Ils sont engagés dans la lignée T. Ils produiront des lymphocytes exprimant un récepteur TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ . Cette étape de développement est caractérisée par l'apparition de la molécule de surface CD25. Ces cellules

commencent le réarrangement des gènes codant pour les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ . Le réarrangement de la chaîne  $\beta$  est aussi initié<sup>28</sup>.

Les thymocytes DN3 se caractérisent par le phénotype CD44-CD25+. Le réarrangement de la chaîne  $\beta$  se poursuit. Il est à noter aussi qu'il se produit, mais en moins grande proportion, le réarrangement des chaînes  $\gamma$  et  $\delta$ <sup>29</sup>. Les thymocytes ayant choisi un TCR  $\alpha\beta$  exprimeront à ce stade un pré-TCR formé par l'association de la chaîne  $\beta$  réarrangée à la chaîne  $\alpha$  invariante de substitution (pT $\alpha$ ) et au complexe CD3. La chaîne pT $\alpha$  est codée par un gène invariant et s'associe à la chaîne  $\beta$ . Cette chaîne pT $\alpha$  sera éventuellement remplacée par une vraie chaîne  $\alpha$  réarrangée, au stade suivant. Les thymocytes DN3 dont le réarrangement de la chaîne  $\beta$  du TCR produit un pré-TCR fonctionnel reçoivent un signal de survie et de prolifération. L'expression de ce complexe CD3/pré-TCR s'accompagne d'un signal intracellulaire provoquant l'arrêt des réarrangements du locus de la chaîne  $\beta$  du TCR. Ce signal intracellulaire induit la régulation négative de l'expression des enzymes de recombinaisons géniques (*recombination activation gene* ou RAG), ce qui prévient le réarrangement des gènes. Il y a survie cellulaire. Les thymocytes exprimant une chaîne  $\beta$  non fonctionnelle seront éliminés par apoptose et ne pourront donc accéder au stade suivant. Ce processus est appelé la sélection  $\beta$ .

Le stade DN4 représente le dernier stade double négatif pour les thymocytes. La perte d'expression du CD25 caractérise ce stade de différenciation. Le pré-TCR est exprimé à la surface des cellules. Ces thymocytes débutent le réarrangement de la chaîne  $\alpha$ . La prolifération cellulaire est cessée. Ces thymocytes entrent donc dans

une phase de repos. L'expression des corécepteurs CD4 et CD8 les mèneront au stade suivant.

#### **1.2.4.2. Le stade "double positif"**

Les thymocytes « doubles positifs » ou DP représentent 75 à 80% des thymocytes totaux. Ils sont localisés au niveau du cortex. Ils sont nommés ainsi car ils expriment simultanément à leur surface le CD4 et le CD8. Les cellules DP continuent de réarranger la chaîne  $\alpha$  de leur TCR et commencent à exprimer le TCR $\alpha\beta$  à leur surface. C'est à ce stade que se déroule la sélection thymique positive et négative.

Le TCR exprimé par les thymocytes immatures est capable d'interagir avec les molécules du CMH exprimées à la surface des TEC. Le CMH présente un antigène du soi à la surface des cellules. C'est le complexe "CMH-peptide" qui est reconnu par les lymphocytes T. La survie du thymocyte dépendra de son interaction avec le complexe "CMH-peptide" présent à la surface des CPA. Trois scénarios sont alors possibles:

1. Le TCR se lie trop faiblement au CMH. Ceci expose son incapacité à reconnaître le « soi » et, faute d'un signal de survie, la cellule enclenche un programme de mort, dit mort par négligence.
2. Si cette interaction est d'affinité modérée, la cellule sera sélectionnée positivement.
3. Certaines des cellules peuvent avoir un TCR de haute affinité pour les peptides du soi. Ces cellules auto-réactives seront éliminées par sélection négative.

Ainsi, 95% des thymocytes seront voués à l'apoptose au cours de ces processus de sélection. La sélection négative s'effectue au niveau de la médulla thymique.

Les thymocytes DP sélectionnés migrent alors du cortex vers la médulla. Ce processus est régulé par l'expression du récepteur de chemokine CCR7 présent à leur surface<sup>9</sup>. Ces thymocytes, par le biais du CCR7, sont attirés par les ligands de ce récepteur, tels le CCL19 et le CCL21, sécrétés en partie par les cellules épithéliales thymiques de la médulla. Les thymocytes DP ayant survécu vont par la suite réprimer l'expression de l'un des corécepteurs CD4 ou CD8. Elles exprimeront en plus forte quantité le TCR à leur surface de même que le CD5. Leur passage à cette étape est aussi marqué par l'expression du CD69. Ces cellules s'engageront soit dans la lignée CD4+CD8- (lymphocytes T auxiliaires), soit dans la lignée CD4-CD8+ (lymphocytes T cytotoxiques). Ces cellules sont dites « simple positif » (SP).

#### **1.2.4.3. Le stade "simple positif"**

Après l'engagement dans la voie CD4+ ou CD8+, seul le corécepteur correspondant sera exprimé. Les thymocytes SP se retrouvent dans la médulla thymique. L'expression unique du CD4 ou du CD8 est rendue possiblement par la perte de la co-expression de l'une ou l'autre de ces molécules. Ce phénomène dépend de la nature de l'interaction avec les complexes "CMH-peptide". Les thymocytes dont le TCR reconnaît seulement les peptides associés à des CMH de classe II perdront l'expression du CD8 et n'exposeront que le CD4. À l'inverse, les thymocytes dont le TCR reconnaît des peptides associés à des CMH de classe I adopteront un phénotype unique CD8.

Les lymphocytes qui survivront auront donc passé le cap de la tolérance centrale, i.e. ayant lieu dans le thymus. Ces lymphocytes sont naïfs puisqu'ils n'ont pas encore été en contact avec des antigènes. Le répertoire lymphocytaire T est ainsi établi. Ces lymphocytes sont donc capables de réagir à une multitude d'antigènes étrangers tout en demeurant dans un état quiescent en présence d'antigènes issus de l'hôte. Cette sortie du thymus est possible entre autre grâce à l'expression de la sphingosine phosphatase S1P1<sup>9</sup>. Contrairement à l'adulte, la mise en place du système immunitaire néonatal à la périphérie n'est pas stabilisée et nécessite un apport important en cellules T matures pour constituer le répertoire pré-immun global. Maintenant, il sera question des différentes populations lymphocytaires T à leur sortie du thymus, à leurs phénotypes distincts et aussi à leurs fonctions spécifiques.

## 1.2.5. Les lymphocytes T à leur sortie du thymus

### 1.2.5.1 Les sous-populations des lymphocytes T

En se basant sur l'expression de différents marqueurs de surface, il est possible de distinguer les différentes sous-populations de lymphocytes T, chacune ayant un stade de différenciation et des fonctions spécifiques et de fait une capacité de migration pour des sites anatomiques distincts.

Les sous-divisions des différentes populations lymphocytaires T peuvent aussi se faire selon leur fonction qui dépend de leur rencontre avec l'antigène. Il faut différencier les lymphocytes naïfs, effecteurs et mémoires. Les lymphocytes T naïfs sont les lymphocytes T n'ayant pas encore rencontré leur antigène. Par opposition,



les lymphocytes effecteurs et mémoires ont rencontré leur antigène. Les lymphocytes effecteurs sont engagés dans la réponse immune, les lymphocytes T mémoires sont responsables de la réponse immunitaire secondaire. En effet, ils se réactiveront suivant la réexposition à leur antigène spécifique. Les caractéristiques de ces populations seront décrites dans les prochains paragraphes.

### Les Lymphocytes T naïfs

Les lymphocytes T naïfs sont directement exportés du thymus. Ces cellules, par définition, n'ont pas encore rencontrés leur antigène. Donc, ces cellules représentent le répertoire naïf dans la circulation périphérique qui devrait permettre une réponse immunitaire suite à la rencontre d'antigènes. Il est important que ces lymphocytes circulent constamment et migrent. Ces cellules expriment à leur surface des récepteurs (CD62L et CCR7) qui facilitent leur migration d'un organe lymphoïde à un autre afin de rencontrer l'antigène qui provoquera une activation cellulaire<sup>30</sup>. Le CD62L (aussi appelé sélectine L) est une lectine dépendante du calcium intervenant dans l'adhérence des leucocytes à l'endothélium des veinules post-capillaires. Le CCR7 quant à lui est un récepteur aux chemokines impliquées dans le contrôle du trafic vers les tissus lymphoïdes. Ces deux récepteurs sont nécessaires à l'extravasation des lymphocytes au travers des veinules à endothélium épais (*high endothelial veinules* ou HEV) et à leur migration vers les ganglions<sup>31,32</sup>. D'autres molécules de surface ont été proposées pour caractériser cette population lymphocytaire naïve CD4+ ou CD8+, la plus importante étant le CD45RA.

La molécule CD45 appartient à la famille des protéines à activité tyrosine phosphatase. C'est une glycoprotéine membranaire exprimée par toutes les cellules hématopoïétiques nucléées. L'utilisation de cellules déficientes en CD45 et l'étude de souris invalidées pour le gène codant pour CD45 ont montré que cette molécule est un régulateur important de la différenciation et de l'activation lymphocytaire<sup>33</sup>. Chez l'homme et la souris, la perte d'expression de CD45 est associée à une immunodéficience sévère combinée. Les souris déficientes en CD45 ont un profond défaut de différenciation thymique dû à une augmentation du niveau basal de l'apoptose, et à un dysfonctionnement de la signalisation du pré-TCR et du TCR conduisant à une accumulation des thymocytes au stade DN et DP<sup>33</sup>. Ceci provoque une lymphopénie périphérique avec diminution de 80 % du nombre normal de lymphocytes T périphériques. Chez l'homme, il existe différentes isoformes du CD45, CD45RA et CD45RO résultant d'épissages différents d'un même pré-ARN. La molécule CD45 est une protéine tyrosine phosphatase transmembranaire et s'exprime en plusieurs isoformes, encodés par différents exons (A, B et C)<sup>34</sup>. La fonction exacte de CD45RA et CD45RO n'est pas encore connue<sup>35</sup>. L'expression de ces deux isoformes permet cependant de distinguer les lymphocytes T naïfs (CD4+ et CD8+) qui expriment le CD45RA des lymphocytes mémoires qui expriment le CD45RO.

#### *Les émigrants thymiques*

Les émigrants thymiques (*recent thymic emigrant* ou RTE) sont des lymphocytes T naïfs nouvellement arrivés dans la circulation périphérique. Ils sont caractérisés par le marquage CD3+ (propre à tous les lymphocytes T) et CD45RA+ (cellule naïve). Les

RTE peuvent être CD4+ ou CD8+. Les RTE sont riches en TREC. Du fait de leur ressemblance avec les cellules naïves, peu de marqueurs spécifiques au RTE ont été identifiés à ce jour. Cependant, un marqueur spécifique aux RTE CD4+ a été décrit: le CD31<sup>36</sup>.

Le CD31, aussi appelée PECAM-1 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) est une molécule de surface, membre de la superfamille des immunoglobulines. Il est exprimé majoritairement par les lymphocytes T directement issus du thymus mais on le retrouve sur les mastocytes, les cellules NK, les monocytes, sur certaines cellules endothéliales, sur les neutrophiles et sur les plaquettes. Dépendamment du type cellulaire sur lequel il est présent, le CD31 aura des fonctions différentes (régulation de l'adhésion entre les cellules, migration cellulaire et activation lymphocytaire T)<sup>37,38</sup>.

Il a récemment été démontré que les RTE qui sont donc des lymphocytes T CD31+CD45RA+/CD4+ contenaient la majorité des TREC, attestant de la validité de ce marquage pour identifier les lymphocytes T naïfs récemment exportés du thymus<sup>39</sup>. En comparaison aux RTE, les lymphocytes T périphériques expriment une faible fréquence de TREC et ceux-ci diminuent avec l'âge<sup>40</sup>.

La fonction des lymphocytes T naïfs dépend de leur activation qui, en retour, dépend de leur rencontre avec un antigène spécifique présenté à la surface d'une CPA via les CMH de classe I et II. L'activation du lymphocyte T naïf dépendra aussi des signaux de costimulation et des cytokines. L'activation de la cellule resultera en une prolifération et une différenciation des cellules T suivant le chemin cytotoxique ou auxiliaire (pour les lymphocytes T CD8+ et CD4+ respectivement).

### Les lymphocytes T effecteurs

L'activation d'un lymphocyte T naïf amène un changement au niveau des fonctions et du phénotype cellulaire du lymphocyte. La définition de cellule effectrice n'est pas aisée puisque son phénotype coïncide bien souvent avec celui des cellules mémoires. Les lymphocytes effecteurs sont en général de larges cellules blastiques exprimant des marqueurs d'activation tels que le CD25 et le CD69<sup>30</sup>. Contrairement aux lymphocytes naïfs, les lymphocytes effecteurs ont la capacité de circuler en dehors des organes lymphoïdes<sup>41</sup>. Les lymphocytes effecteurs, comme mentionnés précédemment, sont soit cytotoxiques (*Cytotoxic T cell* ou CTL), soit auxiliaires (*T cell helper* ou Th). Ce dernier groupe peut être par la suite subdivisé en différentes sous-populations (Th1, Th2, Th17 et Treg).

#### *Lymphocytes CD8+ cytotoxiques (CTL)*

La fonction principale des lymphocytes T CD8+ est cytotoxique, en provoquant la mort par apoptose de leurs cibles spécifiques. Ces lymphocytes possèdent un mécanisme pour tuer leur cible : le système perforine/granzyme. Lorsqu'un CTL est en contact direct avec la cellule cible qu'il a reconnue, il mobilise les granules cytotoxiques qui contiennent en particulier de la perforine et du granzyme B. Les molécules de perforine forment des pores qui permettent l'entrée des molécules de granzyme B dans le cytoplasme de la cellule cible.<sup>9</sup> Ces molécules induisent l'apoptose de la cellule cible par la voie des caspases. Les cellules T CD8+ participent aux réponses contre les virus, les bactéries à développement intracellulaire et les cellules tumorales<sup>9</sup>.

### *Les lymphocytes CD4+ auxiliaires*

Après leur activation par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent se différencier en quelques sous-populations effectrices Th1 (T helper 1), Th2, Th17 et T régulateurs. Ces différentes populations se caractérisent par leur profil de sécrétion de cytokines qui leur permet d'orchestrer la réponse immunitaire face à différents pathogènes (voir la **Figure 5**, page 35).

- Lymphocytes CD4+ Th1

Il est classiquement admis que les lymphocytes Th1 favorisent plus particulièrement l'éradication des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries et parasites intracellulaires). Ils semblent aussi impliqués dans les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn. La cytokine la plus représentative des Th1 est sans nul doute l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) quoiqu'ils ont aussi la possibilité de produire de l'interleukine-2 (IL-2) et du facteur de nécrose tissulaire (*tumor necrosis factor* ou TNF). Il a été tenté d'identifier un phénotype (autre que par la sécrétion de cytokines) à l'aide des molécules de surface. Plusieurs études, telles que décrites dans la revue de Glimcher et Murphy en 2000, ont démontrées que les Th1 exprimaient de façon préférentielle à leur surface la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IFN- $\gamma$ , la chaîne  $\beta$  du récepteur de l'IL-12, le récepteur de l'IL-18 et les récepteurs à chemokines CXCR3 et CCR5<sup>42</sup>.

La différenciation du lymphocyte CD4+ naïf vers le type Th1 dépend surtout des cytokines qui conduisent la différenciation vers une direction donnée et suppriment en même temps la différenciation vers un autre sous-type. Pour les Th1, la cytokine-clé

semble être l'IL-12. Des travaux effectués chez le modèle murin ont démontré qu'une souris déficiente en IL-12 ou STAT4 (la molécule aidant à la production d'IL-12) n'a pas de lymphocytes Th1. Plus récemment, il a été démontré que l'IL-12 induit la différenciation en Th1 en partie en induisant la production du facteur de transcription T-bet. T-bet est exprimé dans les lymphocytes NK et dans les lymphocytes Th1 qui produisent tous deux de l'IFN- $\gamma$ <sup>42</sup>. Parallèlement à cela, l'expression de T-bet supprime la production d'IL-4 et d'IL-5, des molécules influençant la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en sous-type Th2. Ces évidences supportent donc la notion que T-bet joue un rôle dominant dans la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocyte effecteur Th1.

- Les lymphocytes CD4+ Th2

Les lymphocytes CD4+ Th2 sont impliqués dans les réponses immunitaires de type humoral. Ils sont nécessaires à l'élimination de pathogènes extracellulaires comme le toxoplasme, la leishmania ou les parasites intestinaux (les helminthes). La cytokine dominante produite par les Th2 est l'IL-4 quoiqu'ils soient capables de produire aussi de l'IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13<sup>42,43</sup>. Ces cytokines tiennent un rôle important pour l'activation et la différenciation des lymphocytes B. Elles interviennent aussi dans le développement de la réponse allergique. En effet, les lymphocytes Th2, en produisant l'IL-4, favorisent la commutation isotypique en IgE, isotype qui joue un rôle prépondérant dans la dégranulation des mastocytes. Les Th2 expriment à leur surface des récepteurs à chemokines tels que le CCR3, le CCR4 et le CCR8. La cytokine responsable du développement du lymphocyte CD4+ naïf en Th2 est l'IL-4.

- Les lymphocytes CD4+ Th17

Récemment, le paradigme Th1/Th2 a été étendu à la suite de la découverte d'une troisième sous-population effectrice de lymphocytes T CD4 producteur d'IL-17, les Th17. Cette population joue un rôle dans l'élimination de certains pathogènes spécifiques qui requièrent une inflammation massive et que les Th1 et Th2 ne peuvent pas contrôler. Les Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22<sup>43</sup>. L'apparition des lymphocytes Th17 sur le site de l'inflammation est rapide. Grâce à l'induction de nombreuses chemokines, les lymphocytes Th17 peuvent relier l'immunité innée et adaptative et attirer d'autres sous-populations T auxiliaires sur le site de l'inflammation. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire. Elle stimule les fibroblastes, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales, à produire de multiples médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1, l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , l'oxyde nitrique, des métalloprotéases et des chemokines. Toutes ces molécules conduisent à l'induction d'une inflammation. Ces cytokines sont aussi responsables du recrutement de neutrophiles, eux-mêmes producteurs d'IL-17. Chez l'être humain, les lymphocytes Th17 sont impliqués dans l'inflammation présente au cours du psoriasis, de l'arthrite rhumatoïde, de la sclérose en plaques, ainsi que dans certaines infections bactériennes et fongiques.

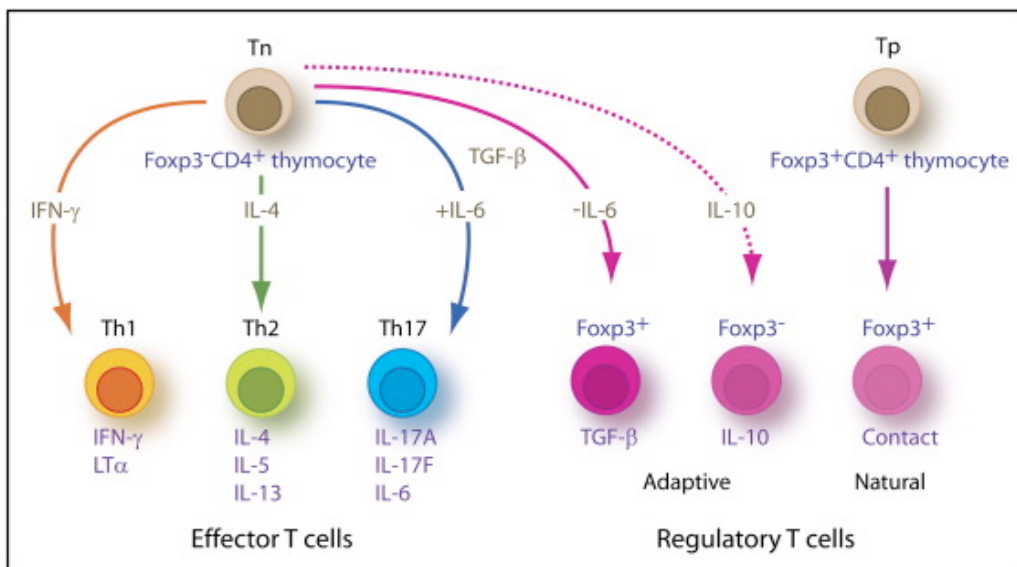
- Les Lymphocytes CD4+ régulateurs

Les lymphocytes CD4+ régulateurs (*regulatory T cells* ou Tregs) expriment le CD4 et le CD25 à leur surface. Ils sont caractérisés par la présence spécifique du facteur de

transcription FOXP3. Ils représentent environ 5-10% de la population lymphocytaire CD4+. Les Tregs sont générés par le thymus sur la base d'une affinité plus importante aux antigènes du "soi" à partir des thymocytes DP<sup>44</sup>.

Les Tregs peuvent contrôler à la fois les réponses dues aux lymphocytes Th1 et Th2. Ils inhibent les lymphocytes effecteurs par le biais de contacts intercellulaires et/ou par la sécrétion des cytokines IL-10 ou TGF- $\beta$ .

On croit qu'elles ont un rôle préventif quant à l'émergence de maladies auto-immunes. En effet, la déplétion de ces cellules chez la souris se traduit par le développement de maladies auto-immunes<sup>45</sup>.



**Figure 6. Les différentes cellules effectrices CD4+. Les différentes cellules T CD4+ effectrices découlent de l'activation et de la différenciation du lymphocyte CD4+ naïf (Tn). Des découvertes récentes ont aussi montré qu'un certain nombre de cellules T régulatrices dites "naturelles" proviendraient de précurseurs thymiques (Tp). Tiré de : Weaver et al. Immunity 2006<sup>46</sup>**



### Les lymphocytes T mémoires

Les lymphocytes T mémoires proviennent de cellules T naïves activées après reconnaissance des antigènes compatibles à leur TCR. Dès que l'infection est contrôlée, la majorité des lymphocytes effecteurs ayant participé à la réponse immune primaire meurent, tandis qu'une petite population cellulaire est maintenue. Ainsi, suite à l'activation des lymphocytes naïfs, une partie des cellules effectrices formeront le compartiment des cellules T mémoires. Sur le plan phénotypique, ils sont reconnus par la perte de l'expression de la molécule de surface CD45RA qui sera remplacée par le CD45RO après stimulation antigénique<sup>9</sup>. Les cellules mémoires possèdent une longue durée de vie et sont capables de répondre de façon rapide en réaction à un antigène auquel elles ont déjà été confrontées.

La mémoire immunologique résulte de l'expansion clonale et de la différenciation de lymphocytes spécifiques d'antigène qui s'accumulent et persistent toute la vie. Les cellules mémoires confèrent une protection immédiate dans les tissus périphériques et sont responsables de la réponse secondaire rapide et intense aux antigènes, dans les organes lymphoïdes secondaires.

Cette fonction de mémoire est portée par deux types cellulaires distincts: les cellules T effectrices mémoires (*effector memory T-cell* ou TEM) et les cellules T centrales mémoires (*central memory T-cells* ou TCM). Les TEM migrent dans les tissus périphériques enflammés et exercent une fonction effectrice immédiate. Les TCM, quant à elles, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires et ont peu de fonction effectrice<sup>47</sup>. Les cellules TEM et TCM sont donc définies selon la présence

ou l'absence de fonctions effectrices immédiates, et selon l'expression de récepteurs qui permettent aux cellules de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires ou vers les tissus non lymphoïdes.

- Les TCM sont des cellules mémoires qui expriment constitutivement CCR7 et CD62L. Ces deux récepteurs, qui sont également caractéristiques des cellules T naïves, permettent aux TCM de circuler plus aisément au sein des organes lymphoïdes secondaires. Comparées aux cellules naïves, les TCM ont une plus haute sensibilité aux stimulations antigéniques. Ces cellules, contrairement aux TEM, ont peu de fonctions effectrices mais sont capables de se différencier en cellules effectrices en réponse à une stimulation antigénique. Après l'engagement du TCR par réexposition à l'antigène, les TCM produisent principalement de l'IL-2, mais après prolifération, ils se différencient efficacement en cellules effectrices et produisent de grandes quantités d'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4<sup>47</sup>. Il a été montré que des TCM CD4+ pouvaient se différencier en cellules Th1 ou Th2 après stimulation en présence d'IL-12 ou d'IL-4. Par contre, dans des conditions neutres, certaines cellules peuvent se multiplier sans acquérir de fonction effectrice.
- Les TEM sont des cellules qui expriment peu ou pas le CCR7 et le CD62L. Ils expriment un ensemble caractéristique de récepteurs aux chemokines (ex. : CXCR3) et de molécules

d'adhésion (LFA-1 et VLA-4) qui leur permettent de migrer de façon préférentielle vers les tissus périphériques où règne l'inflammation. Les TEM ont la capacité de se transformer rapidement en cellules T effectrices et de sécréter de l'IFN-gamma, de l'IL-4 et de l'IL-5. La population des TEM contient les lymphocytes T CD4 Th1, Th2, Th17 et les CTL<sup>47</sup>.

La proportion des TEM et TCM dans le sang est différente selon les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ : les TCM sont prédominants dans les lymphocytes T CD4+ et les TEM dans les lymphocytes T CD8+. De plus, la distribution des TCM et TEM dans les tissus est caractéristique: les ganglions lymphatiques sont enrichis en TCM alors que les poumons, le foie et les intestins contiennent une plus forte proportion de TEM.

#### **1.2.5.2. L'homéostasie du compartiment lymphocytaire T périphérique**

##### Principe de l'homéostasie

En l'absence de stimulation antigénique, le compartiment lymphocytaire T périphérique est stable chez l'adulte. Toutefois, cette population est loin d'être statique mais est plutôt dynamique. Les cellules du système immunitaire sont renouvelées en permanence, environ 40% du compartiment lymphocytaire T est renouvelé après 20 jours<sup>48</sup>. L'état d'équilibre est assuré par une balance entre les processus de production et d'élimination des lymphocytes T périphériques. Ceci peut paraître surprenant de prime abord étant donné qu'au cours du vieillissement, le thymus subit une involution et qu'il y a aussi une baisse de la thymopoïèse. Cela entraîne une réduction significative de l'exportation thymique. Cependant, le

compartiment périphérique lymphocytaire T est efficacement maintenu par des mécanismes d'expansion périphérique.

L'homéostasie fait référence à la stabilisation, chez les organismes vivants, des différentes constantes physiologiques<sup>49</sup>. Appliqué à un système ou un organe, le terme d'homéostasie désigne les mécanismes internes de régulation propres à ce système ou cet organe. En ce qui a trait à la population lymphocytaire T, l'homéostasie permet de maintenir l'équilibre entre le nombre de cellules T à la périphérie et la production thymique. Ainsi, même si le nombre de cellules exportées par le thymus devient de plus en plus limité avec le temps, on note l'accroissement de la survie des lymphocytes T périphériques et de leur prolifération<sup>50</sup>. L'homéostasie s'adapte donc à la baisse constante de production thymique durant l'existence et s'applique à l'ensemble des populations lymphocytaires (naïves et mémoires). Elle est déterminée par des processus actifs qui contrôlent pour chaque sous-population présente en périphérie les apports et les pertes cellulaires. La prochaine partie sera consacrée à l'étude des différents facteurs influençant l'homéostasie lymphocytaire périphérique.

#### La production de nouvelles cellules T par le thymus

Le thymus est l'organe principal qui soutient la production de lymphocytes T naïfs. Principalement actif durant les périodes foétale et périnatale, cet organe ralentit ses fonctions dès la première année de vie. Il a été possible de croire, à tort, que celui-ci était inactif rendu à l'âge adulte. Or, il n'en n'est rien. Des études basées sur la quantification des TREC ont permis de démontrer que la capacité de production de

cellules T par le thymus persiste à l'âge adulte<sup>51,52</sup>. Cependant, il est à noter qu'une diminution du nombre de RTE se produit avec l'âge<sup>53</sup>. Ceci constitue une cause majeure du déclin des compétences immunitaires du sujet âgé. Cette diminution de production thymique de lymphocytes est bien décrite dans les études portant sur la greffe de moelle osseuse<sup>54</sup>. En effet, la récupération des taux de RTE après greffe dépend de l'âge du sujet. Cette récupération se chiffre à 80% des valeurs normales pour l'âge chez les sujets greffés de moins de 40 ans par opposition à 10% chez les sujets de plus de 50 ans. La reconstruction du répertoire des cellules T naïves post-greffe est donc possible mais avec une diversité moindre au niveau des TCR<sup>55</sup>.

Pourquoi l'âge influence-t-il la production centrale lymphocytaire T? Les causes sont multiples. Tout d'abord, on note une diminution des cellules souches hématopoïétiques qui apparaît avec l'âge, ce qui entraîne une baisse du nombre de précurseurs lymphoïdes<sup>56</sup>. Ensuite, au sein du thymus même, une diminution du nombre et de la fonction des cellules stromales se manifestent<sup>57</sup>. En effet, ces cellules, avec l'âge, synthétisent moins d'IL-7, une cytokine jouant un rôle dans la thymopoïèse<sup>57</sup>. Finalement, une perturbation des facteurs de régulation des cellules épithéliales thymiques est entraînée par la diminution de l'hormone de croissance (*Insulin growth factor-1* ou IGF-1) et l'augmentation d'hormones stéroïdiennes. L'IGF-1 est reconnu pour son effet anti-apoptotique sur les thymocytes<sup>58</sup>. Elle peut également stimuler la production de cytokines par les cellules stromales thymiques. Les hormones stéroïdiennes, quant à elles, sont toxiques pour le développement des thymocytes et accélèrent l'involution du tissu thymique<sup>59</sup>.

### La prolifération homéostatique

C'est à partir de la fin de la première année de vie que le thymus subit une involution. Par conséquent, sa participation active à la production des lymphocytes T diminue avec les années. La diversité et le nombre de lymphocytes T ne peuvent pas être maintenus que par la production de nouvelles cellules par le thymus. Comment le système immunitaire fait-il alors pour garder des taux quasi-constants de lymphocytes CD4 et CD8 tout au long de la vie? La réponse à cette question provient de la prolifération homéostatique.

Ce concept fait référence à l'expansion oligoclonale des lymphocytes T périphériques en dehors d'une stimulation antigénique spécifique. La prolifération homéostatique se retrouve autant chez les lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs que mémoires. Deux facteurs sont nécessaires pour permettre une telle prolifération : la présence d'IL-7 (discuté à la section suivante) et des interactions TCR/CMH impliquant des peptides du "soi".

La survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs dépendent de l'expression des molécules de CMH II et I respectivement. Ces molécules, exprimées dans le thymus, sont responsables de la sélection positive des thymocytes et doivent être à nouveau présentes en périphérie pour assurer la survie et la prolifération des lymphocytes T. Il est question ici d'une « sélection positive périphérique » sur la base de la reconnaissance des mêmes complexes "CMH-peptide" qui avaient été responsables de la sélection positive dans le thymus.

Il a déjà été démontré que des lymphocytes T ne survivaient pas s'ils étaient transférés de leur environnement « normal » vers un milieu ne contenant pas de

molécules CMH<sup>60</sup>. Le contact des lymphocytes T naïfs avec des cellules exprimant certains complexes « peptide du soi/CMH » lors de leur circulation dans les organes lymphoïdes périphériques permet aussi une division cellulaire et donc une prolifération de ceux-ci. Il n'est pas encore clairement établi où ces lymphocytes naïfs CD4+ et CD8+ rencontrent leur ligand. Les évidences actuelles suggèrent que cette interaction se déroule dans les zones T des organes lymphoïdes périphériques où résident aussi des cellules dendritiques qui expriment à leur surface des antigènes du "soi". Ces cellules dendritiques ont la particularité de ne pas avoir de molécules de costimulation, les empêchant ainsi d'activer pleinement les lymphocytes T.

Les lymphocytes mémoires sont capables eux aussi de prolifération homéostatique. Celle-ci est indépendante des contacts avec les antigènes du "soi" présentés par les cellules dendritiques. La présence de l'antigène responsable de la sélection positive de ces lymphocytes n'est pas nécessaire à leur maintien en périphérie. La prolifération des lymphocytes T mémoires est régulée par la présence de cytokines, particulièrement l'IL-7 et l'IL-15<sup>61</sup>.

#### Le rôle des cytokines

Certaines interleukines sont impliquées dans l'homéostasie lymphocytaire. L'interleukine-7 et 15 (IL-7 et IL-15) contrôlent la survie et la prolifération homéostatique des lymphocytes T avec des effets caractéristiques selon les sous-populations CD4+ ou CD8+ naïves et mémoires.

Certaines cytokines sont nécessaires pour la survie et la prolifération des lymphocytes T. L'IL-7 y joue un rôle majeur. Cette cytokine est impliquée dans la

régulation homéostatique des compartiments lymphocytaires T. Dans les organes périphériques lymphoïdes, elle est produite par les cellules folliculaires dendritiques et par des cellules réticulaires fibroblastiques. Les cellules dendritiques et les macrophages présents dans les tissus périphériques produisent également de l'IL-7 mais en moindre quantité, ce qui ne les empêche pas de jouer un rôle actif dans l'homéostasie des lymphocytes T<sup>62,63</sup>. La signalisation intracellulaire découlant de l'engagement de l'IL-7 sur son récepteur à la surface des lymphocytes T périphériques a pour principales conséquences d'augmenter sa survie et sa prolifération par son effet sur le métabolisme et la régulation du cycle cellulaire<sup>64</sup>.

L'IL-15 est un facteur très important pour l'homéostasie des cellules T mémoires CD8+ dans des conditions physiologiques ou au cours de lymphopénies. Cependant, d'autres données montrent qu'une forte prolifération de cellules T mémoires CD8+ au sein d'un hôte lymphopénique peut avoir lieu en absence d'IL-15, celle-ci étant remplacée par l'IL-7<sup>65</sup>.

L'IL-2 est une autre cytokine d'une importance capitale. Comme l'IL-15, l'IL-2 permet de contrôler la survie de certaines sous-populations de lymphocytes T, notamment grâce à l'induction de la production de la molécule anti-apoptotique Bcl-2. L'IL-2 assure le maintien des cellules activées et est capable d'induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. L'IL-2 est principalement produite par les lymphocytes T CD4+ à la suite d'une stimulation antigénique ou lors d'une division cellulaire. Elle ne semble pas jouer de véritable rôle dans la prolifération homéostatique induite en cas de lymphopénie.



La population lymphocytaire T périphérique est donc en perpétuel renouvellement. Grâce à la régulation homéostatique, les lymphocytes sont capables de proliférer en absence de stimulation antigénique. L'homéostasie lymphocytaire s'applique à l'ensemble des sous-populations de lymphocytes. Chacune de ces sous-populations répond à des processus actifs communs ou propres qui régulent les apports ou les pertes cellulaires. Les apports périphériques dépendent du taux de lymphocytes nouvellement produits à partir des précurseurs thymiques, de leur capacité à migrer et coloniser le compartiment périphérique et de l'activité de prolifération et des propriétés de survie lymphocytaire au sein d'une population.

### **1.3 La thymectomie**

La thymectomie consiste en l'ablation du thymus. Elle est nécessaire au cours de la chirurgie cardiaque infantile puisqu'elle permet au chirurgien d'avoir un meilleur accès au cœur lors de l'intervention. La thymectomie peut être réalisée dans un but thérapeutique. En effet, l'ablation du thymus semble bénéfique pour les patients atteints de myasthénie grave<sup>66</sup>. Cette manœuvre chirurgicale est aussi effectuée lorsqu'une tumeur (thymome) est présente.

Au moment de la naissance, le répertoire périphérique des lymphocytes T est déjà établi. La perte graduelle de la fonction du thymus est compensée par la prolifération homéostatique, tel que vu précédemment. Il y a donc un maintien de la diversité

lymphocytaire T. Pendant longtemps, on a cru que l'ablation du thymus d'un enfant ou même d'un nouveau-né ne se traduisait pas par une immunodéficience sévère<sup>67,68</sup>. Mais ce geste chirurgical est-il vraiment dénué de toute implication sur le plan immunologique?

### 1.3.1. Les conséquences de la thymectomie sur les lymphocytes

#### 1.3.1.1 Les Lymphocytes T totaux (CD3), CD4 et CD8

Tout d'abord, chez les enfants thymectomisés apparaît une diminution de la valeur absolue et relative des lymphocytes<sup>69-72</sup>. Ce ne sont pas tous les patients thymectomisés chez qui sera observée une lymphopénie<sup>70,73</sup>. Cependant, quelques écrits semblent corréler la sévérité de la lymphopénie avec l'ampleur du tissu thymique réséqué (thymectomie complète versus partielle)<sup>73</sup>. Certains auteurs postulent que cette diminution en apparence transitoire, serait due à la libération de glucocorticostéroïdes endogènes en raison du stress induit par l'opération<sup>69</sup>. La durée de cette lymphopénie est inconnue mais peut persister même 3 ans après le geste chirurgical<sup>70</sup>. De façon plus précise, se sont les lymphocytes T (CD3+) qui se voient réduits en nombre<sup>69-76</sup>.

Une étude plus approfondie des lymphocytes T montrent que les cellules CD4+ et CD8+ sont diminuées mais que cette baisse est plus accentuée pour les CD4+ que les CD8+<sup>69-78</sup>. Quelques études montrent même que les taux de lymphocytes CD8+ ne sont pas diminués de façon significative<sup>71,74</sup>.

Sur le plan fonctionnel, les lymphocytes des patients thymectomisés montrent une prolifération normale en réponse aux mitogènes (phytohémmagglutinine A ou PHA et anti-CD3) et aux antigènes (ex: anatoxine tétanique)<sup>70,72,74</sup>.

### **1.3.1.2. Les lymphocytes naïfs et mémoires**

Après une thymectomie, les lymphocytes T présentent un répertoire TCR (exprimé par les CD4+ et les CD8+) moins diversifié ce qui se traduit par une population T mémoire oligoclonale en périphérie<sup>70,77</sup>. Puisque la diversité des TCR est affectée, il est possible de supposer que la capacité des lymphocytes à répondre à de nouveaux antigènes soit diminuée. Une autre étude portant sur 20 patients ayant subi une greffe cardiaque et thymectomisés 1 à 10 ans avant cette procédure abonde dans le même sens<sup>76</sup>. Cette restriction du répertoire TCR est observée chez les sujets âgés non thymectomisés. Par ailleurs, la thymectomie ne semble pas influencer le développement normal des lymphocytes T mémoires. En effet, une étude relate que les lymphocytes T mémoires déjà existants (par exemple, spécifiques à des infections virales chroniques telles que l'EBV) chez des patients thymectomisés présentent un phénotype adéquat et des fonctions normales<sup>77</sup>. Les lymphocytes CD4+ et CD8+ mémoires sont retrouvés de façon plus importante chez les patients thymectomisés et ce, de façon inversement proportionnelle à la baisse des lymphocytes naïfs CD4+ et CD8+<sup>77</sup>. Ainsi, il apparaît que la thymectomie n'a pas de conséquence néfaste sur la production de lymphocytes T mémoire ce qui explique l'absence de symptômes infectieux notoires<sup>77</sup>. D'autres études ont montré par d'autres marqueurs (CD45RO+) que la population mémoire n'était pas diminuée en valeur absolue par rapport aux

patients non thymectomisés<sup>74</sup>. Finalement, le nombre total de lymphocytes mémoires CD4+ CD45RO+ augmente de façon constante dans les années qui suivent la thymectomie<sup>32</sup>.

Cette perte de lymphocytes CD4+ et CD8+ semble donc se faire au dépend du compartiment naïf<sup>32,71-74,76-78</sup>. La diminution des lymphocytes T naïfs CD4+ CD45RA+ serait directement reliée à l'âge à laquelle la thymectomie est effectuée de même que l'intervalle de temps post-thymectomie au moment où l'évaluation immunologique est réalisée<sup>32</sup>. De plus, les patients thymectomisés subissent des diminutions importantes des RTE<sup>32,70,72,77,78</sup>. Certaines études ont déjà montré que les TREC étaient réduits considérablement chez les patients thymectomisés et que cette baisse était proportionnelle à la diminution des lymphocytes T totaux de même que les lymphocytes T naïfs<sup>32,73,78</sup>.

### **1.3.1.3. Les autres populations lymphocytaires T**

Les lymphocytes T régulateurs ou Tregs sont aussi réduits en nombre chez les sujets thymectomisés, bien que les Tregs naïfs CD4+CD25+CD62L+ ne semblent pas être affectés<sup>71,77</sup>. Il a été avancé que les Tregs mûrent plus tôt dans la vie que les autres sous-types de lymphocytes CD4+ et, en conséquence, seraient moins influencés par la thymectomie<sup>71,79</sup>.

La population lymphocytaire T portant un TCR de type  $\gamma\delta$ , quant à elle, était légèrement diminuée par rapport aux sujets non thymectomisés mais cette différence serait statistiquement significative (par rapport aux sujets non thymectomisés).<sup>70,72</sup>

#### **1.3.1.4. Les lymphocytes B et NK**

Le nombre de lymphocytes B ne semble pas affecté par la thymectomie<sup>70,72</sup>. Cependant, les résultats divergent sur le plan fonctionnel, lorsque les taux d'immunoglobulines sanguines (IgG, IgA, IgM) sont dosés post-thymectomie. Certaines études ne notent aucune différence<sup>70</sup>, alors que d'autres notent une diminution de la concentration des IgA, IgM et/ou IgG<sup>69,72,75</sup>. Il se pourrait que cette baisse soit transitoire et que la divergence des résultats proviennent du fait que le dosage pondéral des immunoglobulines ait été réalisé à des moments différents après la thymectomie (quelques mois versus des années plus tard). Une étude récente a montré que la vaccination des enfants thymectomisés contre certains germes montrait un développement tardif des anticorps<sup>80</sup>. Cependant d'autres études ont montré des taux normaux d'anticorps après vaccination contre la toxine tétanique, la diphtérie ou le pneumocoque<sup>70,71,74,75</sup>.

Les lymphocytes NK ne montrent aucune différence significative de leur valeur absolue après la thymectomie<sup>70,72,77</sup>. Cela s'explique par le fait que ces lymphocytes, (tout comme les cellules B) ne séjournent pas dans le thymus afin d'y maturer.

#### **1.3.1.5. Les conséquences en fonction de l'âge de la thymectomie**

Les études décrites semblent aboutir à des conclusions similaires en ce qui a trait aux perturbations des lymphocytes T et de leurs sous-types. Il est intéressant de noter que l'âge moyen au moment de la thymectomie variait de façon importante selon les études consultées : moins de 2 semaines de vie<sup>32</sup>, moins de 1 mois de vie<sup>70,74</sup>, premiers mois de vie<sup>32,71,72</sup>. Ainsi, il semble que les altérations immunologiques surviennent peu importe l'âge à laquelle la thymectomie a été

effectuée. Ces changements notés au sein du répertoire T, spécialement pour les lymphocytes T naïfs, tend à perdurer toute la vie. Un groupe autrichien a examiné la fonction thymique et les altérations du répertoire T naïf chez une cohorte de patients ayant été thymectomisés dans leurs premiers mois de vie<sup>32</sup>. Ils ont recherché des signes prématurés d'immunosénescence chez ces individus dont la thymectomie remontait jusqu'à 27 années plus tôt. Les perturbations au niveau du compartiment naïf T décrites ci-haut étaient encore présentes même des années après le geste chirurgical. Une étude récente semble montrer des résultats différents. Cette étude<sup>81</sup> rassemble 39 patients thymectomisés en jeune âge (âge médian: 0.03 an) dans le cadre d'une chirurgie cardiaque. On note encore une fois des taux diminués de CD4+ et CD8+ dans les premières années suivant la chirurgie. Les cellules naïves CD4+ et CD8+ sont également affectées. Cependant, ces perturbations des sous-populations lymphocytaires se corrigent 5 ans après la thymectomie. Il semble que cette normalisation des différents groupes de lymphocytes soit liée à la présence d'un reliquat thymique objectivé par résonance magnétique.

#### **1.3.1.6. La thymectomie et le taux de cytokines**

Les effets de la thymectomie se font aussi ressentir sur les niveaux sanguins de cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1b, l'IL-8 et l'éotaxine dont les taux sont plus élevés<sup>77</sup>. Les taux d'IL-7 sont plus hauts chez les patients thymectomisés comparativement aux patients non-thymectomisés<sup>70</sup>. Cette hausse d'IL-7 n'est pas transitoire puisqu'elle est aussi présente 2 ans après la chirurgie. L'IL-7 n'est pas une cytokine pro-inflammatoire mais participe au développement, l'homéostasie et la

fonction des lymphocytes T. Cependant, il semble que même des taux élevés d'IL-7 n'arrivent pas à favoriser une production suffisante de lymphocytes T CD4+ afin de palier la perte encourue par l'ablation du thymus.

### 1.3.2. Les répercussions cliniques

Sur le plan clinique, les patients thymectomisés dans leur 1<sup>er</sup> mois de vie ne souffraient pas plus d'infections que les patients n'ayant pas subi l'ablation du thymus<sup>68,70,74,75,81</sup>. Il n'en demeure pas moins que la thymectomie semble avoir un effet délétère sur l'équilibre des différentes populations lymphocytaires T, à plus forte raison si ces patients devaient être confrontés à des agents viraux ou médicamenteux susceptibles de déléter davantage le répertoire T.

La thymectomie ne semble être pas associée à une incidence accrue de maladies auto-immunes. Il est intéressant de noter que plusieurs pathologies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde juvénile et le pemphigus bulleux sont caractérisées par des taux sanguins élevés d'IL-7. Même si des concentrations importantes d'IL-7 ont été observés dans une étude portant sur 23 patients thymectomisés, aucune manifestations auto-immunes n'ont été enregistrées<sup>70</sup>. Quelques études ont montré que la thymectomie ne se traduisait pas par une apparition d'auto-anticorps tel que le facteur anti-nucléaire et le facteur rhumatoïde<sup>71,72</sup>.

## 1.4. La lymphopénie

La lymphopénie isolée se définit comme étant une diminution des lymphocytes sanguins sous le seuil normal inférieur de la valeur absolue. Le nombre total de lymphocytes varie en fonction de l'âge. Ainsi, une valeur absolue de lymphocytes correspondant à moins de 1000 cellules/ $\mu$ L est considérée comme diagnostique d'une lymphopénie chez l'adulte alors que chez les enfants de moins de 2 ans, une valeur de 3000 cellules/ $\mu$ l correspond au 5<sup>e</sup> percentile du décompte absolu de lymphocytes<sup>82</sup>. La recherche d'une lymphopénie est particulièrement importante puisqu'elle est associée à une susceptibilité accrue aux infections<sup>83</sup> et mène à une moins bonne évolution post-opératoire chez les patients ayant subi une chirurgie cardiaque et chez qui l'on avait noté une lymphopénie avant l'intervention<sup>84</sup>.

La découverte de la lymphopénie constitue le plus souvent une trouvaille fortuite à la formule sanguine puisque les sujets sont le plus souvent asymptomatiques. Il est important de préciser que des fluctuations spontanées du nombre de ces cellules au niveau du sang sont aussi possibles chez des sujets sains. Un nombre normal ou un peu diminué des lymphocytes circulants peut masquer des altérations qualitatives majeures.



### 1.4.1. Quelques causes primaires

La lymphopénie se retrouve dans certaines pathologies du système immunitaire appelées immunodéficiences. Dans ces cas, la lymphopénie est dite primaire (par opposition à secondaire) puisqu'elle est présente chez l'individu dès sa naissance. Ces types d'immunodéficiences peuvent toucher de façon privilégiée un type particulier de lymphocytes. Il existe un bon nombre de pathologies avec absence ou quasi-absence de lymphocytes T tels que le syndrome de Di George total ou l'immunodéficiência combinée sévère (*severe combined immunodeficiency* ou SCID). Ces anomalies du système immunitaire possèdent des manifestations clinico-biologiques qui leur sont propres et dont la description dépasse les limites imposées par ce mémoire.

### 1.4.2. Les principales causes secondaires

Le chylothorax se rapporte à l'accumulation de chyle au niveau de l'espace pleural et est causé par la rupture du canal thoracique. La rupture du canal survient le plus souvent pendant la chirurgie cardiaque mais peut aussi être causée par des tumeurs<sup>85</sup>. Il a été trouvé au sein de cet épanchement chyleux des taux élevés de triglycérides, de chylomicrons et aussi de lymphocytes T<sup>82,86</sup>. La lymphopénie se caractérise par une diminution marquée des cellules T avec un déclin sélectif des CD4<sup>+</sup><sup>87</sup>. Il est à noter aussi une perte préférentielle des lymphocytes T naïfs CD45RA<sup>+</sup><sup>88</sup>.

Certains immunosuppresseurs peuvent engendrer une lymphopénie<sup>89</sup>. Les corticostéroïdes à forte dose, par exemple, exercent un effet lytique directement sur

les lymphocytes et peuvent occasionner une redistribution des lymphocytes circulants, causant ainsi une lymphopénie. La cyclophosphamide est un agent alkylant ayant la capacité d'inhiber la réplication cellulaire. Ce puissant médicament a la capacité de réduire la prolifération lymphocytaire en interférant directement avec le cycle cellulaire. Il en résulte donc une lymphopénie.

Des infections virales (EBV, CMV) peuvent causer des lymphopénies transitoires<sup>90</sup>. Le VIH, quand à lui, induit une lymphopénie majoritairement CD4+. Cette lymphopénie n'est généralement pas transitoire et résulte en une immunodéficience sévère (syndrome d'immunodéficience acquise ou SIDA) lorsque ce nombre de lymphocytes descend sous la barre des 200 cellules/mm<sup>3</sup>.

En dehors de la thymectomie et du chylothorax, il existe une autre cause importante de lymphopénie: l'entéropathie exsudative. Cette maladie digestive est caractérisée par une perte excessive de protéines au niveau digestif. Les causes des entéropathies exsudatives sont multiples et peuvent être locales ou générales. Parmi elles, notons la maladie de Whipple, la maladie coeliaque, la sclérodermie, la tuberculose intestinale et l'amyloïdose<sup>91</sup>. Rarement, l'entéropathie exsudative est liée à une gêne au retour veineux entraînant une augmentation de la pression veineuse centrale et une congestion des vaisseaux lymphatiques dans la muqueuse digestive. Plus fréquemment associée avec la procédure de type Fontan lorsqu'elle est en lien avec la chirurgie cardiaque, l'entéropathie exsudative complique parfois d'autres types de chirurgies cardiaques réalisées pour la sténose pulmonaire, l'insuffisance tricuspидienne et pour des défauts du septum auriculaire<sup>92</sup>. Cette entéropathie exsudative peut être associée ou non avec une lymphangiectasie intestinale<sup>93</sup>. La

lymphangiectasie est une maladie marquée par le blocage et la dilatation des vaisseaux lymphatiques intestinaux menant à une perte du fluide lymphatique au niveau du tractus digestif<sup>93</sup>. Le mécanisme sous-jacent de cette entéropathie serait en lien avec une augmentation chronique des pressions systémiques veineuses<sup>94,95</sup>. Il en résulterait un bris mécanique au niveau du réseau lymphatique. La perte lymphatique se traduit par un œdème périphérique accompagné sur le plan biologique d'une hypoalbuminémie, d'une hypogammaglobulinémie et d'une lymphopénie<sup>96</sup>. Selon une petite étude réalisée sur 6 patients avec entéropathie exsudative post-chirurgie cardiaque (4 chirurgies Fontan dans ce groupe), la lymphopénie observée était au dépend du sous-groupe CD4+<sup>97</sup>. Les lymphocytes B et NK n'étaient pas affectés. De plus, une diminution significative des IgG et des IgA était notée. Finalement aucune infection opportuniste n'a été enregistrée chez ce groupe de patients. Ceci a été confirmé par d'autres études démontrant que les taux d'immunoglobulines étaient aussi abaissés mais que la répercussion clinique (augmentation des infections) semblait modeste.

Sur le plan de la lymphopénie, ce sont les lymphocytes CD4+ qui sont diminués alors que les CD8+ demeurent dans les limites de la normale<sup>98</sup>. Plus spécifiquement, la baisse des CD4+ se retrouve au sein du compartiment naïf (CD45RA+) alors que les lymphocytes T CD4+ mémoires (CD45RO+) sont peu affectés<sup>93</sup>. Cette différence apparente s'explique comme suit. Les lymphocytes naïfs expriment le CD62L, une molécule facilitant le transport de ces cellules dans les tissus lymphoïdes. Cependant, ces cellules naïves, à l'opposée des cellules mémoires, expriment peu

d'intégrines de surface, nécessaires à l'adhésion tissulaire (autre que lymphoïde)<sup>99</sup>. Ainsi, les lymphocytes T naïfs recirculent davantage dans la circulation périphérique lymphatique alors que les lymphocytes T mémoires ont tendance à migrer dans les tissus périphériques<sup>100</sup>. Certains auteurs ont même avancé la possibilité que le liquide lymphatique soit plus riche en lymphocytes CD4+ que CD8+. <sup>98,101,102</sup>. Ces données combinées ensemble expliquent donc pourquoi les lymphocytes T CD4+ naïfs sont plus gravement touchés par l'entéropathie exsudative.

## **1.5. La chirurgie cardiaque de type Fontan**

Les malformations cardiaques congénitales seraient constatées sur 1 nouveau-né sur 100. Les problèmes sont variés : transposition des gros vaisseaux, anomalie du septum, atrésie des oreillettes, etc. Ces anomalies peuvent parfois entraver la circulation sanguine dans le cœur et se traduire par des répercussions cyanogènes. Une opération cardiaque est donc nécessaire pour palier à ce problème. L'une des approches chirurgicales au niveau cardiaque se nomme procédure de Fontan.

### **1.5.1. Description**

La procédure de Fontan a été créée par le Dr Francis Fontan en 1971<sup>103</sup>. Elle consiste en une anastomose auriculo-pulmonaire. Elle s'adresse donc à des pathologies où il existe un mélange complet des retours veineux systémique et

pulmonaire. Ce type de chirurgie est indiqué dans les cas d'hypoplasie du cœur gauche, d'atrésie tricuspide et de ventricule unique. Le Fontan est aussi réalisé pour certaines atrésies pulmonaires avec septum intact. Anatomiquement, l'oreillette droite est anastomosée à l'artère pulmonaire principale afin de permettre au sang veineux de se rendre dans la circulation pulmonaire pour qu'il puisse être rechargé en oxygène (voir **Figure 6**, page 58)<sup>104</sup>. L'oreillette droite est donc isolée de la gauche. En dirigeant le retour veineux systémique vers l'artère pulmonaire principale, une circulation en série est établie (oreillette droite → artère pulmonaire → retour veineux pulmonaire → ventricule ou oreillette gauche). Une connexion entre la veine cave supérieure et l'artère pulmonaire est parfois réalisée. Cette procédure s'adresse à l'enfant de plus de 3 ans et de ce fait, elle est souvent précédée de chirurgies palliatives.

Par exemple, dans les cas où une absence de communication entre les oreillettes ne permet pas le passage du sang oxygéné revenant des poumons vers le cœur droit, un élargissement de la communication interauriculaire sera nécessaire. Cette intervention se dénomme "septostomie de Rashkind", d'après le médecin ayant décrit la technique<sup>105</sup>. Cette technique consiste en l'insertion d'une canule via la veine fémorale qu'on dirige vers l'oreillette droite puis gauche via le foramen ovale. Le ballonnet est gonflé puis retiré ce qui permet une déchirure de la paroi entre les oreillettes. Si la cardiopathie congénitale comprend une hypoplasie sévère du cœur gauche ou la présence d'un ventricule unique, une intervention de Norwood sera préconisée. La première étape s'applique dans les cas de rétrécissement sévère de

la voie pulmonaire. Ainsi, dès les premiers jours ou mois de vie, un "shunt de Blalock" est réalisé<sup>105</sup>. Durant cette opération à coeur ouvert, un tube en goretex est installé entre l'artère sous-clavière (ou l'aorte) et l'artère pulmonaire. Selon l'évolution clinique du patient, le second geste chirurgical sera réalisé vers l'âge de 6 mois. Il se pratique alors une anastomose cavo-pulmonaire supérieure directionnelle nommée "procédure de Glenn"<sup>105</sup>. Cette chirurgie permet de connecter directement la veine cave supérieure sur les artères pulmonaires. La circulation sanguine veineuse est donc détournée du coeur droit. Cette intervention nécessite une fois de plus l'ouverture du thorax lors de la procédure. Ce n'est que plus tard que la chirurgie de Fontan sera programmée. Il est à noter que la thymectomie sera réalisée dès la première chirurgie à coeur ouvert, donc dans les premiers mois de vie dans bon nombre de cas. Il n'est donc pas étonnant que la thymectomie précède la chirurgie de Fontan.

Les complications immédiates sont la défaillance cardiaque, l'arythmie et les épanchements pleuraux alors qu'à long terme, il apparaît plus tôt un risque accru d'embolie pulmonaire, de thrombose veineuse dans l'oreillette droite, d'accident vasculaire cérébral et d'entéropathie exsudative<sup>104,106</sup>. Cette dernière complication serait le facteur prédictif de mortalité le plus important chez les patients ayant subi cette chirurgie cardiaque<sup>107</sup>.

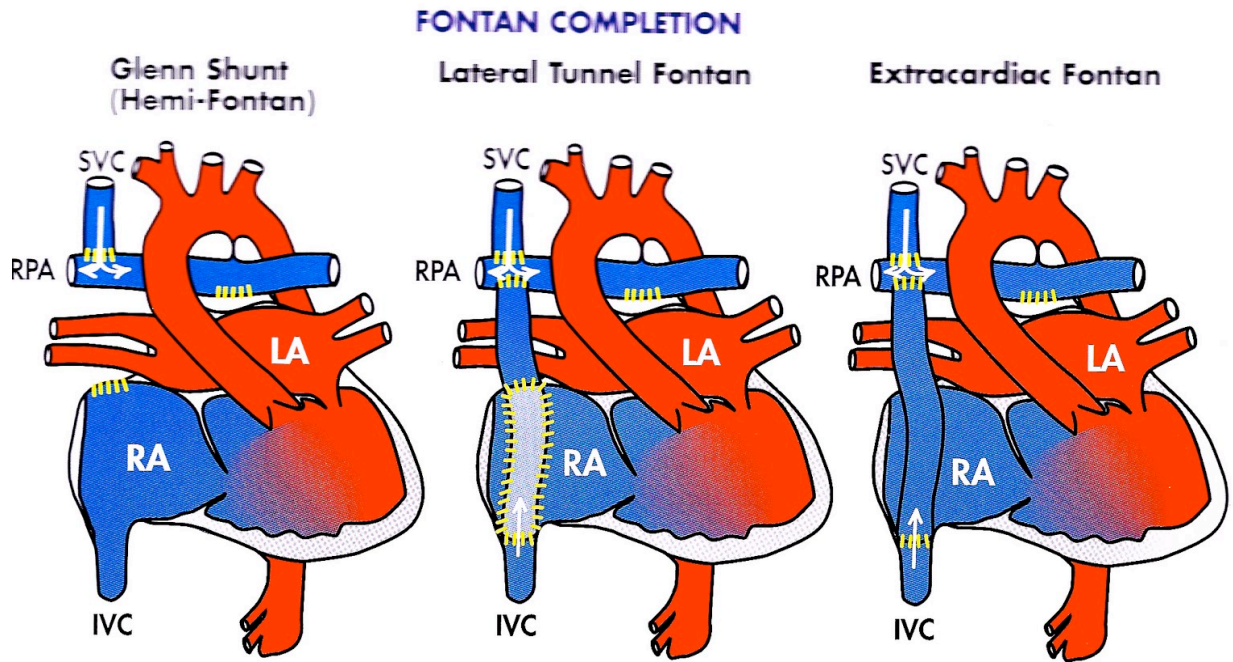


Figure 7. Procédure de Fontan. SVC, Veine cave supérieur. RPA, artère pulmonaire droite. LA, oreillette gauche. RA, oreillette droite. IVC, Veine cave inférieure. Adapté de : <http://heartdefectsforeveryone.blogspot.ca/2010/04/univentricular-heart-single-ventricle.html>

### 1.5.2. Les complications

Chaque geste chirurgical n'est pas dénué de risque. La procédure de Fontan n'y fait pas exception. Cette chirurgie peut résulter en une dysfonction ventriculaire sévère menant à de l'ischémie cardiaque et à l'infarctus du myocarde<sup>108</sup>. Une augmentation de la tension veineuse au niveau de la veine cave inférieure peut causer une insuffisance hépatique, une cirrhose et de l'hypertension portale. Finalement, une atteinte du flot sanguin amène parfois la formation de caillots ; ceux-ci peuvent emboliser au niveau pulmonaire. Dans le cadre de ce projet de recherche, une

attention toute particulière sera portée à deux complications: l'entéropathie exsudative et la lymphopénie.

#### **1.5.2.1. L'entéropathie exsudative**

L'entéropathie exsudative survient, selon les séries, entre 4% et 24% des patients après chirurgie Fontan<sup>92,109</sup>. Elle peut-être associée ou non à la présence de lymphangiectasies intestinales. La mortalité associée à cette complication est d'environ 50% sur 5 ans et de 80% à 10 ans<sup>94,110,111</sup>. Au moment du diagnostic, les patients souffrent d'œdème périphérique et d'ascite ; une minorité de patients souffriront d'épanchements pleuraux et de diarrhée chronique<sup>94</sup>. L'hypoprotéïnémie, la lymphopénie, l'augmentation de la clairance fécale de l'alpha-1-antitrypsine et l'hypogammaglobulinémie globale qui en résultent sont des marqueurs importants de la sévérité de l'atteinte<sup>111-113</sup>. Cependant, ces données ne renseignent pas quant à la localisation des pertes protéiques et des lymphocytes. Parfois des endoscopies digestives avec biopsies peuvent révéler la présence de dilatations des vaisseaux lymphatiques<sup>109</sup>.

L'étude de la lymphopénie chez les patients post-Fontan avec entéropathie exsudative n'est détaillée que par quelques rapports de cas publiés dans la littérature médicale<sup>95,102,112,113</sup>. Cette lymphopénie est due presque exclusivement à la perte des CD4+ alors que les lymphocytes CD8+ ne sont pratiquement pas affectés<sup>112,113</sup>. Malgré l'atteinte profonde de l'immunité cellulaire, peu d'études mettent en évidence l'apparition d'infection opportuniste (virale ou fongique)<sup>95,102,112</sup>. Cependant, un cas



de pneumonie à *legionella* avec bactériémie secondaire a été décrit chez un patient post-Fontan avec entéropathie exsudative<sup>114</sup>.

#### **1.5.2.2. La lymphopénie post-chirurgicale**

Des lymphopénies post-chirurgie Fontan peuvent aussi survenir en dehors des cas d'entéropathies exsudatives. Celles-ci sont cependant peu rapportées dans la littérature médicale actuelle. Une publication de 1999 détaille le cas d'une jeune fille de 11 ans qui a développé une lymphopénie T CD4+, quatre ans après une chirurgie de type Fontan<sup>112</sup>. L'albumine (marqueur clé de l'entéropathie exsudative) n'était que légèrement diminuée. À noter que la jeune patiente ne présentait aucune diarrhée et que les multiples biopsies intestinales ne montraient aucune anomalie.

La lymphopénie découlant de l'entéropathie exsudative chez les patients ayant subi l'opération de type Fontan ne s'explique donc pas nécessairement par la thymectomie. De plus, elle ne peut être dans tous les cas expliquée par un chylothorax iatrogénique. De façon intéressante, il a été remarqué que certains marqueurs lymphocytaires pourraient aider à prédire quels patients développeront une entéropathie exsudative post-Fontan. En effet, il semble que les patients avec des taux élevés de lymphocytes NK (CD3-CD16+CD56+) et avec des niveaux bas de CD8+TCRαβ+ et CD8+TCRγδ+ sont plus exposés à développer ce genre de complications<sup>113</sup>. Ces données laissent croire que le système immunitaire est impliqué ou pourrait même participer au développement de l'entéropathie exsudative.

## 1.6. Les objectifs spécifiques du projet de recherche

Une dysfonction du système immunitaire semble être en lien avec la procédure de type Fontan. Cependant, cette anomalie du système immunitaire engendrée par le geste chirurgical ne peut être complètement imputée à la survenue d'entéropathie exsudative. Les études réalisées jusqu'à présent ne permettent pas d'affirmer si les caractéristiques phénotypiques des lymphopénies diffèrent en fonction du type de chirurgie (Fontan versus non-Fontan). En effet, la littérature médicale actuelle ne comporte aucune recherche sur cet aspect. Aucune donnée publiée ne permet d'affirmer que les perturbations de l'immunité soient entièrement liées à la thymectomie. De plus, aucune étude ne permet de croire à l'existence d'une corrélation entre le type de lymphopénie et sa durée ou son impact au niveau clinique (ex : survenue d'infections).

Ce projet vise à comparer, sur le plan immunologique et clinique, les patients post-chirurgie Fontan et ceux ayant subi une chirurgie cardiaque d'un autre type. Ainsi, il sera vérifié s'il existe des différences notables chez ces 2 groupes de patients au niveau des sous-populations lymphocytaires et s'il existe une éventuelle répercussion clinique du point de vue infectieux.

---

## CHAPITRE II. MÉTHODOLOGIE

# Chapitre II : Méthodologie

## 2.1. Le recrutement des patients et groupe "contrôle"

Tous les patients ayant subi une chirurgie cardiaque de type Fontan au CHU Sainte-Justine ont été approchés pour cette étude. Les critères d'exclusion comprennent la présence de lésions résiduelles hémodynamiquement significatives, un traitement immunosuppresseur (dont les corticostéroïdes), une maladie hématologique, une entéropathie exsudative ou une maladie sous-jacente pouvant affecter le système immunitaire telle que le syndrome de Di George ou une trisomie 21.

Le groupe "contrôle" est constitué de patients ayant subi une thymectomie lors d'une chirurgie cardiaque autre que Fontan au CHU Sainte-Justine. Ces patients sont appariés aux patients du groupe Fontan selon leur âge à l'évaluation et leur âge à la thymectomie, avec une tolérance d'une différence de 2 ans pour l'âge au recrutement et de 3 mois pour l'âge à la thymectomie puisque l'âge auquel est réalisé le geste chirurgical pourrait avoir une conséquence sur les différentes populations des lymphocytes T.

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du CHU Ste-Justine et tous les parents des sujets ont consenti à l'étude en signant le formulaire d'information et de consentement.

## 2.2 Le déroulement de l'étude

Le médecin-clinicien responsable de la prise en charge du patient contacte directement le patient afin d'expliquer la démarche et la raison d'être de l'étude. Les patients sont inclus dans l'étude après l'obtention d'un consentement écrit de la part des parents.

Les tests immunologiques sont alors faits sur un échantillon de sang (1-3ml selon l'âge de l'enfant) prélevé sur EDTA. Celui-ci est obtenu à l'occasion d'une consultation systématique et d'une ponction veineuse justifiée par le bilan biologique de suivi à long terme des patients après chirurgie cardiaque. Ces prélèvements sont réalisés au centre de prélèvement de l'hôpital Sainte Justine. Ceux-ci sont conservés à la température de la pièce. Chaque échantillon de sang est traité et analysé dans les 24 heures suivant sa réception. Le bilan biologique de suivi comprend le dosage d'albumine et des immunoglobulines IgG, IgA et IgM.

Un formulaire clinique est rempli à l'aide des données cliniques notées au dossier médical du patient. Ces informations comprennent: le type de chirurgie cardiaque, la date de la chirurgie, les anomalies cardiaques rendant nécessaire la chirurgie, les antécédents médicaux, la prise de médicaments, la survenue d'évènements infectieux pendant le suivi et toute autre information clinique pertinente (voir **Annexe**).

## 2.3 L'identification des populations lymphocytaires

### 2.3.1. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux suivants utilisés pour le phénotypage des différentes populations lymphocytaires ont été obtenus soit auprès de la compagnie Becton Dickinson (BD, San Diego, Californie, USA) soit auprès de la compagnie Beckman Coulter (BC, Mississauga, Canada). Voici les anticorps monoclonaux utilisés lors de cette recherche:

- |                                     |                        |                        |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| - anti-CD3-FITC (BD)                | - anti-CD8-APC (BD)    | - anti-CD62L-FITC (BD) |
| - anti-TCR $\alpha/\beta$ -PE (BC)  | - anti-CD45RA-PE (BC)  | - anti-CD27-PE (BC)    |
| - anti-TCR $\gamma/\delta$ -PE (BC) | - anti- CD45RO-PE (BC) | - anti-CD56-PE (BD)    |
| - anti-CD4-APC (BD)                 | - anti-CD31-FITC (BD)  | - anti-CD19-FITC (BD)  |

### 2.3.2. Les sous-populations lymphocytaires

Différents sous-populations lymphocytaires sont spécifiquement étudiées. En voici la liste:

- Lymphocytes T (CD3+),
- Lymphocytes B (CD19+)
- Lymphocytes B mémoires (CD19+CD27+),
- Lymphocytes NK (CD16+CD56+CD3-)
- Lymphocytes T CD4+ et CD8+

- Lymphocytes T CD3+ portant un récepteur T de l'antigène (TCR) de type  $\alpha/\beta$  ou  $\gamma/\delta$
- Lymphocytes T CD4+ et CD8+ naïfs, n'ayant jamais eu de contact avec un antigène (définies comme CD45RA+),
- Lymphocytes T CD4 naïfs thymiques (CD45RA+CD31+). Ces cellules sont définies comme étant des émigrants thymiques et expriment le phénotype suivant : CD45RA+CD31+/CD4+.
- Lymphocytes T CD8+ naïfs (CD45RA+CD62L+)
- Lymphocytes T CD4+ et CD8+ mémoires (CD45RO+).

### 2.3.3. Le marquage par immunofluorescence directe des cellules

Cent (100)  $\mu$ l de sang total sont déposés dans 14 tubes différents et incubés avec les anticorps spécifiques de la population lymphocytaire étudiée pendant 20 minutes dans la glace, à la noirceur. Les globules rouges sont lysés avec 1,5ml de la solution commerciale *FACS lysing* (BD, San Diego, Californie, USA) pendant 5 minutes. Après deux lavages par centrifugation (400g pendant 5 minutes) avec du PBS (*Phosphate buffer saline* : NaCl 0,137M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1x10<sup>-3</sup>M, KCL2,7x10<sup>-3</sup>M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5x10<sup>-3</sup>M) les cellules sont fixées avec de la paraformaldéhyde 0.2% et conservées à 4°C pendant au maximum 24 heures jusqu'à l'acquisition des cellules sur un cytomètre.

### 2.3.4 L'acquisition et l'analyse des cellules à l'aide du cytomètre

Les lymphocytes sont acquis sur un cytomètre de flux *FACSCanto* (BD, San Diego, Californie, USA), selon une région d'acquisition qui permettra l'analyse de au moins 5000 lymphocytes ou de 2000 lymphocytes CD4 ou CD8. Les cellules sont analysées avec le logiciel DIVA (BD, San Diego, Californie, USA). La région des lymphocytes est délimitée sur le graphique visualisant la taille en fonction de la granulosité (Dot Plot FSC/SSC). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de la population totale de lymphocytes ou de la population ciblée CD4+ (région d'analyse déterminée sur le *dot plot* FSC/CD4) ou CD8+ (région d'analyse déterminée sur le *dot plot* FSC/CD8). Les résultats obtenus sont interprétés selon les normes établies en fonction de l'âge, normes décrites dans la littérature et établies dans le laboratoire d'immunologie du CHU Sainte Justine, sous la responsabilité de Dr Françoise Le Deist.

## 2.4. Les autres paramètres biologiques

Les autres paramètres biologiques nécessaires au suivi clinique des patients sont été évalués au même moment que l'évaluation immunologique. Ces autres données biologiques comprennent le dosage des immunoglobulines G, A et M de même que l'albumine sérique. Les immunoglobulines sont mesurées par néphélométrie et l'albumine par turbidimétrie.



## **2.5. L'étude statistique**

L'analyse descriptive de notre étude emploie les médianes avec les valeurs minimales (min) et maximales (max) pour chacune des variables étudiées. Des tests non paramétriques sont employés afin de comparer les deux groupes (groupe Fontan et groupe contrôle). Les résultats de l'analyse sont soumis au test de Mann Whitney comme test non-paramétrique. Le seuil de signification des comparaisons est un  $p < 0,05$ . Le logiciel de statistiques SAS (version 9.1) a été utilisé pour la gestion des données et les analyses statistiques.

---

## CHAPITRE III. L'ANALYSE DES RÉSULTATS

# Chapitre III : L'analyse des résultats

## 3.1. Le recrutement et l'analyse des dossiers

Le recrutement des patients a été effectué entre septembre 2009 et mai 2012, au CHU Sainte-Justine de Montréal. Quarante patients ayant eu une chirurgie de Fontan étaient suivis à l'hôpital lors de cette période. En tout, 19 patients ayant subi une chirurgie cardiaque de type Fontan ont été inclus dans cette étude et codés séquentiellement "fn" où n est le numéro d'inclusion (f1 à 19). Tous les patients approchés ont accepté de participer à cette recherche. Aucun patient n'a été exclu. Dans le groupe contrôle, 6 individus (c1 à 6) ayant subi une chirurgie cardiaque autre que Fontan ont été recrutés. Pour ce groupe, plus de la moitié des patients contactés ont refusé de participer à l'étude. L'analyse des dossiers médicaux a été possible chez tous les patients du groupe Fontan et du groupe contrôle.

### 3.1.1. Le groupe Fontan

#### 3.1.1.1. Caractéristiques cliniques

Le groupe de 19 patients "Fontan" est constitué de 6 filles (32%) et de 13 garçons (68%). Au recrutement, la médiane de l'âge des patients est de 12 ans. Le plus jeune patient est âgé de 7 ans, le plus vieux, de 19 ans. L'âge médian à lequel était effectué la thymectomie dans ce groupe est de 9 mois. La thymectomie la plus précoce dans ce groupe a été réalisée à 3 semaines de vie et la plus tardive à l'âge

de 6 1/2 ans. Le temps d'observation médian de cette cohorte depuis la chirurgie est de 10.7 ans.

Différentes anomalies cardiaques justifiaient l'intervention de type Fontan. En effet, chez un même patient, plus d'une anomalie cardiaque ont été trouvées rendant l'acte chirurgical nécessaire. Les anomalies les plus fréquemment identifiées sont la sténose de l'artère pulmonaire (63% des patients Fontan), l'atrésie tricuspидienne (53%), communication inter-ventriculaire (58%) et la présence d'un ventricule hypoplasique (42%). D'autres anomalies sont aussi rencontrées mais moins fréquentes: transposition des gros vaisseaux (26%), présence d'un canal atrio-ventriculaire complet (21%), communication inter-auriculaire (37%), ventricule droit à double issue (21%), ventricule unique (11%), interruption de l'arc aortique (11%), hypoplasie de l'artère pulmonaire (11%), oreillette unique (5%), aorte hypoplasique (5%), atrésie mitrale (5%) et insuffisance tricuspидienne (5%).

Les infections documentées au dossier ont aussi été recensées. Ont été décelées: des infections des voies respiratoires supérieures (58% des patients), des otites (58%) et des gastroentérites (37%). À une moindre fréquence, ont été inscrites aussi au dossier médical: des infections des voies respiratoires inférieures (bronchiolites, pneumonies et bronchites) chez 3% des patients du groupe Fontan, un syndrome grippal (16%), des conjonctivites infectieuses (11%) et des cellulites/infections de plaies (16%). Un patient (f8) a souffert d'un sepsis sévère avec bactériémie à *escherichia Coli* et a nécessité une hospitalisation prolongée aux soins intensifs avec antibiothérapie intraveineuse à large spectre. Un autre patient (f18) a été traité pour

une bactériémie prolongée à *staphylococcus aureus* dans un contexte post-opératoire. Finalement, le patient f16 a souffert d'une endocardite à *lactobacillus* pour laquelle une antibiothérapie intraveineuse a été instaurée pour 8 semaines. Les caractéristiques démographiques et cliniques se retrouvent au **Tableau I**.

Un doute a été émis chez deux patients quant à la survenue d'une entéropathie exsudative. Ce diagnostic aurait été suspecté chez le premier patient (f4) lors d'une perte de poids associée à de la diarrhée. Le taux d'albumine aurait chuté jusqu'à 25 g/L (normale 35-50 g/L) et on note au dossier une augmentation de l'alpha-1 antitrypsine dans les selles. Ceci est survenu 2 mois après la chirurgie de Fontan. Aucune biopsie digestive n'a été réalisée. Au moment du recrutement, le patient est âgé de 17 ans et son albumine est à 32 g/L. Il ne semble pas que la recherche de l'alpha-1 antitrypsine ait été à nouveau dosée dans les selles. En ce qui a trait au second patient (f11), une entéropathie exsudative "subclinique" a été inscrite à son dossier sur la base d'une albumine abaissée (23 g/L). L'état nutritionnel exact du patient n'est pas connu. Le patient n'avait aucun signe clinique compatible avec une entéropathie. L'albumine s'est graduellement normalisée sur une période de 4 mois sans traitement apparent. Au moment du recrutement cette condition s'était cliniquement et biologiquement résolue chez les deux patients.

Des 19 dossiers consultés chez le groupe Fontan, il a été possible d'examiner le rapport de pathologie de thymectomie chez 14 d'entre eux. Dans tous les cas, il est question de fragments thymiques montrant un cortex bien développé. Aucune lésion macroscopique ou microscopique n'a été documentée.

**Tableau I. Données démographiques et cliniques des patients du groupe « Fontan ».**

		FONTAN (n=19)
Sexe n (%)	Femmes Hommes	6(32) 13 (68)
Âge médiane (min-max)	Au recrutement (ans)	12 (7 - 19)
	A la thymectomie (mois)	9 (0.75 - 78)
	Intervalle thymectomie-recrutement (ans)	10.7 (6 - 16.9)
Pathologie cardiaque, n (%)	Ventricule hypoplasique	8 (42)
	Canal atrio-ventriculaire complet	4 (21)
	Hypoplasie de l'artère pulmonaire	2 (11)
	Communication inter-ventriculaire	11 (58)
	Dextrocardie	2 (11)
	Sténose pulmonaire	12 (63)
	Atrésie tricuspидienne	10 (53)
	Communication inter-auriculaire	7 (37)
	Interruption arc aortique	2 (11)
	Ventricule unique	2 (11)
	Oreillette unique	1 (5)
	Ventricule droit double issue	4 (21)
	Aorte hypoplasique	1 (5)
	Transposition des gros vaisseaux	5 (26)
	Insuffisance tricuspидienne	1 (5)
Atrésie mitrale	1 (5)	
Infection, n (%)	Médiastinite	3 (16)
	Muguet	1 (5)
	Otite	11 (58)
	Infection des voies respiratoires inférieures	6 (31)
	Infection des voies respiratoires supérieures	11 (58)
	Grippe (influenza)	3 (16)
	Infection urinaire	2 (11)
	Gastro-entérite	7 (37)
	Conjonctivite	2 (11)
	Ostéomyélite	1 (5)
	Colite à clostridium difficile	1 (5)
	Mononucléose	1 (5)
	Septicémie	3 (16)
	Cellulite/ infection de plaie	3 (16)
	Endocardite	1 (5)

### 3.1.1.2. Caractéristiques biologiques et immunologiques

Les valeurs d'albumine, d'immunoglobulines et de sous-populations lymphocytaires varient avec l'âge. Les patients Fontan ont été divisés en 2 groupes (6-12 ans et 13-19 ans) afin de comparer les résultats obtenus les valeurs normales publiées en fonction de l'âge pour chacune des variables biologiques. Ces données sont consignées au **Tableau II**.

#### Groupe Fontan 6-12 ans

Le groupe Fontan âgé de 6 à 12 ans comprend 11 patients. La médiane d'albumine est de 41 g/L (valeur minimale (min.) = 35 g/L, valeur maximale (max.) = 44 g/L). Concernant le dosage des immunoglobulines, la médiane de l'IgG est 7.56 g/L (min. = 5.81 g/L, max. = 19.3 g/L), de l'IgA 1.12 g/L (min. = 0.3 g/L, max. = 2.1 g/L) et de l'IgM 0.6 g/L (min. = 0.36 g/L, max. = 1.32 g/L).

L'étude des populations lymphocytaires révèle des lymphocytes totaux à une valeur médiane de 1500 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 900 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 3400 cellules/mm<sup>3</sup>). La valeur médiane des lymphocytes CD3<sup>+</sup> est de 896 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 437 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 1574 cellules/mm<sup>3</sup>). Le pourcentage médian de lymphocytes T exprimant un récepteur TCR  $\alpha/\beta$  est de 94% (min. 88%, max. 98%). Le pourcentage médian de lymphocytes T exprimant un récepteur TCR  $\gamma/\delta$  est de 5% (min. 1.7%, max. 12%).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont au nombre médian de 532 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 200 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 1190 cellules/mm<sup>3</sup>). Parmi ceux-ci le pourcentage médian est de 43% de lymphocytes naïfs CD45RA<sup>+</sup> (min. 30%, max. 61%) et de 81% de

lymphocytes mémoires CD45RO+ (min. 57.6%, max. 90%). Les émigrants thymiques CD45RA+CD31+ représentent en valeur médiane 14.5% des lymphocytes CD4 totaux (min. 6%, max. 38%).

Les lymphocytes T CD8+ sont au nombre médian de 589 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 153 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 1122 cellules/mm<sup>3</sup>). Parmi ceux-ci la valeur médiane est de 89% de lymphocytes naïfs CD45RA+ (min. 70%, max. 95%) et de 62% de lymphocytes mémoires CD45RO+ (min. 32%, max. 68%). Les lymphocytes T CD8+CD45RA+CD62L+ représentent en valeur médiane 25% des lymphocytes CD8 totaux (min. 9%, max. 40.1%).

Le nombre médian de lymphocytes B est de 285 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 198 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 963 cellules/mm<sup>3</sup>). Le pourcentage médian de lymphocytes B mémoires est de 9.5% (min. 3%, max. 17%). Le nombre médian de lymphocytes NK est de 210 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 112 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 405 cellules/mm<sup>3</sup>).

#### Groupe Fontan 13-19 ans

Le groupe Fontan âgé de 13 à 19 ans comprend 8 patients. La valeur médiane d'albumine est de 42 g/L (min.= 27 g/L, max. = 47 g/L). Le dosage des immunoglobulines révèle une médiane pour l'IgG de 8.36 g/L (min. = 5.08 g/L, max. = 10.4 g/L), de l'IgA 1.315 g/L (min. = 0.68 g/L, max. = 2.69 g/L) et de l'IgM 0.595 g/L (min. = 0.46 g/L, max. = 1.11 g/L).

Le total des lymphocytes se situe au nombre médian de 1450 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 700 cellules/mm<sup>3</sup>, max. =1800 cellules/mm<sup>3</sup>). Les lymphocytes CD3+ ont une valeur médiane de 808.5 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 364 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 998 cellules/mm<sup>3</sup>).



Le pourcentage médian de lymphocytes T exprimant un récepteur TCR  $\alpha/\beta$  est de 98% (min. 95%, max. 99.8%). Le pourcentage médian de lymphocytes T exprimant un récepteur TCR  $\gamma/\delta$  est de 1.5% (min. 0.2%, max. 3.3%). Les lymphocytes T CD4+ sont au nombre médian de 512.5 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 266 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 768 cellules/mm<sup>3</sup>). Parmi ceux-ci le pourcentage médian est de 34% de lymphocytes naïfs CD45RA+ (min. 24.2%, max. 55%) et de 80.6% de lymphocytes mémoires CD45RO+ (min. 61%, max. 97%). Les lymphocytes naïfs thymiques CD45RA+CD31+ représentent 13.3% des lymphocytes CD4 totaux (min. 2%, max. 33%).

Les lymphocytes T CD8+ sont au nombre médian de 294.7 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 161 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 416 cellules/mm<sup>3</sup>). Parmi ceux-ci, le pourcentage médian est de 86% de lymphocytes naïfs CD45RA+ (min. 77%, max. 89.6%) et de 71.5% de lymphocytes mémoires CD45RO+ (min. 44%, max. 91%). Les lymphocytes T CD8+CD45RA+CD62L représentent en valeur médiane 16% des lymphocytes CD8 totaux (min. 13%, max. 40%).

Le nombre médian de lymphocytes B est de 285.5 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 200 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 486 cellules/mm<sup>3</sup>). Le pourcentage de lymphocytes B mémoire est de 8.55% (min. 2%, max. 11.2%). Le nombre médian de lymphocytes NK est de 154.4 cellules/mm<sup>3</sup> (min. = 56 cellules/mm<sup>3</sup>, max. = 267 cellules/mm<sup>3</sup>).

#### Les valeurs normales et anormales

Le dosage médian de l'albumine, de l'IgA et de l'IgG est normal chez 17 patients (89%) du groupe Fontan. Le dosage de l'IgM est normal chez 18 (95%) d'entre eux. En ce qui se rapporte aux sous-populations lymphocytaires, des valeurs anormales

apparaissent chez tous les patients pour les émigrants thymiques (CD45RA+CD31+/CD4+), les lymphocytes T CD4+ mémoires (CD45RO+/CD4+) et les lymphocytes T CD8+ mémoires (CD45RO+/CD8+). Une lymphopénie T globale (CD3+) se révèle chez 16 patients (84%). Les lymphocytes CD4+ sont abaissés chez 12 patients (63%) tandis que les lymphocytes T CD8+ le sont chez 7 patients (37%). Les lymphocytes CD8+ naïfs exprimant le CD62L sont anormalement bas chez 15 patients (79%). Les valeurs normales et anormales pour les autres populations lymphocytaires à l'étude sont consignées au **Tableau III**.

Plus spécifiquement, il a été possible de quantifier le nombre de patients qui cumulent des variables anormales sur les sous-populations T. Six types de sous-populations T ont été retenues: les lymphocytes CD4+ et CD8+, les lymphocytes T mémoires (CD45RO+) CD4+ et CD8+, les émigrants thymiques (CD45RA+CD31+/CD4+) et les lymphocytes T CD8+ naïfs portant le CD62L.

Trois patients présentent des valeurs anormales pour ces 6 sous-populations. La majorité des patients (10) ont des valeurs anormales pour 5 des 6 sous-populations retenues. Ces données sont exprimées sur la **Figure 8** (page 81). Pour les 10 patients avec 5 sous-populations anormales, on retrouve chez 6 d'entre eux les valeurs anormales suivantes: CD4+ bas, CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé, CD45RA+CD62L+/CD8+ bas et CD45RO+/CD8+ élevé. Deux patients ont les valeurs anormales suivantes: CD8+ bas, CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé, CD45RA+CD62L+/CD8+ bas et CD45RO+/CD8+ élevé. Finalement les deux autres patients avec 5 sous-populations anormales détiennent des valeurs altérées pour les variables suivantes: CD4+ bas,

CD8+ bas, CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé, et CD45RO+/CD8+ élevé.

Parmi les patients Fontan, 5 cumulent 4 populations anormales. Pour 4 de ces patients, les valeurs anormales sont notées chez les populations suivantes: CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé, CD45RA+CD62L+/CD8+ bas et CD45RO+/CD8+ élevé. On détecte chez le dernier patient de ce sous-groupe des valeurs anormales pour les sous-populations suivantes: CD4+ bas, CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé et CD45RO+/CD8+ élevé.

**Tableau II. Données biologiques des patients du groupe « Fontan ».**

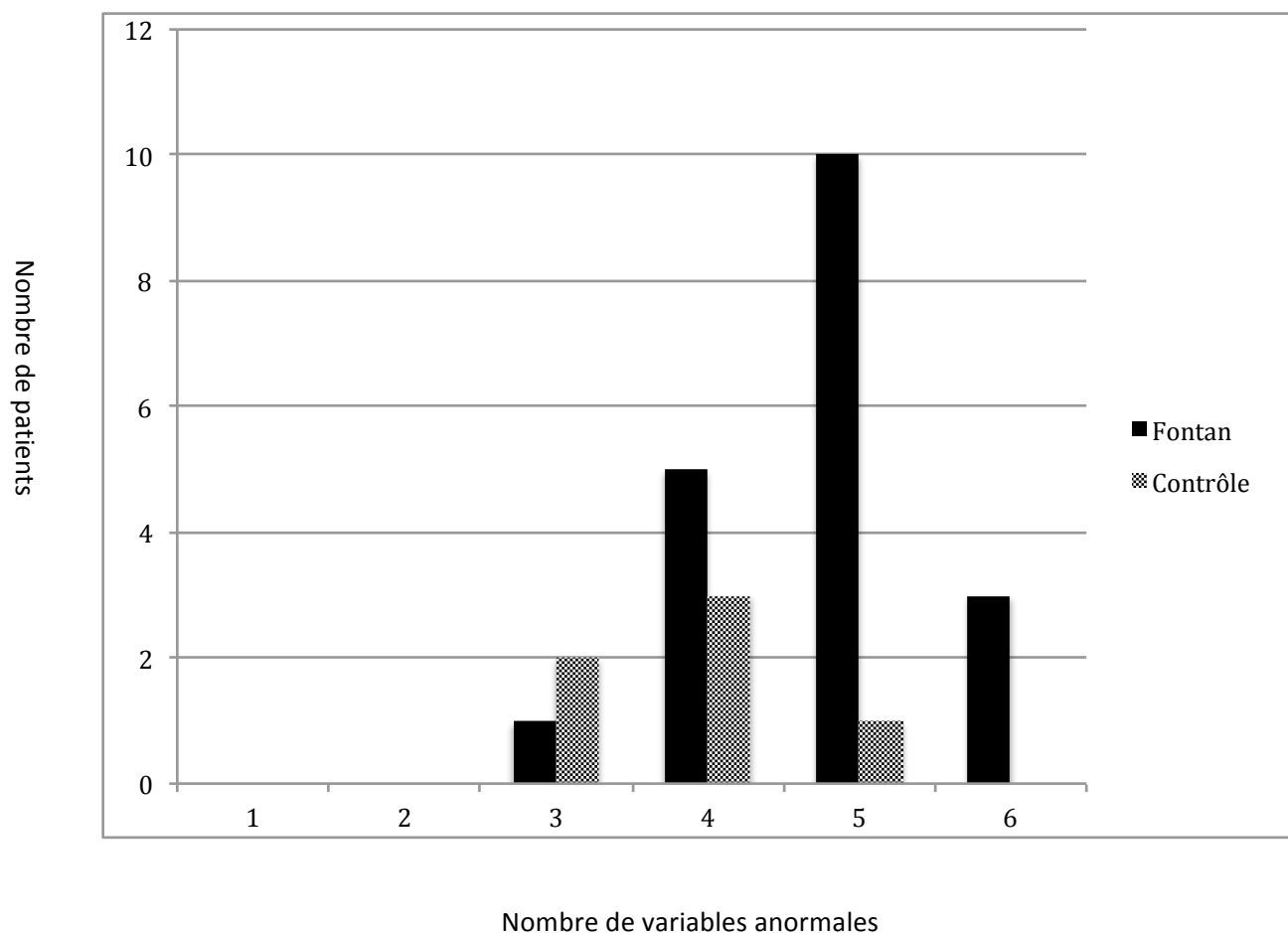
Groupe d'âge	6-12 ans		13-19 ans	
	Patients (n=11) médiane (range)	Normales <sup>1</sup>	patients (n=8) médiane (range)	Normales <sup>1</sup>
Albumine, g/L	41 (35-44)	35-50	42 (27- 47)	35-50
IgA, g/L	1.12 (0.3- 2.1)	0.5 - 3.2	1.315 (0.68- 2.69)	0.5 - 3.2
IgG, g/L	7.56 (5.81- 19.3)	6.5 - 16	8.36 (5.08- 10.4)	6.5 - 16
IgM, g/L	0.6 (0.36- 1.32)	0.4 - 2.2	0.595 (0.46- 1.11)	0.4 - 2.2
Lymphocytes /mm3	1500 (900- 3400)	1900-3700	1450 (700- 1800)	1400-3300
CD3+ /mm3	896 (437- 1574)	1200-2600	808.5 (364- 997.9)	1000-2200
TCR $\alpha/\beta$ /CD3+ %	94 (88- 98)	89-96	98 (95- 99.8)	95-97
TCR $\gamma/\delta$ /CD3 %	5 (1.7- 12)	4.2-11.35	1.5 (0.2- 3.3)	3.2-4.5
CD4+ /mm3	532 (200- 1190)	650-1500	512.5 (266- 768.4)	530-1300
CD45RA+/CD4 + %	43 (30- 61)	46-77	34 (24.2- 55)	33-66
CD45RA+CD31/CD4+ %	14.5 (6- 38)	47-60	13.3 (2- 33)	35-55
CD45RO+/CD4 + %	81 (57.6- 90)	13-30	80.6 (61- 97)	18-38
CD8+/mm3	589 (153- 1122)	370-1100	294.7 (161-416)	330-920
CD45RA+/CD8+ %	89 (70- 95)	63-92	86 (77- 89.6)	61-91
CD45RA+CD62L+/CD8+ %	25 (9- 40.1)	39-73	16 (13- 40)	42-73
CD45 RO+/CD8 + %	62 (32- 86)	4.1-21	71.5 (44- 91)	4.0-23
CD19+ /mm3	285 (198- 963)	270-860	285.5 (200- 486)	110-570
CD27+/CD19+ %	9.5 (3- 17)	12.1-25	8.55 (2- 11.2)	11-32
CD3-CD16+CD56+ /mm3	210 (112- 405)	100-480	154.4 (56- 266.9)	70-480

<sup>1</sup> Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs minimale et maximale pour une variable donnée dans le groupe étudié. Les valeurs de référence pour l'albumine, les immunoglobulines G-A-M et les sous-populations lymphocytaires sont celles utilisées à l'hôpital Ste-Justine et représentent les 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles pour le groupe d'âge étudié.

**Tableau III. Variables normales et anormales pour les groupes "Fontan" et "Contrôle"**

Groupe	Fontan (n=19)		Contrôle (n=6)	
	Normal (%)	Anormal (%)	Normal (%)	Anormal (%)
Albumine, g/L	17 (89)	2 (11)	6 (100)	0 (0)
IgA, g/L	17 (89)	2 (11)	6 (100)	0 (0)
IgG, g/L	17 (89)	2 (11)	6 (100)	0 (0)
IgM, g/L	18 (95)	1 (5)	5 (83)	1 (17)
Lymphocytes /mm3	9 (47)	10 (53)	5 (83)	1 (17)
CD3+ /mm3	3 (16)	16 (84)	4 (67)	2 (33)
<i>TCR α/β/CD3+ %</i>	18 (95)	1 (5)	1 (17)	5 (83)
<i>TCR γ/δ/CD3 %</i>	8 (42)	11 (58)	5 (83)	1 (17)
CD4+ /mm3	7 (37)	12 (63)	5 (83)	1 (17)
<i>CD45RA+/CD4+ %</i>	9 (47)	10 (53)	5 (83)	1 (17)
<i>CD45RA+CD31/CD4+ %</i>	0 (0)	19 (100)	0 (0)	6 (100)
<i>CD45RO+/CD4+ %</i>	0 (0)	19 (100)	0 (0)	6 (100)
CD8+ /mm3	12 (63)	7 (37)	5 (83)	1 (17)
<i>CD45RA+/CD8+ %</i>	17 (89)	2 (11)	3 (50)	3 (50)
<i>CD45RA+CD62L+/CD8+ %</i>	4 (21)	15 (79)	3 (50)	3 (50)
<i>CD45 RO+/CD8+ %</i>	0 (0)	19 (100)	0 (0)	6 (100)
CD19+ /mm3	15 (79)	4 (21)	6 (100)	0 (0)
<i>CD27+/CD19+ %</i>	6 (32)	13 (68)	4 (67)	2 (33)
CD3-CD16+CD56+ /mm3	18 (95)	1 (5)	6 (100)	0 (0)

**Figure 8. Patients "Fontan" et patients "contrôle" en fonction du nombre de variables anormales (sous-population T)**



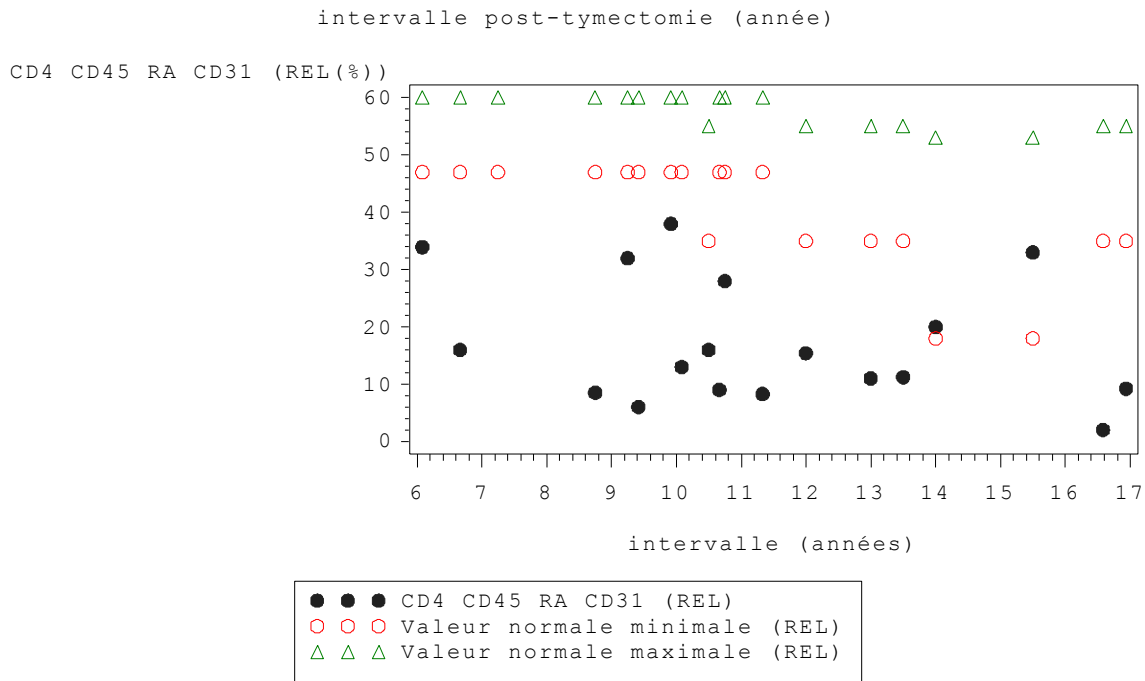
**Les 6 variables étudiées sur la sous-population T:**

- CD4+/mm3
- CD45RA+CD31/CD4+ %
- CD45RO+/CD4+ %
- CD8+/mm3
- CD45RA+CD62L+/CD8+ %
- CD45 RO+/CD8+ %

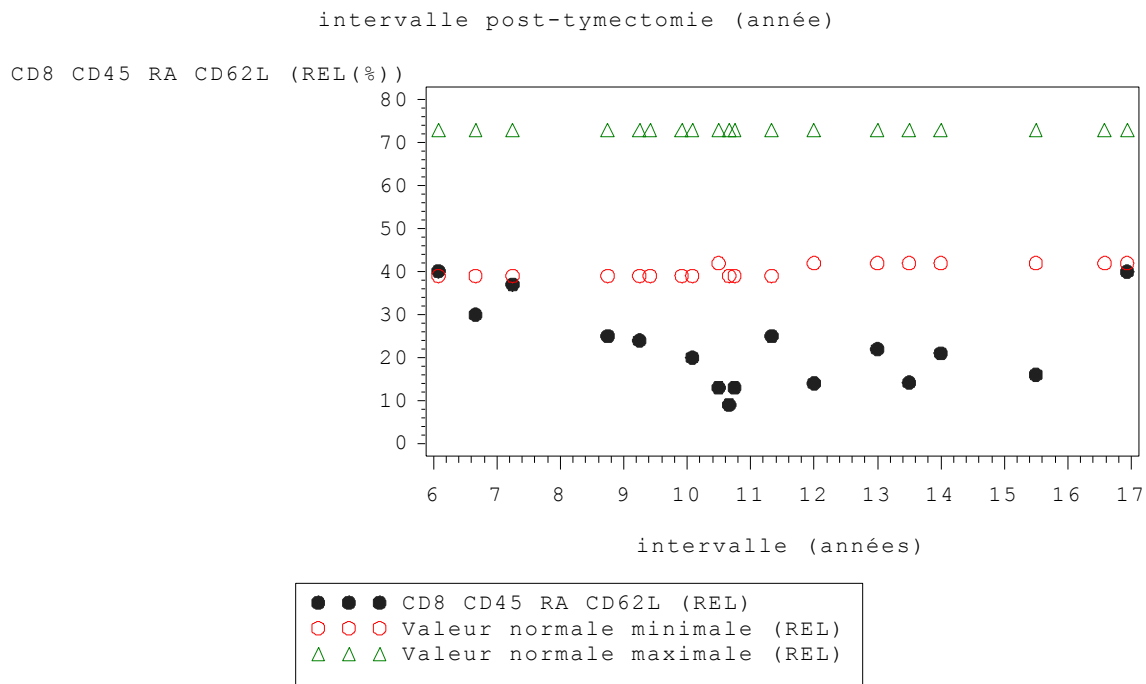
### Évolution des populations lymphocytaires dans le temps

Les **Figures 9, 10, 11 et 12** portent sur les valeurs des populations naïves (CD45RA+CD31+/CD4+ et CD45RA+CD62L+/CD8+) et des populations mémoires (CD4+CD45RO+ et CD8+CD45RO+) pour chaque patient Fontan. Ces valeurs ont été distribuées en fonction du temps écoulé depuis la thymectomie. Il a été constaté que les anomalies lymphocytaires citées précédemment ne semblent pas avoir été corrigées même au delà de 6 ans après la thymectomie.

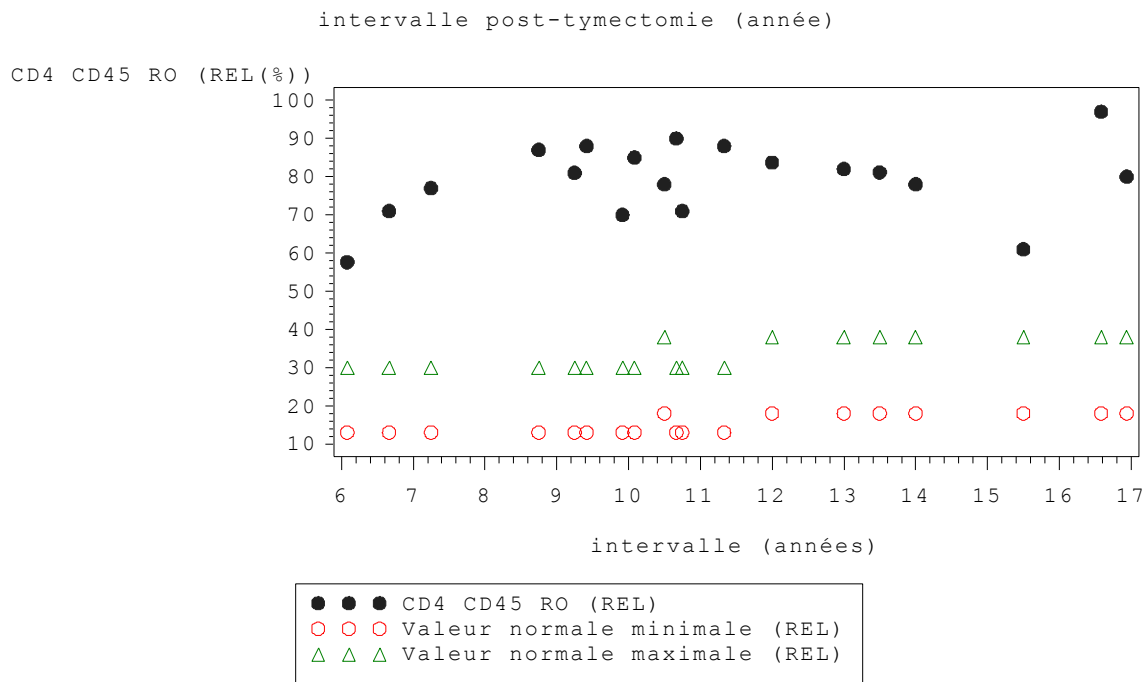
**Figure 9. Valeur relative des émigrants thymiques chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement**



**Figure 10. Valeur relative des lymphocytes CD8+ naïfs CD62L+ chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement**

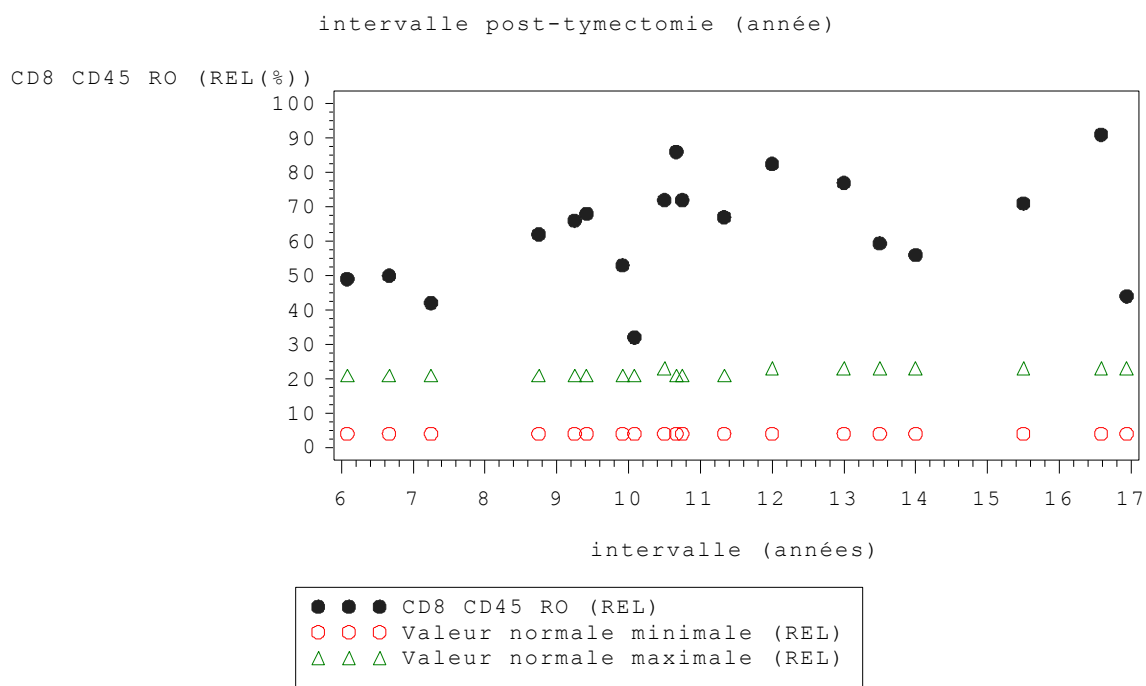


**Figure 11. Valeur relative des lymphocytes CD4+ mémoires chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement**





**Figure 12. Valeur relative des lymphocytes CD8+ mémoires chez les patients Fontan en fonction de l'intervalle de temps thymectomie-âge au recrutement**



### 3.1.2. Le groupe "contrôle"

#### 3.1.2.1. Les caractéristiques cliniques

Ce groupe de patients recrutés comprend 5 garçons (83%) et 1 fille (17%). L'âge médian au recrutement est de 13 ans. Deux patients sont âgés de 18 ans. Le plus jeune patient est âgé de 8 ans. L'âge médian durant lequel la thymectomie a été réalisée est de 15.5 mois. La thymectomie la plus précoce dans ce groupe a été effectuée à l'âge de 10 mois. La thymectomie la plus tardive est survenue à l'âge de 36 mois. L'intervalle médian de suivi depuis la chirurgie pendant laquelle le thymus a été réséqué est de 11.7 ans.

Sur le plan des anomalies cardiaques présentes chez ces patients, ont été découverts: la présence d'une communication inter-ventriculaire (67%), une sténose de l'artère pulmonaire (67%), un canal atrio-ventriculaire complet (25%), une interruption de l'arc aortique (33%), une insuffisance tricuspидienne (33%) une communication inter-auriculaire (50%), un ventricule droit à double issue (17%) et un foramen ovale perméable (16%).

Les infections consignées au dossier médical sont les suivantes : otites (80%), infections des voies respiratoires supérieures (60%), infection des voies respiratoires inférieures (40%), infection urinaire (20%) et gastroentérite (20%). Les patients de ce groupe n'ont présenté aucune infection grave ayant requis un séjour aux soins intensifs ou l'emploi d'une antibiothérapie prolongée par voie intraveineuse. Les caractéristiques démographiques et cliniques de ce groupe se retrouvent au **Tableau IV**.

**Tableau IV. Données démographiques et cliniques des patients du groupe « contrôle ».**

		contrôle (n=6)
Sexe, n (%)	Femmes Hommes	1 (17) 5 (83)
Âge médiane (min.- max.)	Au recrutement (ans)	13 (8-18)
	A la thymectomie (mois)	15.5 (10-36)
	Intervalle thymectomie-recrutement (ans)	11.7 (7.2-15.8)
Pathologie cardiaque (%)	Canal atrio-ventriculaire complet	3 (25)
	Communication inter-ventriculaire	4 (67)
	Sténose pulmonaire	4 (67)
	Communication inter-auriculaire	3 (50)
	Interruption arc aortique	2 (33)
	Ventricule droit double issue	1 (17)
	Insuffisance tricuspидienne	2 (33)
	Insuffisance aortique	3 (50)
	Foramen ovale perméable	1 (16)
Insuffisance pulmonaire	3 (50)	
Infections (%)	Otite	4(80)
	Infection des voies respiratoires inférieures	2 (40)
	Infection des voies respiratoires supérieures	3 (60)
	Infection urinaire	1 (20)
	Gastro-entérite	1(20)

### 3.1.2.2. Les caractéristiques biologiques et immunologiques

Les patients ont été divisés en 2 groupes suivant l'âge pendant lequel ils ont été soumis à une intervention chirurgicale, tout comme cela a été fait avec les patients de type Fontan. Ces données sont consignées au **Tableau V**.

### Le groupe 6-12 ans

Ce groupe comporte 2 patients. Les lymphocytes totaux sont au nombre médian de 1300 cellules/mm<sup>3</sup> chez le patient c1 et de 3000 cellules/mm<sup>3</sup> chez le patient c5. Les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> sont à 611 cellules/mm<sup>3</sup> chez le premier patient contre 1740 cellules/mm<sup>3</sup> chez le second. Ces lymphocytes expriment pour la plupart le récepteur  $\alpha/\beta$  (83% et 95% respectivement). Le récepteur  $\gamma/\delta$  est retrouvé chez 16% des lymphocytes T chez le patient c1 et chez 6% chez le patient c5.

Le nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> chiffré chez le patient c1 est de 377 cellules/mm<sup>3</sup> et de 990 cellules/mm<sup>3</sup> chez le patient c5 (normal: 650-1500 cellules/mm<sup>3</sup>). Les émigrants thymiques sont cependant fortement abaissés chez les deux patients (14% et 8% ; normal: 47-60%). Les cellules CD45RO<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> représentent quant à elles la majorité des lymphocytes CD4<sup>+</sup> (73% et 74%, normal: 13-30%). Dans la sous-population lymphocytaire CD8<sup>+</sup>, est noté aussi un nombre absolu anormalement élevé de cellules mémoires CD8<sup>+</sup> par rapport à la normale pour l'âge (45% et 62%, normal: 4-21%).

Finalement, il a été trouvé un nombre normal de lymphocytes B (312 et 360 cellules/mm<sup>3</sup>, normal: 270-860 cellules/mm<sup>3</sup>). Les lymphocytes NK sont un peu plus élevés que la valeur normale supérieure (507 et 780 cellules/mm<sup>3</sup>; normal: 100-480 cellules/mm<sup>3</sup>).

### Le groupe 13-19 ans

Ce groupe est constitué de 4 patients. La valeur médiane d'albumine est de 40g/L (min. 38 g/L, max. 46 g/L). Le dosage médian de l'IgG est de 9.09g/L (min. 7.86 g/L, max. 12 g/L), de l'IgA 1.84 g/L (min. 0.9 g/L, max. 2.12 g/L), et de l'IgM 0.775 g/L (min. 0.16 g/L, max. 1.03 g/L).

Les lymphocytes sont au nombre médian de 1750 cellules/mm<sup>3</sup> (min. 1400 cellules/mm<sup>3</sup>, max. 2410 cellules/mm<sup>3</sup>). 1151 lymphocytes T CD3+ ont été dénombrés en valeur médiane absolue. Ceux-ci expriment majoritairement un récepteur  $\alpha/\beta$  (médiane 92.5%; min. 83%, max. 94%). Dans la population CD4+, on note une diminution des CD45RA+CD31+/CD4+ (médiane 21.5%; min. 11%, max. 23%) mais une augmentation marquée du pourcentage de CD45RO+ (médiane 72%; min. 60%, max. 93%). La population CD8+ se caractérise aussi par une augmentation des cellules mémoires (médiane 52%, min. 38%, max. 86%). La population CD45RA+CD62L+/CD8+ est diminuée (médiane: 26%; min. 18%, max. 53%). Le nombre absolu médian de lymphocytes B et NK s'inscrit dans les valeurs normales pour l'âge.

**Tableau V Données biologiques et immunologiques des patients du groupe « contrôle».**

Groupe d'âge	6-12 ans		13-19 ans	
	Patients (n=2)	Normales <sup>1</sup>	patients (n=4)	Normales <sup>1</sup>
Albumine, g/L	40 (40- 40)	35-50	40 (38- 46)	35-50
IgA, g/L	0.59 (0.59- 0.59)	0.5 - 3.2	1.84 (0.9- 2.12)	0.5 - 3.2
IgG, g/L	7.38 (7.38- 7.38)	6.5 - 16	9.09 (7.86- 12)	6.5 - 16
IgM, g/L	0.66 (0.66- 0.66)	0.4 - 2.2	0.775 (0.16- 1.03)	0.4 - 2.2
Lymphocytes /mm <sup>3</sup>	2150 (1300- 3000)	1900-3700	1750 (1400- 2410)	1400-3300
CD3+/mm <sup>3</sup>	1176 (611- 1740)	1200-2600	1151 (812- 1783)	1000-2200
TCR $\alpha/\beta$ /CD3+%	89 (83- 95)	89-96	92.5 (83- 94)	95-97
TCR $\gamma/\delta$ /CD3%	11 (6- 16)	4.2-11.35	11.5 6.5 (4- 17)	3.2-4.5
CD4+/mm <sup>3</sup>	684 (377- 990)	650-1500	665 (560- 1181)	530-1300
CD45RA+/CD4+%	50 (31- 69)	46-77	54 (36- 99)	33-66
CD45RA+CD31/CD4+%	11 (8- 14)	47-60	21.5 (11- 23)	35-55
CD45RO+/CD4+%	73.5 (73- 74)	13-30	72 (60- 93)	18-38
CD8+/mm <sup>3</sup>	565 (260- 870)	370-1100	461 (350- 570)	330-920
CD45RA+/CD8+%	80.5 (67- 94)	63-92	88 (69- 100)	61-91
CD45RA+CD62L+/CD8+%	51 (51- 51)	39-73	26 (18- 53)	42-73
CD45 RO+/CD8+%	53.5 (45- 62)	4.1-21	52 (38- 86)	4.0-23
CD19+/mm <sup>3</sup>	336 (312- 360)	270-860	321 (154- 361)	110-570
CD27+/CD19+%	41.32 (32.4- 50.23)	12.1-25	18 (3- 39)	11-32
CD3-CD16+CD56+/mm <sup>3</sup>	643.5 (507- 780)	100-480	406 (240- 476)	70-480

<sup>1</sup> Les valeurs entre parenthèses représentent les valeurs minimale et maximale pour une variable donnée dans le groupe étudié. Les valeurs de référence pour l'albumine, les immunoglobulines G-A-M et les sous-populations lymphocytaires sont celles utilisées à l'hôpital Ste-Justine et représentent les 10<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> percentiles pour le groupe d'âge étudié.

### Les valeurs normales et anormales

Le dosage de l'albumine, de l'IgA et de l'IgG est normal chez tous les patients du groupe contrôle. Un seul patient de ce groupe possède une valeur d'IgM légèrement en baisse par rapport aux valeurs normales pour son âge (0.16g/L, normales: 0.4-2.2 g/L). Cinq patients sur 6 (83%) sont lymphopéniques. Tous les patients du groupe contrôle expriment des populations anormalement basses pour les émigrants thymiques et anormalement élevées pour les cellules mémoires CD4+ et les cellules mémoires CD8+. Chez 3 patients (50%), il apparaît une diminution des cellules CD8+ naïves et plus particulièrement celles exprimant le CD62L. Ces données sont compilées au **Tableau III**.

La **Figure 8** montre le nombre de patients cumulant des valeurs anormales pour 6 sous-populations lymphocytaires T retenues. Un patient du groupe contrôle cumule 5 populations anormales: CD4+ bas, CD8+ bas, CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé, et CD45RO+/CD8+ élevé. Trois patients possèdent 4 populations anormales (les populations normales sont les CD4+ et CD8+ pour ces 3 patients). Finalement, 2 patients ont 3 populations anormales: CD45RA+CD31+/CD4+ bas, CD45RO+/CD4+ élevé et CD45RO+/CD8+ élevé.

## 3.2. La comparaison entre le groupe Fontan et le groupe contrôle

Six patients du groupe Fontan ont été appariés avec 6 patients du groupe contrôle. Cet appariement a été effectué en fonction de l'âge durant lequel a eu lieu la thymectomie et l'âge au moment du recrutement. Une différence de 2 ans était tolérée pour l'âge au recrutement. Une différence de 3 mois et moins était acceptée en ce qui a trait à l'âge auquel la thymectomie avait lieu. Le **Tableau VI** décrit ces caractéristiques sur lesquelles s'appuie l'appariement des patients.

**Tableau VI. Âge au recrutement et à la thymectomie pour les patients appariés des groupes "Fontan" et "contrôle".**

patients appariées	âge	
	recrutement (ans)	thymectomie (mois)
f3 c20	10 8	7 10
f10 c24	10 10	9 12
f15 c22	15 13	18 19
f16 c25	16 18	36 36
f17 c21	18 18	30 27
f19 c23	12 13	15 12

Une comparaison a été établie entre les différentes sous-populations lymphocytaires formant les deux groupes. L'exercice est de vérifier si les différences notées pour



chaque sous-population lymphocytaire sont le fruit du hasard ou si elles ont une signification statistique. Malheureusement, tel que montré au **Tableau VII**, aucune différence statistique n'a pu être mise en évidence entre les 2 groupes après appariement.

**Tableau VII. Corrélation des différences notées au plan des populations lymphocytaires entre les patients "Fontan" et "contrôle"**

<b>Caractéristiques biologiques</b>	valeur p
<u>Décompte absolu lymphocytes totaux</u>	0.115
<u>Sous-populations lymphocytaires</u>	
Nombre absolu % ( <i>italique</i> )	
CD3+	0.116
<i>TCR α/β/CD3+</i>	0.058
<i>TCR γ/δ/CD3+</i>	0.075
CD4+	0.116
<i>CD4+CD45RA+/CD4+</i>	0.245
<i>CD45RA+CD31/CD4+</i>	0.600
<i>CD45RO+/CD4+</i>	0.600
CD8+	0.917
<i>CD45RA+/CD8+</i>	0.893
<i>CD45RA+CD62L/CD8+</i>	0.068
<i>CD45RO+/CD8+</i>	0.173
CD19+	0.917
<i>CD27+/CD19+</i>	0.173
CD3-16+56+	0.093

Une différence (test de Mann Whitney) est significative si  $p < 0.05$

---

## CHAPITRE IV. DISCUSSION

# Chapitre IV: Discussion

## 4.1 Les patients avec chirurgie de Fontan

### 4.1.1 Le profil clinique

Dix-neuf patients ayant subi une chirurgie de type Fontan ont été recrutés lors de notre étude. Cliniquement, ces patients présentent des infections rencontrées dans la population pédiatrique générale, telles que des otites, des infections des voies respiratoires supérieures et aussi des infections des voies respiratoires inférieures (ex: bronchite). La question n'a été pas été investiguée à savoir si la récurrence de ces infections diffère de la population normale. Trois patients ont présenté une septicémie, 3 patients ont eu des infections de plaie, 1 patient a souffert d'une endocardite et un patient a été diagnostiqué avec une colite à *clostridium difficile*. Ces infections ne sont pas communes chez les enfants sains. Il est difficile de relier ces infections au désordre immunitaire de nos patients puisque la plupart de ces infections décrites sont survenues en contexte post-opératoire. Ces infections doivent donc être considérées comme des complications liées à la chirurgie plutôt que des accidents infectieux survenant au cours d'un possible déficit immunitaire. Ces mêmes infections ont déjà été décrites chez des patients quelques jours après avoir subi une chirurgie de type Fontan<sup>115</sup>.

Il existe une relation claire entre l'état nutritionnel du patient et le risque de développer des infections<sup>116</sup>. Une diète alimentaire inadéquate entraîne un retard de

croissance, des dommages au niveau des muqueuses et donc une susceptibilité accrue aux infections<sup>116</sup>. Un état nutritionnel optimal est nécessaire en contexte préopératoire afin d'optimiser la cicatrisation<sup>117</sup>. Il est connu que les enfants dénutris sont plus à risque d'infections à la suite de leur chirurgie cardiaque<sup>118</sup>. Un facteur indirect de l'état nutritionnel d'un patient est son dosage d'albumine. Cette même étude a d'ailleurs montré qu'une l'hypoalbuminémie modérée (albumine < 30g/L) est fréquente chez les enfants avec cardiopathie congénitale et est associée à un risque d'infections accru après la chirurgie<sup>118</sup>. Le poids et le percentile exact occupé sur la courbe de croissance n'ont pas été collectés lors de notre cueillette de données. Il aurait été intéressant de vérifier si nos patients du groupe Fontan étaient dénutris avant leur chirurgie cardiaque. Ceci aurait pu expliquer en partie l'apparition d'infections sévères en post-opératoire.

Nous pouvons faire l'hypothèse que les patients du groupe Fontan étaient plus à risque d'un mauvais état nutritionnel avant leur opération étant donné la complexité des pathologies cardiaques pour lesquelles ils étaient opérés<sup>119</sup>. Il n'est pas encore bien connu pourquoi les patients ayant une cardiopathie congénitale sont plus à risque de malnutrition<sup>115</sup>. Une étude a montré que le risque infectieux était particulièrement important chez les patients Fontan s'ils avaient un ventricule unique<sup>115</sup>. Cette pathologie cardiaque a été rencontrée chez deux de nos patients. Cependant, pour ceux-ci, aucune infection n'a été directement documentée après leur opération cardiaque.

L'entéropathie exsudative est une complication retrouvée chez 4-24% des patients et est associée à une survie à 5 ans de 46-59%<sup>120</sup>. La présence d'œdèmes périphériques, d'ascite et de diarrhée chronique a été remarquée sur le plan clinique<sup>94</sup>. Le diagnostic d'entéropathie exsudative est confirmé par la mesure de la clearance de l'alpha-1 antitrypsine dans les selles collectées sur 24 heures, en dehors d'une période d'infection gastrique (infection à *helicobacter pylori*, cytomégalovirus ou *clostridium difficile*). Dans les cas d'entéropathie exsudative, l'alpha-1 antitrypsine est élevée<sup>121</sup>. De plus, une baisse de l'albumine sérique (< 35 g/L) constitue un autre critère diagnostique<sup>120</sup>. Cependant, un dosage normal d'albumine n'exclut pas ce diagnostic. En effet, durant une perte chronique d'albumine par le tube digestif, la concentration sérique en albumine est maintenue à des taux normaux par des mécanismes compensatoires qui ralentissent la dégradation de celle-ci<sup>122</sup>. Finalement, la perte digestive en protéines peut être documentée par une scintigraphie avec albumine marquée au technétium 99m<sup>97</sup>. L'entéropathie exsudative a été prouvée chez 1 (f4) de nos 19 patients (5.3%), ce qui est en accord avec la prévalence décrite chez les patients ayant eu recours à la chirurgie de Fontan. Le diagnostic a été confirmé par la mesure de la clearance de l'alpha-1 antitrypsine. Le patient a été traité par corticothérapie et agents diurétiques. Son état s'est amélioré sans qu'il ait besoin d'être de nouveau opéré. Ce patient ne présentait pas de signe d'entéropathie exsudative au moment de son entrée dans notre étude, auquel cas il aurait été exclu de notre recrutement.

Au moment du recrutement 1 seul patient (f2) avait une albumine significativement diminuée (27g/L). La cause de cette baisse est incertaine. Cependant, le patient ne présentait aucune diarrhée chronique ou une quelconque forme d'oedème. C'est sur la base de l'absence de critères cliniques qu'un diagnostic d'entéropathie exsudative n'aurait pas été retenu.

#### 4.1.2 Le profil immunologique

Le groupe Fontan se caractérise par un profil lymphocytaire particulier. Les patients Fontan ne sont généralement pas lymphopéniques. Ceci est en accord avec ce qui est constaté dans la littérature des patients thymectomisés. En effet, tous les patients thymectomisés ne sont pas lymphopéniques<sup>70,73</sup> même s'il a été constaté chez plusieurs d'entre eux une diminution de la valeur absolue et relative des lymphocytes<sup>69-72</sup>. Dans notre groupe, le temps médian entre le recrutement et le moment de la thymectomie est de 10.7 ans. Il n'est pas impossible qu'une lymphopénie globale se soit corrigée avec les années.

La thymectomie, sur le plan fonctionnel, ne semble pas perturber la prolifération lymphocytaire T en réponse aux mitogènes et aux antigènes<sup>70,74,75</sup>. Des tests de prolifération lymphocytaire n'ont donc pas été inclus dans cette recherche.

Au niveau des sous-populations, il a été démontré une baisse des lymphocytes T (CD3+) chez nos patients Fontan mais qui n'est pas significative par rapport aux valeurs de la normale pour l'âge. Plusieurs études<sup>72</sup> ont déjà montré une diminution

des lymphocytes T après une thymectomie mais cette baisse n'est pas rencontrée dans tous les cas où le thymus a été réséqué<sup>123</sup>. Le TCR exprimé par ces lymphocytes est majoritairement  $\alpha/\beta$  dans une proportion se rapprochant des valeurs de la normale. La thymectomie n'est pas reconnue pour faire varier l'expression des lymphocytes avec TCR  $\alpha/\beta$  par rapport aux lymphocytes avec TCR  $\gamma/\delta$ . Un seul article publié par Mancebo et ses collaborateurs auraient mis en évidence une légère diminution de la population T  $\gamma/\delta$  18 mois après la thymectomie<sup>70</sup>.

Les patients Fontan se caractérisent par une sous-population CD4+ diminuée (valeur médiane: 532 cellules/mm<sup>3</sup> chez les 6-12 ans et 512.5 cellules/mm<sup>3</sup> chez le groupe 13-19 ans, tableau 2). Cette baisse semble se faire au dépend du répertoire naïf et affecte plus spécifiquement les émigrants thymiques (14.5% chez les 6-12 ans et 16% chez les 13-19 ans). En valeur relative, le compartiment mémoire est surexprimé. Ces mêmes variations se retrouvent chez les patients thymectomisés en période néonatale dans le cadre d'une chirurgie cardiaque. En effet, tel que décrit précédemment dans la première partie de ce mémoire, le profil lymphocytaire des patients thymectomisés montre une population CD4 (totale et naïve) plus basse que les sujet du même âge non-thymectomisés<sup>32,70,73,77</sup>. Un article récent a aussi montrée une altération significative des CD45RA+CD62L/CD4+<sup>32</sup>. Dans cette dernière étude, Prelog et ses collaborateurs ont étudié les compartiments lymphocytaires chez 101 patients thymectomisés en raison d'une chirurgie cardiaque et les ont comparé à 81 sujets normaux, appariés en fonction de l'âge<sup>32</sup>. Les CD4+ naïfs exprimant le CD62L étaient les plus fortement touchés et ce, peu importe l'âge au recrutement (<12 ans et

>12 ans). Cette population n'a pas été documentée dans notre recherche. Cependant, les CD45RA+CD62L+/CD4+ constituent des cellules naïves proches des émigrants thymiques (CD45RA+CD31+/CD4+)<sup>124</sup>. Il n'est donc pas étonnant de constater que les patients Fontan de cette étude présentent une diminution marquée des émigrants thymiques au sein de leurs lymphocytes.

La thymectomie est reconnue pour abaisser les populations CD4+ et CD8+ quoique cette baisse soit plus accentuée pour les CD4+<sup>69-78</sup>. Des observations similaires se retrouvent au sein de notre groupe Fontan. Chez eux, aucune baisse significative de lymphocytes CD8+ n'a été observée. Ce fait a été constaté chez d'autres patients thymectomisés<sup>70,74</sup>. Il est connu que dans des situations où la capacité de régénération thymique est sous-optimale, la production de lymphocytes CD8+ est maintenue alors que le renouvellement des lymphocytes CD4+ est limité<sup>125</sup>. En effet, il semble exister une origine de lymphocytes CD8+ indépendante du thymus. Les cellules CD8+ matures proviendraient de l'expansion périphérique. Cette expansion périphérique est d'ailleurs reflétée par le phénotype mémoire (CD45RO+) prédominant post-thymectomie chez nos patients Fontan. Un article datant de 2002 fait mention d'un décompte lymphocytaire CD4+ très bas chez des patients ayant souffert d'une entéropathie exsudative après chirurgie de Fontan<sup>97</sup>. Cette baisse était statistiquement plus marquée que des patients post chirurgie Fontan sans cette complication. Cette baisse soutenue serait expliquée par une perte sélective des CD4+ via le système lymphatique digestif. Au moment du recrutement, aucun patient ne présentait une entéropathie exsudative, ce qui explique en partie pourquoi les taux



de lymphocytes CD4+ ne sont pas aussi bas que ceux décrits chez des patients Fontan avec spoliation digestive en protéines.

En pourcentage, il a été dénombré une représentation adéquate des lymphocytes CD8+ naïfs (CD45RA+). Cependant, un sous-groupe de cellules naïves exprimant le CD62L est fortement sous les valeurs normales pour l'âge. La littérature scientifique fournit peu d'informations sur les lymphocytes CD45RA+CD62L+/CD8+. Le CD62L, aussi appelé L-sélectine, permet aux lymphocytes de migrer vers les ganglions. Il est exprimé par les lymphocytes naïfs (CD4+ et CD8+) mais aussi par un type particulier de cellules mémoires, les cellules mémoires centrales (CD45RO+CD62L+). Il est difficile d'émettre des hypothèses pouvant expliquer la baisse marquée de cette population lymphocytaire chez les patients Fontan. Il se pourrait que cela ne s'explique que par la thymectomie et non pas par ce type de chirurgie cardiaque. D'ailleurs, les patients « contrôle » présentent les mêmes perturbations au niveau des CD45RA+CD62L+/CD8+. Toutefois, il faut rester prudent étant donné le petit nombre de patients dans les deux groupes. Encore une fois, notons que cette anomalie n'était pas rencontrée chez tous les patients mais chez une majorité d'entre eux (15 sur 19 patients du groupe Fontan et 3 sur 6 patients du groupe "contrôle").

Les lymphocytes B et NK sont normalement retrouvés chez les patients Fontan. Le sous-groupe mémoire des lymphocytes B semble un peu diminué mais le faible nombre de patients Fontan empêche de se prononcer sur une réduction statistiquement significative de ce sous-groupe. Le développement des lymphocytes B et NK n'implique pas le thymus. Il aurait donc été surprenant de voir leur nombre

diminué après la résection de cet organe.

La plupart des articles cités à des fins de comparaison ne font pas mention du type de chirurgie cardiaque réalisé lors de la thymectomie. Néanmoins, deux articles<sup>70,73</sup> font mention des pathologies cardiaques pour lesquelles les enfants ont été opérés mais la procédure médicale n'y est pas détaillée.

La thymectomie survenant en période néonatale (dans les 3 premiers mois de vie) altère de façon significative les différents types de lymphocytes T<sup>32,70,74,77</sup>. Les travaux de Moretta<sup>67</sup> et Rubenstein<sup>68</sup> montrent que la thymectomie survenant chez des enfants âgés de plus de 6 mois n'aurait aucun effet sur leurs populations lymphocytaires. Les données relevées chez les patients de cette recherche vont à l'encontre de ces publications. Treize patients (68%) du groupe Fontan et les 6 patients du groupe contrôle ont été thymectomisés après l'âge de 6 mois. Chez chacun d'eux apparaissent des altérations marquées des sous-populations lymphocytaires, entre autre une diminution des émigrants thymiques et la présence prépondérante de cellules mémoires CD4+ et CD8+. Ces altérations lymphocytaires persistent même plusieurs années après la thymectomie. Il est à noter que les deux articles ci-haut mentionnés n'avaient pas étudié spécifiquement ces populations. Cependant, se peut-il qu'à long terme, une restauration complète des compartiments lymphocytaires T soit possible chez les patients thymectomisés en très jeune âge? À ce sujet, les travaux de van Gent ses collaborateurs<sup>81</sup> apportent des réponses à cette question.

Dans un article publié récemment, ce groupe des Pays-Bas a étudié les populations

lymphocytaires chez 39 patients thymectomisés en jeune âge lors d'une chirurgie cardiaque. Ceux-ci ont été séparés en 2 groupes, en fonction du temps écoulé entre la thymectomie et le recrutement des patients. Les chercheurs ont constaté que dans les 5 ans qui suivent la thymectomie, le nombre de lymphocyte CD4+ totaux et naïfs et le nombre de lymphocytes CD8+ étaient significativement plus bas chez ces patients que chez les sujets sains appariés selon l'âge. Cependant, les anomalies n'étaient pas présentes chez les patients thymectomisés depuis plus de 5 ans. Une résonance magnétique thoracique a montré la présence de tissu thymique chez ces patients. Les auteurs ont conclu qu'en dépit d'une thymectomie totale, il devait subsister un reliquat thymique capable de se régénérer et ainsi permettre une thymopoïèse suffisante pour une normalisation des populations lymphocytaires T en périphérie. Les quelques patients "Fontan" et "contrôle" de notre étude, pour qui un suivi de plus de 5 ans post-thymectomie était disponible, n'ont pas démontré une normalisation de leurs sous-populations T. Il serait intéressant de vérifier par résonance magnétique la présence d'un résidu thymique chez ces individus. Son absence pourrait alors expliquer la divergence de nos résultats par rapport à la série de van Gent.

## 4.2 Les patients "contrôle"

### 4.2.1 Le profil clinique

Le groupe contrôle a été recruté afin de vérifier si les anomalies lymphocytaires retrouvées au sein des patients Fontan étaient dues à la thymectomie ou à la chirurgie cardiaque elle-même. Le recrutement s'est déroulé en appariant les patients Fontan à des patients ayant subi une chirurgie cardiaque d'un autre type. L'appariement a été réalisé en se basant sur l'âge à la thymectomie et l'âge au recrutement. Ces variables ont été sélectionnées car l'âge à la thymectomie et le temps écoulé après la thymectomie semble jouer un rôle dans les perturbations possibles des populations lymphocytaires.

Les patients du groupe contrôle ont présenté des infections qui sont relativement communes chez des enfants de cet âge. Les infections semblent être moins sévères que les patients Fontan. Ceci s'explique en partie par le fait que les patients opérés par procédure de Fontan ont à la base une cardiopathie congénitale plus sévère que les patients du groupe contrôle. La sévérité des malformations cardiaques joue un rôle sur le risque infectieux. Aucun des patients n'a eu d'entéropathie exsudative. D'ailleurs, cette pathologie digestive, lorsqu'elle survient après une chirurgie cardiaque, semble être notée de façon prépondérante suite à la procédure de Fontan.

### 4.2.2. Le profil immunologique

Du point de vue immunologique, les anomalies retrouvées au cours de cette recherche sont les mêmes décrites chez les patients Fontan, à savoir une diminution du compartiment naïf CD4+ (surtout les émigrants thymiques CD45RA+CD31+), une diminution des lymphocytes CD8+ naïfs exprimant le CD62L et aussi une représentation importante des cellules mémoires (CD45RO+) CD4+ et CD8+. Il est donc possible de lier ces altérations lymphocytaires non pas à la chirurgie cardiaque mais à la thymectomie réalisée à ce moment. D'ailleurs, l'appariement des patients "contrôle" et "Fontan" n'a pas montré de façon statistiquement significative de différences au sein de chaque population lymphocytaire.

Malheureusement, seulement 6 patients du groupe Fontan ont été appariés au groupe "contrôle", le recrutement de ce groupe ayant été difficile. En effet, les deux variables sur lesquelles a été basé le recrutement étaient peut-être trop sévères. Ainsi, si les critères de sélection avaient été plus larges (ex : âge à la thymectomie <6mois vs. >6mois), le recrutement aurait été plus facile. Une taille d'échantillon plus vaste aurait peut-être donné une puissance statistique plus importante et plus significative.

---

# CONCLUSION

# Conclusion

Notre projet de recherche a permis de confirmer les anomalies lymphocytaires propres à la thymectomie, tel que déjà publiées. Il ne semble pas que les patients ayant eu une chirurgie de Fontan développent des anomalies de leur système immunitaire plus prononcées que les patients thymectomisés au cours d'une chirurgie cardiaque non-Fontan. Quelques patients Fontan ont présenté des infections sévères mais qui s'expliquent par un contexte opératoire plus compliqué étant donné la difficulté de cette procédure par rapport à d'autres interventions cardiaques.

Pendant longtemps, il était de mise de penser que la thymectomie réalisée lors d'une chirurgie cardiaque était sans conséquence. De plus en plus, les évidences montrent que la résection de cet organe conduit dans bon nombre de cas à une immunosénescence accélérée. Le retentissement clinique n'est cependant pas bien documenté. Il n'est pas encore possible de savoir si la thymectomie réalisée à d'autres fins (ex : traitement de la myasthénie grave) perturbe de la même façon les sous-populations de lymphocytes T.

Il est certain cependant que les chirurgiens cardiaques, dans la mesure du possible, devraient conserver le maximum de tissu thymique lors de leurs opérations étant donné l'importance capitale du thymus dans le maintien du compartiment lymphocytaire T durant toute la vie.

---

# BIBLIOGRAPHIE



# Bibliographie

1. MILLER, J. F. Immunological function of the thymus. *Lancet* **2**, 748–749 (1961).
2. MILLER, J. F. ROLE OF THE THYMUS IN IMMUNITY. *Br Med J* **2**, 459–464 (1963).
3. Markert, M. L. *et al.* Transplantation of thymus tissue in complete DiGeorge syndrome. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1180–1189 (1999).
4. Markert, M. L. *et al.* Thymus transplantation in complete DiGeorge syndrome: immunologic and safety evaluations in 12 patients. *Blood* **102**, 1121–1130 (2003).
5. Ge, Q. & Zhao, Y. Evolution of thymus organogenesis. *Developmental and Comparative Immunology* (2012).doi:10.1016/j.dci.2012.01.002
6. Gordon, J. & Manley, N. R. Mechanisms of Thymus Organogenesis and Morphogenesis. *Development* **138**, 3865–3878 (2011).
7. Rodewald, H.-R. Thymus organogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 355–388 (2008).
8. Lavini, C. *Thymus Gland Pathology: Clinical, Diagnostic and Therapeutic Features.* (Springer, 2008).
9. Murphy, K. M., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's Immunobiology (Immunobiology: The Immune System.* (Garland Science, 2007).
10. Gill, J. *et al.* Thymic generation and regeneration. *Immunological Reviews* **195**, 28–50 (2003).
11. Zamisch, M. *et al.* Ontogeny and Regulation of IL-7-Expressing Thymic Epithelial Cells. *J Immunol* **174**, 60–67 (2005).
12. Martín-Gayo, E., Sierra-Filardi, E., Corbí, A. L. & Toribio, M. L. Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* **115**, 5366–5375 (2010).
13. Owen, J. J., McLoughlin, D. E., Suniara, R. K. & Jenkinson, E. J. The role of mesenchyme in thymus development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **251**, 133–137 (2000).
14. Suniara, R. K., Jenkinson, E. J. & Owen, J. J. An essential role for thymic mesenchyme in early T cell development. *J. Exp. Med.* **191**, 1051–1056 (2000).
15. Jenkinson, W. E., Jenkinson, E. J. & Anderson, G. Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors. *J. Exp. Med.* **198**, 325–332 (2003).
16. Aw, D. & Palmer, D. B. The origin and implication of thymic involution. *Aging Dis* **2**, 437–443 (2011).
17. Aw, D., Silva, A. B. & Palmer, D. B. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **120**, 435–446 (2007).
18. Aspinall, R. & Andrew, D. Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol* **20**, 250–256 (2000).

19. Bertho, J. M. *et al.* Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. *Cell. Immunol.* **179**, 30–40 (1997).
20. Pujol-Borrell, R., Herrero-Mata, M. J., Palou, E. & Armengol, M. P. Immunological senescence and thymic function in transplantation. *Transplantation* **88**, S8–13 (2009).
21. Mingueneau, M. *et al.* The proline-rich sequence of CD3epsilon controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4+CD8+ thymocytes. *Nat. Immunol.* **9**, 522–532 (2008).
22. Malissen, B. & Malissen, M. Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation. *Current Opinion in Immunology* **8**, 383–393 (1996).
23. Roitt, I. M., Brostoff, J. & Male, D. *Immunologie*. (De Boeck Supérieur, 2002).
24. Douek, D. C. *et al.* Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* **355**, 1875–1881 (2000).
25. Gruver, A. L., Hudson, L. L. & Sempowski, G. D. Immunosenescence of ageing. *J. Pathol* **211**, 144–156 (2007).
26. Cossu, F. Genetics of SCID. *Ital J Pediatr* **36**, 76 (2010).
27. Blackburn, C. C. & Manley, N. R. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol* **4**, 278–289 (2004).
28. Capone, M., Hockett, R. D., Jr & Zlotnik, A. Kinetics of T cell receptor beta, gamma, and delta rearrangements during adult thymic development: T cell receptor rearrangements are present in CD44(+)/CD25(+) Pro-T thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12522–12527 (1998).
29. Capone, M. *et al.* TCR beta and TCR alpha gene enhancers confer tissue- and stage-specificity on V(D)J recombination events. *EMBO J.* **12**, 4335–4346 (1993).
30. Sallusto, F., Lenig, D., Föllmer, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **402**, 34–38 (1999).
31. De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A. & Roederer, M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat. Med* **7**, 245–248 (2001).
32. Prelog, M. *et al.* Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)/CD45RA(+)/CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin. Immunol* **130**, 123–132 (2009).
33. Ferguson, B. V. & Ostergaard, H. L. CD45 regulates thymocyte survival during development in fetal thymic organ culture. *Immunobiology* **215**, 458–465 (2010).
34. Shin, H.-M. *et al.* Characterization of Monoclonal Antibodies against Human Leukocyte Common Antigen (CD45). *Immune Netw* **11**, 114–122 (2011).
35. Jacquot, S. Sous-populations lymphocytaires T immunorégulatrices et pathogénie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *Hépto-Gastro* **5**, 451–7 (1998).
36. Tanaskovic, S., Fernandez, S., Price, P., Lee, S. & French, M. A. CD31 (PECAM-1) is a marker of recent thymic emigrants among CD4+ T-cells, but not CD8+ T-

- cells or gammadelta T-cells, in HIV patients responding to ART. *Immunol. Cell Biol.* **88**, 321–327 (2010).
37. Kohler, S. & Thiel, A. Life after the thymus: CD31+ and CD31- human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* **113**, 769–774 (2009).
  38. Kimmig, S. *et al.* Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J. Exp. Med* **195**, 789–794 (2002).
  39. Junge, S. *et al.* Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol* **37**, 3270–3280 (2007).
  40. Hazenberg, M. D., Verschuren, M. C., Hamann, D., Miedema, F. & Van Dongen, J. J. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J. Mol. Med.* **79**, 631–640 (2001).
  41. Dubey, C., Croft, M. & Swain, S. L. Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *J. Immunol.* **157**, 3280–3289 (1996).
  42. Glimcher, L. H. & Murphy, K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.* **14**, 1693–1711 (2000).
  43. Zhu, J. & Paul, W. E. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol. Rev.* **238**, 247–262 (2010).
  44. Kronenberg, M. & Rudensky, A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* **435**, 598–604 (2005).
  45. Umetsu, D. T., Akbari, O. & Dekruyff, R. H. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol* **112**, 480–487; quiz 488 (2003).
  46. Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. & Murphy, K. M. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**, 677–688 (2006).
  47. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology* **22**, 745–763 (2004).
  48. Tanchot, C., Rosado, M. M., Agenes, F., Freitas, A. A. & Rocha, B. Lymphocyte homeostasis. *Semin. Immunol.* **9**, 331–337 (1997).
  49. Maubourguet, P. *Grand Larousse universel: grand dictionnaire encyclopédique Larousse.* (Larousse, 1991).
  50. Almeida, A. R., Borghans, J. A. & Freitas, A. A. T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J. Exp. Med.* **194**, 591–599 (2001).
  51. Jamieson, B. D. *et al.* Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* **10**, 569–575 (1999).
  52. Douek, D. C. *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* **396**, 690–695 (1998).
  53. Kilpatrick, R. D. *et al.* Homeostasis of the naive CD4+ T cell compartment during aging. *J. Immunol.* **180**, 1499–1507 (2008).

54. Hakim, F. T. *et al.* Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 930–939 (2005).
55. Muraro, P. A. *et al.* Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* **201**, 805–816 (2005).
56. Rossi, D. J., Bryder, D. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cell aging: mechanism and consequence. *Exp. Gerontol.* **42**, 385–390 (2007).
57. BONE MARROW, THYMUS AND BLOOD: CHANGES ACROSS THE LIFESPAN. *Aging health* **5**, 385–393 (2009).
58. Morrhaye, G. *et al.* Impact of growth hormone (GH) deficiency and GH replacement upon thymus function in adult patients. *PLoS ONE* **4**, e5668 (2009).
59. Pazirandeh, A., Jondal, M. & Okret, S. Conditional expression of a glucocorticoid receptor transgene in thymocytes reveals a role for thymic-derived glucocorticoids in thymopoiesis in vivo. *Endocrinology* **146**, 2501–2507 (2005).
60. Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E. & Stockinger, B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat. Immunol.* **3**, 244–250 (2002).
61. Surh, C. D., Boyman, O., Purton, J. F. & Sprent, J. Homeostasis of memory T cells. *Immunol. Rev.* **211**, 154–163 (2006).
62. Sorg, R. V., McLellan, A. D., Hock, B. D., Fearnley, D. B. & Hart, D. N. J. Human Dendritic Cells Express Functional Interleukin-7. *Immunobiology* **198**, 514–526 (1998).
63. Fry, T. J. & Mackall, C. L. Interleukin-7: From Bench to Clinic. *Blood* **99**, 3892–3904 (2002).
64. Kittipatarin, C. & Khaled, A. R. Interlinking interleukin-7. *Cytokine* **39**, 75–83 (2007).
65. Kennedy, M. K. *et al.* Reversible Defects in Natural Killer and Memory Cd8 T Cell Lineages in Interleukin 15–Deficient Mice. *J Exp Med* **191**, 771–780 (2000).
66. Sempowski, G. D. *et al.* Effect of thymectomy on human peripheral blood T cell pools in myasthenia gravis. *The Journal of Immunology* **166**, 2808 (2001).
67. Moretta, L. *et al.* Imbalances in T cell subpopulations associated with immunodeficiency and autoimmune syndromes. *Eur. J. Immunol* **7**, 696–700 (1977).
68. Rubinstein, A., Pelet, B. & Schweizer, V. Immunological decay in thymectomized infants. *Helv Paediatr Acta* **30**, 425–433 (1976).
69. Hauser, G. J., Chan, M. M., Casey, W. F., Midgley, F. M. & Holbrook, P. R. Immune dysfunction in children after corrective surgery for congenital heart disease. *Crit. Care Med* **19**, 874–881 (1991).
70. Mancebo, E. *et al.* Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin. Exp. Immunol* **154**, 375–383 (2008).
71. Torfadottir, H. *et al.* Evidence for extrathymic T cell maturation after thymectomy in infancy. *Clin. Exp. Immunol* **145**, 407–412 (2006).

72. Eysteinsdottir, J. H. *et al.* The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later in life. *Clinical & Experimental Immunology* **136**, 349–355 (2004).
73. Halnon, N. J. *et al.* Thymic Function and Impaired Maintenance of Peripheral T Cell Populations in Children with Congenital Heart Disease and Surgical Thymectomy. *Pediatric Research* **57**, 42–48 (2005).
74. Wells, W. J., Parkman, R., Smogorzewska, E. & Barr, M. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **115**, 1041–1046 (1998).
75. Brearley, S. *et al.* Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clinical and experimental immunology* **70**, 322 (1987).
76. Ogle, B. M. *et al.* Effacing of the T cell compartment by cardiac transplantation in infancy. *J. Immunol* **176**, 1962–1967 (2006).
77. Sauce, D. *et al.* Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3070 (2009).
78. Madhok, A. B. *et al.* Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. *Clinical and Vaccine Immunology* **12**, 563 (2005).
79. Appay, V., Sauce, D. & Prelog, M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *Aging (Albany NY)* **2**, 78–81 (2010).
80. Prelog, M. *et al.* Diminished response to tick-borne encephalitis vaccination in thymectomized children. *Vaccine* **26**, 595–600 (2008).
81. Van Gent, R. *et al.* Long-term restoration of the human T-cell compartment after thymectomy during infancy: a role for thymic regeneration? *Blood* **118**, 627–634 (2011).
82. Stiehm, E. R., Ochs, H. D. & Winkelstein, J. A. *Immunologic disorders in infants and children.* (Elsevier Health Sciences, 2004).
83. Buckley, R. H. Primary cellular immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol* **109**, 747–757 (2002).
84. Cabrera, A. G. *et al.* Preoperative lymphopenia is a predictor of postoperative adverse outcomes in children with congenital heart disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **138**, 1172–1179 (2009).
85. Valentine, V. & Raffin, T. The management of chylothorax. *Chest* **102**, 586–591 (1992).
86. Breaux, J. R. & Marks, C. Chylothorax causing reversible T-cell depletion. *J Trauma* **28**, 705–707 (1988).
87. MILLER, J. F. Immunological function of the thymus. *Lancet* **2**, 748–749 (1961).
88. Orange, J. S., Geha, R. S. & Bonilla, F. A. Acute chylothorax in children: selective retention of memory T cells and natural killer cells. *J. Pediatr* **143**, 243–249 (2003).
89. Stiehm, E. R., Ochs, H. D. & Winkelstein, J. A. *Immunologic disorders in infants and children.* (Elsevier Health Sciences, 2004).
90. Khoruts, A. & Fraser, J. M. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. *Immunology Letters* **98**, 23–31 (2005).

91. Launay, D. *et al.* Entéropathie exsudative révélant une péricardite chronique constrictive idiopathique. *La Revue de Médecine Interne* **28**, 38–41 (2007).
92. Thorne, S. A., Hooper, J., Kemp, M. & Somerville, J. Gastro-intestinal protein loss in late survivors of Fontan surgery and other congenital heart disease. *Eur. Heart J* **19**, 514–520 (1998).
93. Fuss, I. J. *et al.* Intestinal lymphangiectasia, a disease characterized by selective loss of naive CD45RA+ lymphocytes into the gastrointestinal tract. *Eur. J. Immunol* **28**, 4275–4285 (1998).
94. Mertens, L., Hagler, D. J., Sauer, U., Somerville, J. & Gewillig, M. Protein-losing enteropathy after the Fontan operation: an international multicenter study. PLE study group. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **115**, 1063–1073 (1998).
95. Chakrabarti, S., Keeton, B. R., Salmon, A. P. & Vettukattil, J. J. Acquired combined immunodeficiency associated with protein losing enteropathy complicating Fontan operation. *Heart* **89**, 1130–1131 (2003).
96. Braamskamp, M. J. A. M., Dolman, K. M. & Tabbers, M. M. Clinical practice. Protein-losing enteropathy in children. *Eur. J. Pediatr* **169**, 1179–1185 (2010).
97. Cheung, Y. F., Tsang, H. Y. H. & Kwok, J. S. Y. Immunologic profile of patients with protein-losing enteropathy complicating congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* **23**, 587–593 (2002).
98. Müller, C., Wolf, H., Göttlicher, J., Zielinski, C. C. & Eibl, M. M. Cellular immunodeficiency in protein-losing enteropathy. Predominant reduction of CD3+ and CD4+ lymphocytes. *Dig. Dis. Sci* **36**, 116–122 (1991).
99. Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301–314 (1994).
100. Abitorabi, M. A. *et al.* Differential expression of homing molecules on recirculating lymphocytes from sheep gut, peripheral, and lung lymph. *J. Immunol* **156**, 3111–3117 (1996).
101. Yamamoto, H., Tsutsui, T., Mayumi, M. & Kasakura, S. Immunodeficiency associated with selective loss of helper/inducer T cells and hypogammaglobulinaemia in a child with intestinal lymphangiectasia. *Clin. Exp. Immunol* **75**, 196–200 (1989).
102. Garty, B. Z. Deficiency of CD4+ lymphocytes due to intestinal loss after Fontan procedure. *Eur. J. Pediatr* **160**, 58–59 (2001).
103. Fontan, F. & Baudet, E. Surgical repair of tricuspid atresia. *Thorax* **26**, 240–248 (1971).
104. Kanakis, M. A., Petropoulos, A. C. & Mitropoulos, F. A. Fontan operation. *Hellenic J Cardiol* **50**, 133–141 (2009).
105. Mavroudis, C. & Backer, C. *Pediatric Cardiac Surgery, 3e.* (Mosby, 2003).
106. Mainwaring, R. D., Lamberti, J. J. & Hugli, T. E. Complement activation and cytokine generation after modified Fontan procedure. *Ann. Thorac. Surg* **65**, 1715–1720 (1998).
107. Khairy, P. *et al.* Long-term survival, modes of death, and predictors of mortality in patients with Fontan surgery. *Circulation* **117**, 85–92 (2008).

108. Fredenburg, T. B., Johnson, T. R. & Cohen, M. D. The Fontan Procedure: Anatomy, Complications, and Manifestations of Failure. *Radiographics* **31**, 453–463 (2011).
109. Connor, F. L. *et al.* Successful resection of localized intestinal lymphangiectasia post-Fontan: role of (99m)technetium-dextran scintigraphy. *Pediatrics* **112**, e242–247 (2003).
110. Feldt, R. H. *et al.* Protein-losing enteropathy after the Fontan operation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **112**, 672–680 (1996).
111. Lenz, D., Hamsch, J., Schneider, P. & Tárnok, A. Protein-losing enteropathy after fontan surgery: is assessment of risk patients with immunological data possible? *Cytometry B Clin Cytom* **53**, 34–39 (2003).
112. Koch, A., Hofbeck, M., Feistel, H., Buheitel, G. & Singer, H. Circumscribed intestinal protein loss with deficiency in CD4+ lymphocytes after the Fontan procedure. *Eur. J. Pediatr* **158**, 847–850 (1999).
113. Lenz, D. *et al.* Protein-losing enteropathy in patients with Fontan circulation: is it triggered by infection? *Crit Care* **7**, 185–190 (2003).
114. Cheung, Y. F., Leung, M. P. & Yuen, K. Y. Legionella pneumonia and bacteraemia in association with protein-losing enteropathy after Fontan operation. *J. Infect* **42**, 206–207 (2001).
115. Anderson, J. B., Kalkwarf, H. J., Kehl, J. E., Eghtesady, P. & Marino, B. S. Low Weight-for-Age Z-Score and Infection Risk After the Fontan Procedure. *The Annals of Thoracic Surgery* **91**, 1460–1466 (2011).
116. Katona, P. & Katona-Apte, J. The Interaction between Nutrition and Infection. *Clin Infect Dis*. **46**, 1582–1588 (2008).
117. Stechmiller, J. K. Understanding the role of nutrition and wound healing. *Nutr Clin Pract* **25**, 61–68 (2010).
118. Leite, H. P., Fisberg, M., De Carvalho, W. B. & De Camargo Carvalho, A. C. Serum albumin and clinical outcome in pediatric cardiac surgery. *Nutrition* **21**, 553–558 (2005).
119. Mitchell, I. M., Logan, R. W., Pollock, J. C. & Jamieson, M. P. Nutritional status of children with congenital heart disease. *Br Heart J* **73**, 277–283 (1995).
120. Silvilairat, S. *et al.* Protein-losing enteropathy after the Fontan operation: associations and predictors of clinical outcome. *Congenit Heart Dis* **3**, 262–268 (2008).
121. Vignes, S. & Bellanger, J. Primary intestinal lymphangiectasia (Waldmann's disease). *Orphanet J Rare Dis* **3**, 5 (2008).
122. Papadia, C., Sabatino, A. D., Corazza, G. R. & Forbes, A. Diagnosing small bowel malabsorption: a review. *Intern Emerg Med* (2012).doi:10.1007/s11739-012-0877-7
123. Afifi, A., Raja, S. G., Pennington, D. J. & Tsang, V. T. For neonates undergoing cardiac surgery does thymectomy as opposed to thymic preservation have any adverse immunological consequences? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **11**, 287–291 (2010).
124. Poulin, J.-F. *et al.* Direct Evidence for Thymic Function in Adult Humans. *J Exp Med* **190**, 479–486 (1999).

125. Mackall, C. L., Hakim, F. T. & Gress, R. E. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol. Today* **18**, 245–251 (1997).



---

# ANNEXE

# Annexe



**CHU Sainte-Justine**  
Le centre hospitalier  
universitaire mère-enfant  
Pour l'amour des enfants



**Titre du projet**

Caractérisation des lymphopénies post-chirurgies cardiaques de type Fontan et d'autres types.

Date \_\_\_\_\_

**Patient** Numéro du patient \_\_\_\_\_

Age \_\_\_\_ ans

Sexe  Mâle  Femelle



**Chirurgie**

Date de la chirurgie \_\_\_\_\_

Pathologie cardiaque \_\_\_\_\_

Type d'intervention chirurgicale  Fontan  Non Fontan (type \_\_\_\_\_)

Antécédents médicaux \_\_\_\_\_

Médicaments (actuels) \_\_\_\_\_

**Suivi (Depuis la chirurgie) :**

Événement infectieux

Type	Date	Traitement
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Autres symptômes/signes

	Date d'apparition	Commentaire
Diarrhée	_____	_____
Œdème périphérique	_____	_____
Autres (_____)	_____	_____
(_____)	_____	_____

**Commentaire**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nom du collaborateur \_\_\_\_\_

Signature \_\_\_\_\_

Date \_\_\_\_\_

Formulaire