

ANNÉE 2016

N° 041

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 17 octobre 2016

Par Maxime Fournier

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Analyse des lymphopénies T sévères dans une cohorte de patients ayant eu un dépistage néonatal des déficits immunitaires combinés sévères.

Président : Mr Jean-Marie BARD, PUPH – Université de Nantes

Membres du jury : Mme Marie-Christine BENE, PUPH – Université de Nantes

Mme Marie AUDRAIN, PH – CHU de Nantes

Mme Caroline THOMAS, PH – CHU de Nantes

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ma co-direction de thèse, Docteur Marie Audrain et Docteur Caroline Thomas, pour leur confiance, leur encadrement, leurs conseils précieux et leur très grande disponibilité. Ce fut un réel plaisir de travailler sur ce sujet passionnant et de participer à l'histoire de DEPISTREC.

Je remercie profondément les Professeurs Jean-Marie Bard et Marie-Christine Béné d'avoir accepté de consacrer un peu de leur temps à l'évaluation de ce travail.

Je tiens à remercier également mes parents pour m'avoir toujours encouragé et soutenu pendant mes études. Merci pour l'affection et la patience que vous avez en permanence à mon égard.

Merci à mon frère Boris pour avoir été un modèle depuis le début, dans les études comme dans la vie en général.

Merci à mes amis du lycée, de la faculté de Pharmacie de Nantes, de l'internat de Tours et de Nantes pour tout ce que nous avons partagé durant cette vie étudiante passionnante.

Merci enfin à Claire, si précieuse pour tellement de raisons qu'il serait vain de tenter de les énumérer...

Table des matières

1	Liste des figures.....	4
2	Liste des tableaux.....	6
3	Liste des abréviations.....	7
4	Introduction.....	9
5	Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS).....	10
5.1	Définition.....	10
5.2	Classification.....	10
5.3	Épidémiologie.....	12
5.4	Signes cliniques.....	12
5.5	Les principaux types de DICS.....	14
5.5.1	Le déficit en adénosine déaminase.....	14
5.5.2	Le déficit en chaîne gamma commune.....	16
5.5.3	Le déficit en Janus Kinase 3.....	17
5.5.4	Le déficit en chaîne alpha du récepteur à l'IL-7.....	18
5.5.5	Les déficits des gènes <i>RAG</i>	18
5.5.6	Les déficits en protéine Artemis.....	19
5.5.7	Les déficits des chaînes CD3.....	20
5.5.8	Le déficit en CD45.....	20
5.6	La démarche et les outils diagnostiques des DICS.....	21
5.7	Les traitements.....	23
5.7.1	La greffe de cellules souches hématopoïétiques.....	23
5.7.2	La thérapie génique.....	25
5.7.3	Traitement de substitution enzymatique.....	28
5.7.4	Les traitements annexes.....	30
6	Le dépistage néonatal.....	31
6.1	Introduction.....	31
6.2	Les méthodes de dépistage.....	33
6.3	Le dépistage néonatal généralisé des DICS aux Etats-Unis.....	38
6.3.1	Les premières études pilotes.....	38
6.3.2	Les études médico-économiques.....	40
6.3.3	Le bilan.....	42
6.4	Le dépistage néonatal généralisé des DICS en France.....	45

6.4.1	L'organisation du dépistage néonatal en France	45
6.4.2	Les études préliminaires	47
6.4.3	L'étude DEPISTREC	49
7	Objectifs	57
8	Résultats	57
8.1	Analyse des TRECs	57
8.2	Analyse des lymphopénies T	59
8.2.1	Définition d'une lymphopénie T.....	59
8.2.2	Méthodes	59
8.2.3	Détection des DICS typiques, des DICS atténués et du syndrome d'Omenn (n = 1) 60	
8.2.4	Autres causes de lymphopénies T non DICS (n = 41)	61
9	Discussion	70
10	Références bibliographiques.....	75
11	Annexes	80

1 Liste des figures

Figure 1 : Principales anomalies génétiques responsables de SCID et défauts de développement des lymphocytes T, B et NK (Murphy, 2012)	11
Figure 2 : Les fréquences relatives des différents types génétiques de DICS parmi 141 (Buckley, 2000).....	12
Figure 3 : Les profils électrophorétiques de 5 hémolysats colorés pour l'activité ADA sur gel d'amidon (Giblett ER, 1972). Canaux 1 et 5, contrôles normaux, et canaux 3 et 4, pour les parents du cas 1. Le canal 2 a une activité ADA nulle.....	14
Figure 4 : Moyennes +/- SEM des valeurs absolues de lymphocytes à la naissance des enfants atteints d'un DICS, montrant le niveau des lymphopénies dans toutes les formes de DICS (Buckley RH, 2004).	15
Figure 5 : Dessin illustrant la chaîne commune gamma partagée avec de nombreux récepteurs cytokiniques et associée à la protéine JAK-3 (Buckley, 2004).	17
Figure 6 : Le récepteur cellulaire T avec les chaînes CD3 (Murphy, 2012).	20
Figure 7 : Distributions des valeurs absolues des lymphocytes totaux et des lymphocytes CD3 ⁺ à la naissance chez 25 nouveau-nés atteints d'un DICS et 14 nouveau-nés en bonne santé (MMWR, 2004).	22
Figure 8 : Courbe de survie Kaplan-Meier pour 89 patients atteints d'un DICS, qui ont reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (81 % des patients étaient en vie à de l'évaluation la plus récente) (Buckley, 1999).	24
Figure 9 : Courbes de survie Kaplan-Meier des patients atteints d'un DICS transplantés dans le centre médical de l'Université de Duke. A , 46 nourrissons diagnostiqués et traités dans les 3.5 premiers mois de vie. B , 113 nourrissons traités après l'âge de 3.5 mois (Puck, 2007).....	25
Figure 10 : Etude longitudinale des différents types de lymphocytes provenant du patient 1 (P1) et du patient 2 (P2). Les valeurs absolues des cellules T, B et NK sont montrées en fonction du temps (le jour 0 correspond au début du traitement) (Cavazzana-Calvo M, 2000).	26
Figure 11 : (B) Profils cinétiques des cellules T du patient P4 (triangles) et du patient P5 (carrés), qui ont développé une prolifération lymphocytaire T incontrôlée. Le jour 0 correspond au début du traitement par thérapie génique. (C) Un frottis sanguine, coloré au MGG, du patient 4 à 34 mois montrant des blastes lymphoïdes (grossissement, 1000x) (Hacein-Bey-Abina, 2003).	27
Figure 12 : Délétion du gène TCRD est induit par le réarrangement du gène TCRA au niveau des segments V _α et J _α , formant un TREC contenant une séquence commune (Murphy, 2012).	34
Figure 13 : Valeurs des TRECs sur des buvards de sang non modifié contre du sang déplété en cellules T (cercles) et du sang de patients atteints de DICS (triangles). La barre représente la moyenne des échantillons répétés à partir du même sujet ; *échantillons ayant la même valeur sont entre parenthèses (Chan K. and Puck, 2005).	36
Figure 14 : Résultats du dépistage à l'aide du dosage de l'IL-7 et du dosage des TRECs. La ligne correspond à la valeur seuil de 15pg/mL pour le dépistage avec l'IL-7. La valeur des TRECs est exprimée en copies par centimètre carré de papier filtre (McGhee SA, 2005b).....	37

Figure 15 : Les incertitudes et les différentes dispositions à payer un QALY sont illustrés par une courbe d'acceptabilité (Chan, 2011).	41
Figure 16 : Les progrès réalisés dans la mise en œuvre du dépistage des DICS (Ojodu, 2015).	44
Figure 17 : Estimation de la mise en œuvre du dépistage des DICS à la fin de l'année 2016 (Ojodu, 2015).	45
Figure 18 : L'organisation pratique du DNN en France (Roussey, 2010).	47
Figure 19 : Essai DEPISTREC, circulation de l'information (protocole DEPISTREC).	51
Figure 20 : Organigramme pour un dépistage positif (protocole DEPISTREC).	52
Figure 21 : Organigramme pour un dépistage non concluant ou positif (enfant prématuré) (protocole DEPISTREC).	53
Figure 22 : Technologie TR-FRET. (A) Accepteur, (D) Donneur (notice du kit EnLite™ neonatal TREC).	54
Figure 23 : Arbre décisionnel du laboratoire (étude DEPISTREC).	56
Figure 24 : Analyse des TRECs à la moitié de l'étude DEPISTREC.	58
Figure 25 : Répartition des étiologies en fonction des valeurs absolues de CD3 ⁺ (n = 109).	68
Figure 26 : Répartition des 129 enfants dépistés avec le nouvel algorithme en fonction du résultat de l'analyse des TRECs. Soit au minimum 41 enfants vus en consultation au lieu de 129.	73

2 Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des DICS en fonction des phénotypes lymphocytaires (Bonilla, 2015)	10
Tableau 2 : Les types d'infections rencontrés dans les différents PIDs (Notarangelo, 2010). 13	
Tableau 3 : Les différentes méthodes de dépistage proposées pour les DICS (Puck and SCID Newborn Screening Working Group, 2007)	33
Tableau 4 : Classification des conditions associées à des valeurs basses de TRECs et de lymphocytes T, détectées par le dépistage néonatal des DICS (Kwan, 2014).	43
Tableau 5 : Etiologies des lymphopénies T rencontrées dans l'étude DEPISTREC à la mi-étude (n = 42 enfants).	68

3 Liste des abréviations

ACHDNC : Advisory Committee on Inherited Disorders Newborns and Children

ADA : adénosine déaminase

A FDPHE : Association Française Dépistage Prévention Handicap Enfant

AIM-DIC : atrésie intestinale multiple associée à un déficit immunitaire combiné

CDC : Center for Disease Control and Prevention

CEREDIH : Centre de référence des Déficiences immunitaires héréditaires

CLSI : Clinical & Laboratory Standards Institute

CMF : cytométrie en flux

Cofrac : Comité français d'accréditation

DIC/CID : déficit immunitaire combiné/combined immunodeficiency

DICS/SCID : déficit immunitaire combiné sévère/severe combined immunodeficiency

DIH : déficit immunitaire héréditaire

DIP/PID : déficit immunitaire primitif/primary immunodeficiency

DNN : dépistage neonatal

JAK-3 : Janus kinase 3

IL-2RG : chaîne commune gamma/common gamma chain

IL-7R α : chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 7/interleukine 7 receptor alpha chain

GVHD : graft versus host disease

HHS : Health and Human Services

HSCT : hematopoietic stem cell transplantation

PEG-ADA : polyethylene glycol-modified adenosine deaminase

PIDTC : primary immunodeficiency treatment consortium

RAG : gènes activant la recombinaison/recombination-activating genes

RNR : ribonucléotide réductase

RTE : recent thymic emigrants

SAHH : S-adenosyl homocysteine hydrolase

TCR : T cell receptor

TLR : toll-like receptor

TRECs : T-cell receptor excision circles

XDICS/XSCID : DICS lié à l'X/X-linked severe combined immunodeficiency

γ_c : chaîne commune gamma/common gamma chain

4 Introduction

Lors des dernières décennies, les avancées en biologie moléculaire et en immunologie fondamentale ont fortement progressé. Un très grand nombre de gènes, responsables des déficits immunitaires primitifs (DIPs) ou déficits immunitaires héréditaires (DIH) chez l'Homme, sont d'ores et déjà identifiés. Certains mécanismes physiopathologiques sont maintenant bien connus, ces connaissances ont permis les développements de nouveaux traitements et de nouveaux outils diagnostiques.

Pour rappel, les DIPs sont liés à un dérèglement du système immunitaire. Il existe deux types de déficits immunitaires : les déficits immunitaires primitifs et secondaires (ou acquis). Certaines maladies (comme le portage du VIH ou les hémopathies...), ou certains traitements (par exemple, les traitements immunosuppresseurs) sont responsables de ces déficits acquis. A la différence de ceux-ci, les déficits primitifs sont dus à des mutations génétiques, le plus souvent héréditaires et monogéniques (transmission autosomique récessive ou liée à l'X). On compte plus de 130 DIPs à ce jour, qui font, depuis 1970, l'œuvre d'une classification par le « International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary Immunodeficiencies » (Notarangelo, 2010 ; Notarangelo, 2009).

Les DIPs sont classés en 2 grands groupes en fonction du composant de l'immunité atteint par la mutation génétique. En effet, le premier groupe représente les anomalies de l'immunité innée : défauts des cellules phagocytaires, du complément et des récepteurs de type Toll (TLRs). Un second regroupe les anomalies de l'immunité adaptative : les déficits combinés des cellules T et B (DICs), déficits humoraux prédominants, dérégulations immunitaires et les syndromes d'immunodéficiences. C'est essentiellement ce dernier groupe qui va nous intéresser dans ce travail et tout particulièrement les déficits immunitaires combinés sévères (DICS), un sous-groupe des DICs (Notarangelo, 2010 ; Notarangelo, 2009).

5 Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS)

5.1 Définition

Les déficits immunitaires combinés (DICs) correspondent à un ensemble d'affections du système immunitaire, se caractérisant par des troubles partiels du développement et/ou du fonctionnement des lymphocytes T associés à une réponse humorale perturbée. Cette dernière peut correspondre soit à un déficit en lymphocyte B soit à la perte des fonctions des lymphocytes T_H.

Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) représentent, dans les DICs, un ensemble de maladies très sévères se caractérisant cette fois-ci par un déficit total en lymphocytes T et une immunité humorale éteinte.

5.2 Classification

Décrits pour la première fois il y a plus de 60 ans, c'est vraiment durant ces dernières décennies que la majorité des causes de DICS a pu être élucidée grâce à la biologie moléculaire et à l'évolution des connaissances en immunologie. En 1972, pour la première fois, un mécanisme moléculaire responsable d'un DICS est mis en évidence, il s'agit du déficit en adénosine déaminase (ADA), puis 14 autres DICS seront mis en évidence les décennies suivantes (Tableau 1).

Disease	Genes	References
T⁻B⁻NK⁻		
Adenosine deaminase	<i>ADA</i>	89, 90
Adenylate kinase (reticular dysgenesis)	<i>AK2</i>	91-93
T⁻B⁻NK⁺		
Artemis	<i>DCLRE1C</i>	94, 95
Cernunnos	<i>NHEJ1</i>	96, 97
DNA-dependent protein kinase	<i>PRKDC</i>	98
DNA ligase IV	<i>LIG4</i>	99, 100
RAG1 and RAG2	<i>RAG1, RAG2</i>	101-104
T⁻B⁺NK⁻		
X-linked SCID	<i>IL2RG</i>	67, 105-108
JAK3 deficiency	<i>JAK3</i>	106, 109
CD25 deficiency	<i>IL2RA</i>	110, 111
T⁻B⁺NK⁺		
CD3 complex defects	<i>CD3D, CD3E, CD3Z</i>	112-115
Coronin 1A deficiency	<i>CORO1A</i>	88
CD45 deficiency	<i>PTPRC</i>	116, 117
IL-7 receptor deficiency	<i>IL7RA</i>	115, 118

Tableau 1 : Classification des DICS en fonction des phénotypes lymphocytaires (Bonilla, 2015)

La classification des DICS repose sur leurs phénotypes lymphocytaires : T, B et NK (Tableau 1). En effet, les DICS se caractérisent par une absence de lymphocytes T, par contre la présence des lymphocytes B et NK reste variable et dépend de l'anomalie génétique mise en jeu (Figure 1). La lymphopénie et les caractéristiques phénotypiques sont présentes dès la naissance et permettent un diagnostic précoce (Figure 77).

Le schéma ci-dessous permet aisément de comprendre comment des mutations peuvent conduire à un arrêt de production des lymphocytes. En effet, ces gènes codent pour des protéines (encadrées en rouge) jouant un rôle important dans la lymphopoïèse T, B et NK. Maintenant que nous connaissons le rôle de chacune de ces protéines, il est facile d'en déduire les phénotypes lymphocytaires qui s'en suivent. Par exemple, dans le DICS lié à l'X (XDICS), la mutation touche le gène qui code pour la chaîne gamma commune. Cette protéine est commune pour tous les récepteurs de la famille de l'IL-2, notamment les récepteurs à l'IL-7 et à l'IL-15 importants pour le développement des lymphocytes T et NK respectivement. On comprend donc facilement le phénotype qui en découle : T⁻ B⁺ NK⁻.

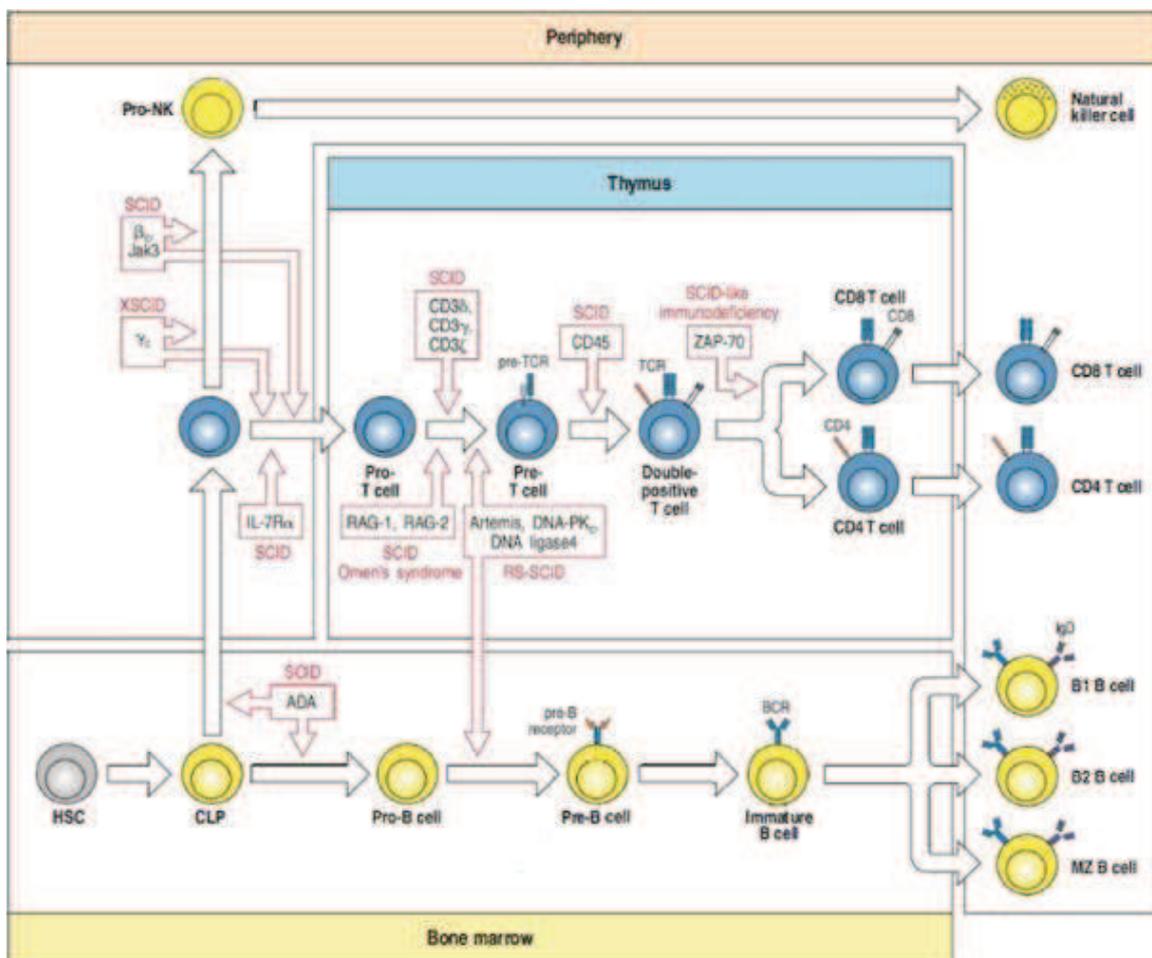


Figure 1 : Principales anomalies génétiques responsables de SCID et défauts de développement des lymphocytes T, B et NK (Murphy, 2012)

5.3 Épidémiologie

À l'exception du déficit en IgA (le plus courant des déficits immunitaires), les DIPs sont en général très rares voir exceptionnels avec une incidence de 1 pour 5000 naissances/an. Les DICS ont une incidence à 1 pour 100000 naissances/an pour l'estimation la plus basse (MMWR, 2004), et 1 pour 58000 naissances/an pour la plus forte et la plus récente (Kwan, 2014). Dans cette étude, les auteurs font une méta-analyse de 11 programmes de dépistages de DICS aux États-Unis. Au total, 3 030 083 enfants ont été dépistés et 52 DICS diagnostiqués. Seul un dépistage néonatal généralisé permettra de calculer l'incidence précise de la maladie (à cause des enfants morts avant le diagnostic).

Dans le sous-groupe des DICS, le XDICS est largement la plus fréquente des mutations et représente, dans toutes les études, environ 50% des cas. Ensuite, le déficit en adénosine déaminase occupe la seconde place avec environ 15%, les autres ont des incidences moins importantes, <10% en général (Buckley, 2004) (Figure 2). Aucune anomalie n'a été identifiée pour 6.5% des enfants.

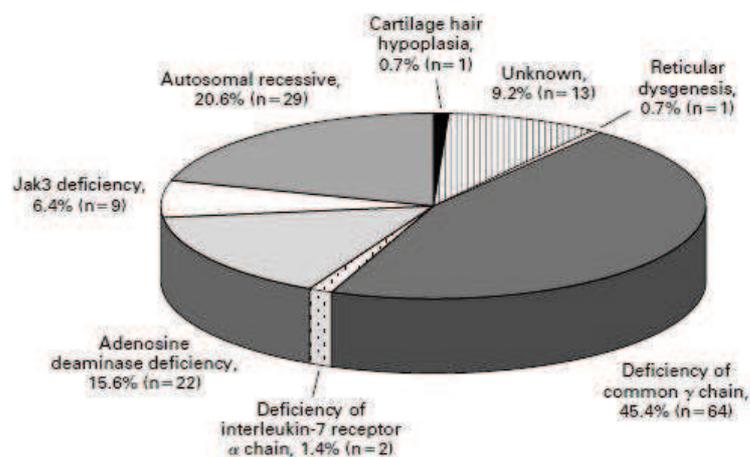


Figure 2 : Les fréquences relatives des différents types génétiques de DICS parmi 141 (Buckley, 2000).

Dans la méta-analyse (Kwan, 2014) n = 52, certains résultats sont différents puisqu'il y a seulement 19% de XDICS mais les autres déficits, par exemple les déficits en IL-7R α et en ADA, restent dans les mêmes proportions (12% et 11% respectivement). Chez 15% des enfants, aucune anomalie génétique n'a été retrouvée.

5.4 Signes cliniques

Cliniquement, les infections récurrentes, sévères (prise en charge difficile) par des germes opportunistes restent la pierre angulaire des déficits immunitaires. La susceptibilité à

tel ou tel germe dépend de la nature du composant de l'immunité atteinte et est résumée dans le tableau ci-dessous (Tableau 2). Dans le passé, ces différences ont permis de comprendre le rôle des cellules immunitaires dans la lutte contre les différents types d'infection. En général, les déficits de l'immunité innée sont plus sensibles aux infections par les bactéries et les champignons. Tandis que lors des troubles de l'immunité adaptative, l'atteinte par les virus reste la plus importante.

Le DICS est asymptomatique à la naissance. Dès les premiers mois de vie, les enfants peuvent présenter un muguet, des diarrhées chroniques responsables d'une cassure de la courbe de croissance staturo-pondérale. L'examen physique montre souvent l'absence de tissus lymphoïdes et le thymus est couramment indétectable à la radiographie ou aux autres imageries. Très rapidement, dans les mois suivants, les enfants atteints d'un DICS développent des infections opportunistes (Tableau 2), puisque ils sont très sensibles à un très grand nombre d'infections sévères et variées : virus (CMV, EBV, ...), bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, ...), champignons (*Candida sp*, *Aspergillus sp*, ...) et parasites (*Pneumocystis jiroveci*, *Toxoplasma gondii*, ...), où le pronostic vital est rapidement mis en jeu. En effet, les lymphocytes T jouent un rôle central dans le système immunitaire Humain, les lymphocytes T4 dans le rôle de chef d'orchestre de toutes les réponses immunitaires et les lymphocytes T8 dans l'intégrité cellulaire. Parfois, un effet greffon versus hôte responsable d'éruptions cutanées peut être retrouvé lors d'une greffe de cellule T maternelle chez les enfants DICS. De plus, des maladies auto-immunes et des processus tumoraux peuvent souvent apparaître dans ce genre de déficits immunitaires. Enfin, d'autres symptômes plus spécifiques sont rencontrés dans certaines formes de DICS, par exemple des malformations squelettiques et des atteintes systémiques dans le déficit en adénosine déaminase.

Organism	Antibody deficiencies	CIDs	Phagocytic defects	Complement deficiencies
Viruses	Enteroviruses	All, especially: CMV, respiratory syncytial virus, EBV, parainfluenza type 3	No	No
Bacteria	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	As for antibody deficiencies, also: <i>Salmonella typhi</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> , enteric flora	<i>S aureus</i> , <i>P aeruginosa</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>S typhi</i>	As for antibody deficiencies: especially <i>N meningitidis</i> in deficiency of late components
Mycobacteria	No	Nontuberculous, including BCG	Nontuberculous, including BCG	No
Fungi	No	<i>Candida</i> species, <i>Aspergillus</i> species, <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Histoplasma</i> <i>capsulatum</i>	<i>Candida</i> species, <i>Aspergillus</i> species	No
Protozoa	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Pneumocystis jiroveci</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i>	No	No

Tableau 2 : Les types d'infections rencontrés dans les différents PIDs (Notarangelo, 2010).

5.5 Les principaux types de DICS

Dans cette partie, les principaux DICS seront détaillés. 4 mécanismes distincts sont responsables d'un défaut de développement des cellules T : défaut du métabolisme des purines (ADA), défaut de signalisation des récepteurs γ_c -dépendant (γ_c , JAK-3, IL-7R α), défaut de recombinaison V (D)J (RAG1/2, Artemis) et défaut de signalisation du preTRC/TRC (CD3 δ / ϵ , CD45).

5.5.1 Le déficit en adénosine déaminase

C'est en 1972 que le déficit en ADA, premier DICS identifié, est mis en évidence à travers 2 cas cliniques (Giblett ER, 1972). Ces deux jeunes patientes sans lien de parenté présentaient des manifestations cliniques similaires d'immunodéficience (infections récurrentes). En effet, une lymphopénie T sévère (entre 50 et 500 lymphocytes/mm³) et un déficit humoral profond (réponse minimale au vaccin, absence d'anti-ABO,...) sont retrouvés. Dans les globules rouges, un déficit en ADA est également trouvé chez les deux petites montrant pour la première fois une perte totale d'activité alors que 1000 autres patients, de tout âge, avaient été testés (Figure 3). Les parents des deux enfants avaient tous des activités diminuées (50 à 75% de la normale) et permettaient de faire l'hypothèse d'une transmission autosomique récessive. Rapidement, le rapprochement entre déficit en ADA et déficit immunitaire est fait même si les mécanismes physiopathologiques ne sont pas mis en évidence pour le moment.

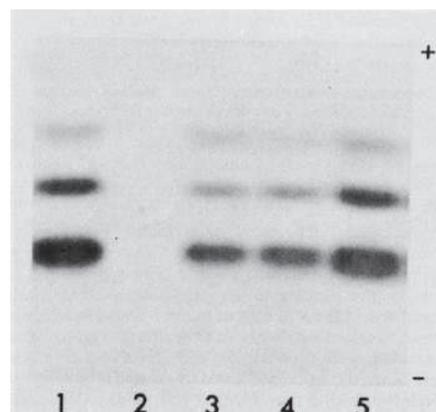


Figure 3 : Les profils électrophorétiques de 5 hémolysats colorés pour l'activité ADA sur gel d'amidon (Giblett ER, 1972). Canaux 1 et 5, contrôles normaux, et canaux 3 et 4, pour les parents du cas 1. Le canal 2 a une activité ADA nulle.

L'adénosine déaminase est une enzyme de la voie du catabolisme des purines, où elle catalyse l'adénosine et le déoxyadénosine en inosine et déoxyinosine respectivement. Son gène se trouve dans la région 13 du bras long du chromosome. Il s'agit d'une protéine de 40kDa, ubiquitaire, monomérique, extra- et intracellulaire qui se trouve en quantité très importante dans certains tissus comme le thymus (1000 fois plus que dans les érythrocytes), dans le cerveau et le tube digestif. En 1978, Mitchell et al (Mitchell, 1978) montrent la cytotoxicité directe de l'accumulation des substrats de l'enzyme (adénosine et surtout déoxyadénosine) sur le tissu lymphoïde T immature et trouvent la base moléculaire responsable du déficit immunitaire. Cette cytotoxicité directe est moins évidente sur les précurseurs B. Aujourd'hui, nous savons que l'accumulation des métabolites phosphorylés et ainsi que la rétro-inhibition de la ribonucléotide réductase (RNR) jouent aussi un rôle dans le mécanisme physiopathologique (Van De Wiele, 2002). La RNR est un élément indispensable de la biosynthèse de l'ADN, un défaut d'activité de celle-ci engendre un défaut de réplication d'ADN (turnover important lors de la sélection thymique) dans les cellules lymphoïdes progénitrices (CLP), cellules lymphoïdes les plus immatures (Figure 1). De plus, l'augmentation de déoxyadénosine inactive l'enzyme SAHH (S-adenosyl homocysteine hydrolase) et conduit à l'accumulation de de S-adenosyl homocysteine, qui est un inhibiteur important des réactions de transméthylation. Par conséquent, les déficits en ADA ont une absence totale des trois sous-types lymphocytaires : T⁺ B⁺ NK⁺ (Tableau 1).

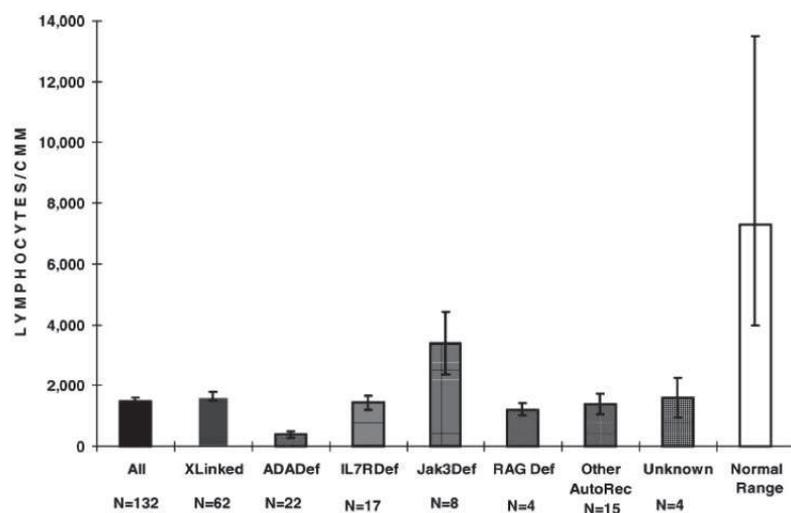


Figure 4 : Moyennes +/- SEM des valeurs absolues de lymphocytes à la naissance des enfants atteints d'un DICS, montrant le niveau des lymphopénies dans toutes les formes de DICS (Buckley RH, 2004).

En général, ces patients sont plus lymphopéniques que les autres types de DICS avec les valeurs absolues de lymphocytes inférieures à 500/mm³ (Figure 4). De plus, la clinique du déficit en ADA est beaucoup plus large que les autres DICS puisque le métabolisme de l'ADA a

un impact systémique. En plus des signes habituels des déficits immunitaires, d'autres symptômes non immunologiques se surajoutent comme les malformations du squelette (anomalies de la jonction chondrocostale), les atteintes rénales, hépatiques, pulmonaires et neurologiques soulignant la complexité de cette pathologie multiviscérale. Les déficits profonds en ADA ont des activités nulles inférieures à 1%. En plus du déficit total en ADA, on peut aussi rencontrer des formes retardées (plusieurs mois) voir tardives (plusieurs années) de la maladie (Shovlin CL, 1994) en fonction des anomalies génétiques.

5.5.2 Le déficit en chaîne gamma commune

Le déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X (XDICS) est la forme la plus courante de DICS, représentant environ 46 % de tous les cas (*Figure 2*). En 1966, Rosen et al décrivent 3 familles atteintes de DICS hérité dans un mode récessif et lié à l'X, puisque tous les malades étaient des hommes (Rosen, 1966). Grâce à des études de polymorphisme génétique, De Saint Basile et al. ont situé le gène muté au niveau de la région Xq13 en 1987 (De Saint Basile, 1987). 5 années plus tard, il a été identifié comme le gène codant pour la chaîne commune gamma. En effet, Noguchi a identifié trois mutations différentes dans le gène *IL2RG* chez trois patients non apparentés atteints de XDICS (Noguchi, 1993). La même année, Jennifer Puck identifie des anomalies identiques chez 4 patients malades non liés (Puck, 1993).

Les cytokines interviennent dans la croissance, la différenciation et la survie des cellules du système immunitaire. L'interleukine-2 (IL-2) et son récepteur (IL-2R) jouent un rôle important dans le développement des lymphocytes T. La famille des cytokines apparentées à l'IL-2 comprend : IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Buckley, 2004). Sa constitution repose à la fois sur le partage de la sous-unité chaîne commune gamma (γ_c) de leurs récepteurs, ainsi qu'une grande partie de leurs voies de signalisations intracellulaires (*Figure 5*). L'IL-2R est un complexe protéique multimérique constitué de 3 sous-unité : IL-2R α , IL-2R β et IL-2R γ (ou γ_c). La chaîne γ_c intervient dans la liaison de l'IL-2 à son récepteur ainsi que dans la signalisation intracellulaire par l'intermédiaire de JAK-3 (tyrosine kinase cytoplasmique liée à la queue de γ_c). L'absence de chaîne γ_c amène à un défaut critique du développement des cellules T chez les patients, apportant la preuve formelle que ce constituant est critique. De plus, une mutation du gène *IL2RG* conduit aussi à un défaut de signalisation des récepteurs de la même famille, expliquant comment les cellules T, B et NK peuvent être affectées par une unique mutation. Le déficit en chaîne γ_c se caractérise donc par un manque de lymphocytes T et NK (*Tableau 1*). Par contre, les patients ont un nombre normal ou élevé de lymphocytes B circulant. Mais, il s'agit de cellules B phénotypiquement immatures et non fonctionnelles, à cause en partie du manque d'activité T Helper.

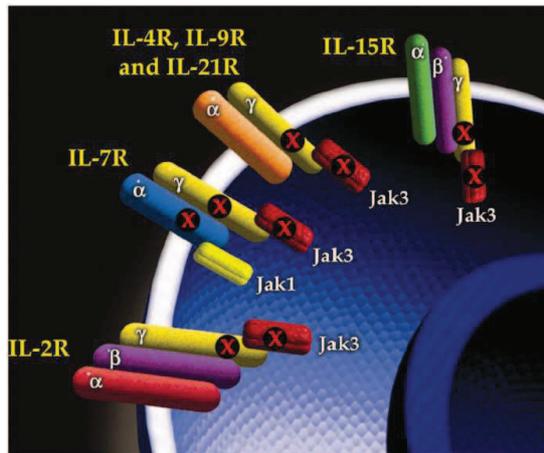


Figure 5 : Dessin illustrant la chaîne commune gamma partagée avec de nombreux récepteurs cytokiniques et associée à la protéine JAK-3 (Buckley, 2004).

5.5.3 Le déficit en Janus Kinase 3

En 1997, Candotti et al. ont rapporté pour la première fois la responsabilité du gène Janus kinase 3 (*JAK3*) au travers de l'analyse de quatre DICS non apparentés atteints d'un déficit en JAK-3 (Candotti, 1997). Les anomalies génétiques retrouvées étaient variables et incluaient des délétions intragéniques étendues aussi bien que des mutations faux-sens et non-sens.

Les Janus kinases constituent une famille de protéines à activité tyrosine kinase, jouant un rôle fondamental dans la transduction du signal des récepteurs cytokiniques notamment hématopoïétiques. Quatre membres ont été identifiés à ce jour (JAK-1, JAK-2, JAK-3 et TYK-2). JAK-3 est exprimée préférentiellement par les cellules lymphoïdes et myéloïdes. Associée à la chaîne commune gamma (γ_c), elle a des fonctions critiques dans certaines voies de signalisation intracellulaire de plusieurs cytokines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21) (Figure 5) par l'intermédiaire de la phosphorylation de STAT5 et STAT6. En 2001, Notarangelo note que la chaîne (γ_c) et la protéine JAK-3 sont impliquées dans les mêmes voies de transduction de signal (JAK/STAT) (Notarangelo, 2001). Les signaux induits par l'IL-7 et l'IL-2 nécessaires au développement et à l'expansion des cellules T, ceux induits par l'IL-15 responsables de la différenciation des cellules NK, et ceux induits par l'IL-4 intervenant dans la différenciation et la commutation isotypique des cellules B sont impactés par les défauts de JAK-3 ou γ_c . Par conséquent, une mutation du gène *JAK3* conduit donc à un phénotype identique à celui du XDICS, à savoir l'absence de lymphocytes T et NK circulant et la présence de cellules B non fonctionnelles ($T^- B^+ NK^-$).

5.5.4 Le déficit en chaîne alpha du récepteur à l'IL-7

Le gène *IL7R* code la chaîne alpha du récepteur à l'IL-7 (IL-7R α), une glycoprotéine de 25 kD impliquée dans la régulation de la lymphopoïèse. Il se situe dans la région chromosomique 5p13 (Lynch, 1992). Ce récepteur à l'IL-7 est composé de deux sous-unités, la chaîne IL-7R α et la chaîne γ_c (Figure 5) et est présent, chez l'Homme, à la surface des progéniteurs T et B mais absent de la surface des lymphocytes NK. Il a un rôle essentiel dans le développement normal des cellules T mais n'est pas indispensable à la maturation des cellules B. L'IL-7R α et l'IL-2R γ sont deux composants indispensables au bon fonctionnement de ce complexe protéique. En effet, Noguchi a démontré que l'IL-2R γ est nécessaire à l'activité du récepteur à l'IL-7 mais également d'autres récepteurs cytokiniques (Noguchi, 1993). De plus, Puel et al. ont identifié des mutations dans le gène *IL7R* chez deux patients atteints d'un DICS (T $^-$ B $^+$ NK $^+$), montrant l'implication de celui-ci dans cette pathologie (Puel, 1998). En 2000, une observation similaire est faite chez 3 malades appartenant à une famille sicilienne consanguine (Roifman, 2000). A la différence des déficits en γ_c et en JAK-3, les lymphocytes B semblent fonctionner normalement après une greffe de cellules souches hématopoïétiques suite à la reconstitution immunitaire des cellules T.

5.5.5 Les déficits des gènes *RAG*

Les enfants atteints d'un DICS causé par la mutation des gènes activant la recombinaison, *RAG1* et *RAG2* (recombination-activating genes), ont des caractéristiques communes aux autres DICS, à savoir la susceptibilité aux infections et l'absence de fonctions cellulaires T et B. Cependant, leurs phénotypes diffèrent des patients souffrant d'un déficit en JAK-3, γ_c , IL-7R α ou ADA à cause de l'absence de lymphocytes T et B et la présence de cellules NK (T $^-$ B $^-$ NK $^+$). Ce phénotype particulier suggère un problème génétique au niveau des récepteurs antigéniques du système immunitaire adaptatif, conduisant à la découverte des mutations *RAG1* et *RAG2* (Schwarz, 1996).

Ces gènes se trouvent sur le chromosome 11p13, et codent pour des protéines responsables du réarrangement somatique des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes T et B. Ces protéines reconnaissent des séquences RSS (séquences signales de recombinaisons), qui bordent les gènes V, D et J, permettant la cassure de l'ADN double brin et ensuite la recombinaison V(D)J. Les mutations de *RAG1* et *RAG2* empêchent donc la formation des récepteurs antigéniques. Les déficits en *RAG1* et *RAG2* se caractérisent aussi par un échec de développement des lymphocytes B après une transplantation de cellules souches hématopoïétiques.

En plus d'être responsable de DICS, des mutations hypomorphiques de *RAG1* et *RAG2* peuvent engendrer le syndrome d'Omenn à cause d'une altération partielle de l'activité de

recombinaison V(D)J. Ce syndrome est caractérisé par le développement peu après la naissance d'une érythrodermie généralisée, desquamations, diarrhées, hépatosplénomégalies, hyperéosinophilies et par des IgE augmentées mais aussi par un faible niveau voire l'absence des autres isotypes d'immunoglobulines. De plus, le compte lymphocytaire est augmenté en raison de lymphocytes T circulant oligoclonaux et activés (Villa, 2008). Cavadini montre que ces quelques clones de cellules T résiduelles ont échappé à la sélection négative à cause d'un déficit de l'expression du facteur de transcription AIRE (Auto-Immune REgulator) (Cavadini, 2005). Par conséquent, l'expansion périphérique de ces lymphocytes T provoque des réactions auto-immunes massives responsables de cette clinique. Le syndrome d'Omenn est fatal s'il n'est pas traité par une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Contrairement aux DICS, un conditionnement pré-greffe est indispensable.

5.5.6 Les déficits en protéine Artemis

Une autre forme de DICS est due à un déficit d'un facteur intervenant lors du réarrangement V(D)J et dans la réparation de l'ADN. Cette protéine, appelée Artemis, appartient à la superfamille des métallo-bêta-lactamases et est codée par le gène *DCLRE1C* situé sur le chromosome 10p13 (Buckley, 2004). Tout d'abord, elle joue un rôle essentiel au moment de la recombinaison V(D)J, processus où les gènes codant pour les anticorps et les récepteurs T sont assemblés à partir des segments V, D et J. La protéine Artemis a une activité endonucléase et est responsable de la coupure aléatoire de l'ADN après l'intervention des nucléases RAG1 et RAG2. Le clivage variable de l'ADN par la protéine Artemis, combiné à l'addition et la suppression aléatoire de nucléotides par les polymérases, confère une extrême diversité au système immunitaire Humain permettant de lutter contre la majorité des antigènes étrangers. Dans le déficit en protéine Artemis, la recombinaison V(D)J est bloquée et aucunes cellules matures B et T ne sont produites. Similairement aux déficits des gènes *RAG1* et *RAG2*, ce défaut provoque une autre forme de DICS T⁻ B⁻ NK⁺, aussi appelé DICS d'Athabasca. De plus, les personnes atteintes d'une mutation du gène *DCLRE1C* ont une sensibilité accrue des fibroblastes de la peau et des cellules de la moelle osseuse aux radiations, montrant l'implication importante de la protéine Artemis dans la réparation de l'ADN.

5.5.7 Les déficits des chaînes CD3

Une autre cause de DICS humain de transmission autosomique récessive est le déficit en chaîne CD3 delta (CD3 δ). Le complexe CD3 est constitué de quatre chaînes : CD3 delta (CD3 δ), CD3 gamma (CD3 γ), CD3 epsilon (CD3 ϵ) et CD3 zeta (CD3 ζ), qui s'associent aux chaînes T variables α/β ou γ/δ pour former le récepteur cellulaire T (Figure 6).

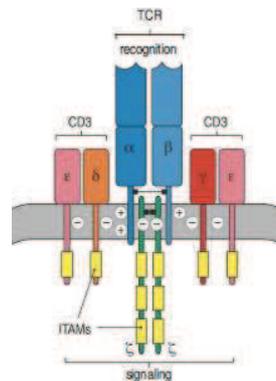


Figure 6 : Le récepteur cellulaire T avec les chaînes CD3 (Murphy, 2012).

Les enfants atteints d'une mutation du gène *CD3D* (chromosome 11q23), codant la chaîne delta, ressemblent à toutes les autres formes de DICS par leur susceptibilité aux infections et leur absence de fonction cellulaire T (Buckley, 2004). Le nombre de cellules B est normal ou augmenté, et les cellules NK sont en quantité normales dans l'ensemble. Ainsi, leur phénotype lymphocytaire ressemble à celui du déficit en chaîne alpha du récepteur à l'IL-7, c'est-à-dire T⁻ B⁺ NK⁺. De plus, les anomalies des gènes codant pour les autres chaînes du complexe CD3, CD3 γ et CD3 ϵ , sont responsables de formes d'immunodéficience moins sévères contrairement aux DICS classiques.

5.5.8 Le déficit en CD45

Un autre DICS T⁻ B⁻ NK⁺ est causé par un déficit en PTPRC (proteine tyrosine phosphatase, récepteur type C), aussi appelé CD45 ou antigène leucocytaire commun. Cette enzyme, située sur le chromosome 1q31, est codée par le gène *PTPRC* (Buckley, 2004). Elle est uniquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques où elle joue un rôle dans des voies métaboliques de transduction du signal, impliquées dans le développement, la maturation et la différenciation de ces dernières.

5.6 La démarche et les outils diagnostiques des DICS

En général, la suspicion d'un déficit immunitaire est guidée par la clinique et dans ce contexte, par les infections (âge de début, sévérité, localisation). Le type de pathogènes est très important puisque la susceptibilité clinique est différente en fonction du DIPs (Tableau 2). De plus, il est intéressant d'évaluer soigneusement l'histoire familiale (transmission génétique) afin de proposer un dépistage et une démarche diagnostique cohérents. Pour finir, l'examen clinique et l'imagerie sont indispensables et peuvent fournir des indices cruciaux (ganglions, organomégalies, albinisme, malformations, absence de thymus ...) pour la suite.

Les DICS sont des urgences médicales pédiatriques et le diagnostic doit être fait le plus rapidement possible même s'il est fréquent que celui-ci soit fait tardivement lors de l'apparition et/ou la persistance d'infections sévères par des germes opportunistes. Par conséquent, la priorité sera d'évaluer la probabilité clinique et biologique d'un DICS. Devant le très grand nombre de déficits immunitaires primitifs et des signes cliniques manquant parfois de spécificité, il est indispensable de catégoriser les différents tests biologiques. Des tests de première intention proposés en fonction du contexte, moins coûteux et apportant une vision plus globale, permettent une première évaluation du système immunitaire et mettent en évidence les composants de l'immunité défaillants. Grâce à ces informations, les options diagnostiques se précisent et des tests de deuxième intention, parfois plus onéreux, donnent un diagnostic précis.

En cas de suspicion de DICS, la NFS est un excellent test de première intention. Peu onéreux, rapide et facile à mettre en œuvre dans n'importe quel laboratoire de biologie médicale, elle permet de détecter les lymphopénies sévères présentes dès la naissance (Figure 77). Cette lymphopénie est adaptée à l'âge (valeurs normales à la naissance : 2000-10000/mm³ (Buckley RH, 1997)), par conséquent tous les comptes lymphocytaires inférieurs à 2000/mm³ seront analysés de près afin d'affirmer ou d'écarter un déficit immunitaire. L'étude des sous-populations lymphocytaires en cytométrie en flux, examen qui se démocratise largement, explore la lymphopénie et donne le nombre (en valeur absolue et en pourcentage) de cellules CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, NK (CD16⁺, 56⁺) et B (CD19⁺). Le Primary Immunodeficiency Treatment Consortium (réseau de 33 centres aux Etats-Unis, travaillant sur les DIPs sévères) a établi des critères de diagnostic pour définir les DICS typiques. Les vrais DICS se caractérisent par des déficits profonds en lymphocytes T. Par conséquent, les DICS se définissent par un nombre de cellules T (CD3⁺) inférieur à 300/mm³ (Bonilla, 2015 ; Shearer, 2014) dans le sang (valeurs normales : 3000-6500/mm³) (Figure 77). De plus, l'étude des sous-populations lymphocytaires permet également de classer les DICS en fonction de leur phénotype (voir ci-dessus Tableau 1) et fournit des informations importantes sur les anomalies génétiques à rechercher pour identifier la cause du déficit. Le dosage pondéral des immunoglobulines est intéressant dans les déficits combinés puisque il y a également une atteinte de l'immunité humorale (absence de lymphocytes T Helper ou bien lymphocytes B

directement altérés). Dans les DICS, les patients ont généralement une absence ou un niveau faible d'IgA et d'IgM (les IgG ne sont pas interprétables à cause de la transmission materno-fœtale des IgG).

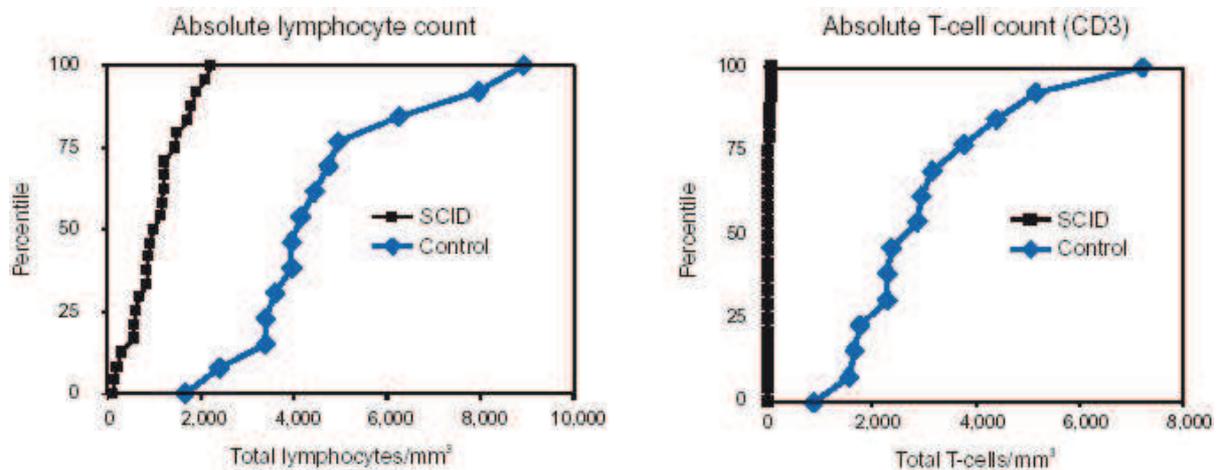


Figure 7 : Distributions des valeurs absolues des lymphocytes totaux et des lymphocytes CD3⁺ à la naissance chez 25 nouveau-nés atteints d'un DICS et 14 nouveau-nés en bonne santé (MMWR, 2004).

D'autres tests, plus spécifiques, vont apporter des informations importantes afin de confirmer le diagnostic. Il est important de savoir, chez les enfants DICS, que les lymphocytes maternels peuvent passer chez l'enfant et persister dans le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes. Par conséquent, la NFS et le compte de CD3⁺ sont erronés et peuvent donner à tort un diagnostic de faux négatif lorsque les valeurs sont proches des seuils pathologiques. L'étude des sous-populations T (par exemple naïves, mémoires,...) est intéressante et permet de faire la différence entre ces cellules maternelles et autologues. Dans ce cas, l'analyse des cellules mémoires CD45RO⁺ et activées HLA-DR⁺ permettent de voir une éventuelle contamination par des lymphocytes de la mère. De plus, l'absence ou même des taux très faibles de lymphocytes T naïfs (CD45RA⁺ et perte de CCR7) sont caractéristiques des DICS.

D'autres tests de seconde intention existent, comme les tests de prolifération lymphocytaire en présence de mitogène (par exemple la PHA, phytohémagglutinine). Selon le PIDTC, les DICS typiques ont un test de prolifération à la PHA inférieur à 10% par rapport aux valeurs de contrôle. De plus, des dosages enzymatiques très spécifiques comme le dosage de l'activité adénosine déaminase peuvent également être demandés lors d'une forte suspicion de déficit en ADA.

Pour finir, les tests génétiques, plus onéreux et plus rares mais tout de même de plus en plus disponibles, donnent un diagnostic précis en mettant en évidence les mutations spécifiques des différents gènes responsables des DICS. La mise en évidence de l'anomalie génétique est aussi importante pour identifier les porteurs, guider le conseil génétique et pour

proposer un diagnostic prénatal dans les grossesses suivantes. Cependant dans certain cas, l'urgence thérapeutique nécessitera une prise en charge agressive des patients sans avoir les résultats génétiques et donc un diagnostic précis et en sachant que dans certain cas aucune mutation n'est retrouvée (Figure 2).

5.7 Les traitements

5.7.1 La greffe de cellules souches hématopoïétiques

Peu de temps après la découverte du HLA en 1968, un DICS a été corrigé grâce à la transplantation d'une moelle osseuse géno-identique (sa sœur). Mais les donneurs compatibles sont rares, surtout lorsqu'on sort de la fratrie. Dans les années 70, les essais de greffes incompatibles se sont confrontés à la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), complication mortelle liée à l'attaque de l'organisme du receveur par les cellules immunocompétentes du donneur. A la fin des années 70, des greffes de moelle osseuse déplétée en cellules T sont réalisées chez la souris et le rat, aucune GVHD n'est alors observé. Rapidement, des techniques d'épuisement des lymphocytes T des moelles osseuses humaines sont développées, et dès les années 80, on voit apparaître les premières greffes HLA-incompatibles.

Les conditionnements avant la greffe sont discutés en fonction de l'état clinique de l'enfant et de la persistance de lymphocytes T autologues ou maternels. Un traitement prophylactique de la GVH est généralement administré pendant quelques mois (3 à 6 mois).

On sait, que depuis les années 1970 on peut guérir les DICS grâce à la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Buckley montre que le taux de survie des patients transplantés est de 81% (Buckley, 1999). Dans cette étude, 89 enfants atteints de différents types de DICS ont reçu des transplantations de moelle osseuse HLA-identique et HLA-haplo identique entre 1982 et 1998 (Figure 88). Le taux de survie était indépendant du type de DICS. Certaines transplantations haplo identiques se sont compliquées de GVHD, mais c'était des formes modérées (grade I et II) ne nécessitant pas de traitement sauf pour 8 enfants (grade III) traités par de la cyclosporine et des corticoïdes. Aucun patient n'est mort de GVHD, tous les décès étaient liés à des infections (virales essentiellement). Les lymphocytes T sont d'origine du donneur pour 68/72 enfants, fonctionnels (test de prolifération in vitro) et dans les valeurs normales après les transplantations. Contrairement à la reconstitution uniforme des cellules T, les lymphocytes B sont d'origine du receveur dans la plupart des cas. La cinétique d'apparition des premières cellules T matures et fonctionnelles dans le sang périphérique varie en fonction du type de transplantation, un délai d'un mois pour les greffes géno-identiques versus, 3-4 mois pour les greffes haplo-identiques T déplétées. De plus,

même si la différence est non significative, on peut déjà remarquer que le taux de survie varie entre 95% et 76% si la greffe est faite respectivement avant ou après 3.5 mois de vie.

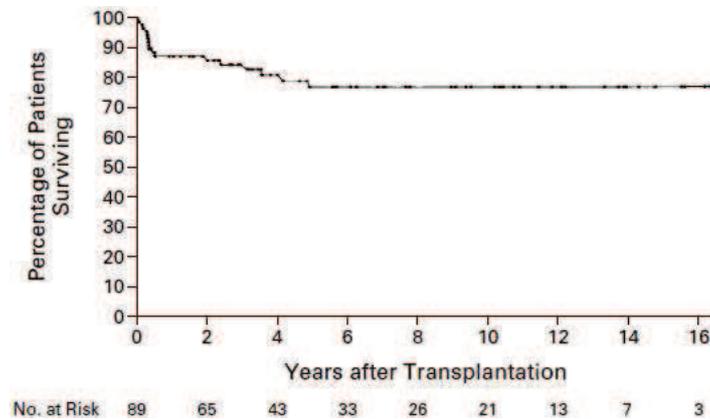


Figure 8 : Courbe de survie Kaplan-Meier pour 89 patients atteints d'un DICS, qui ont reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (81 % des patients étaient en vie à de l'évaluation la plus récente) (Buckley, 1999).

Les données européennes entre 1968 et 1999 montrent des taux de survie à 3 ans entre 77 et 54% ($p = 0.002$) en fonction de la compatibilité de la transplantation (HLA-identique et HLA-mismatched) et le taux de survie augmente avec le temps (Antoine, 2003). En effet, les améliorations des moyens de prévention, des procédures de transplantation (techniques de déplétion, conditionnements) et des prises en charge des complications (infections, GVHD) permettent une meilleure survie. De plus, le pronostic des DICS B⁺ transplantés serait meilleur (taux de survie et reconstitution immunitaire) que les DICS B⁻. Entre 2000 et 2005, la survie dans une greffe de DICS avec un donneur géno-identique est de 90% ($n = 25$) alors qu'elle est de 66% ($n = 96$) avec un donneur non compatible et 69% ($n = 46$) avec un donneur non apparenté (Gennery, 2010). De plus, les données montrent clairement une amélioration, cette fois-ci, significative des résultats lorsque les patients sont transplantés avant 6 mois. Pour résumer, les transplantations après 1995, à un jeune âge, phénotype B⁺, donneurs géno- ou phéno-identiques, absence d'infection avant la transplantation sont associées à un meilleur pronostic.

Buckley montre des données de survie à long terme de son programme de transplantation de DICS (Puck, 2007). Les enfants sont séparés en deux groupes en fonction de l'âge au moment de la greffe de cellules souches hématopoïétiques : avant 3.5 mois et après 3.5 mois. Pour les 46 enfants traités avant 3.5 mois de vie, c'est-à-dire ayant bénéficiés d'un dépistage anté- ou néonatal grâce à des antécédents familiaux connus, ont un taux de survie 96%. Alors que les 113 enfants diagnostiqués tardivement, c'est-à-dire après 3.5 mois, ont un taux de survie de 66% (Figure 99). De même au Royaume-Uni, Brown a comparé une cohorte de 48 enfants dont le diagnostic a été porté après les premières infections à une cohorte composée de 60 frères et sœurs de ces enfants qui ont pu bénéficier d'un diagnostic

prénatal ou néonatal en raison des antécédents dans la fratrie. Dans la cohorte d'enfants n'ayant pas bénéficié du dépistage, la mortalité avant greffe est de 35%, et parmi les 65% d'enfants greffés, 39% sont décédés, donnant une survie globale à 40%. Dans la cohorte d'enfants dépistés en période néonatale en raison des antécédents, 1.8% sont décédés avant la greffe, 8.5% après la greffe et la survie globale est de 90% (Brown, 2011).

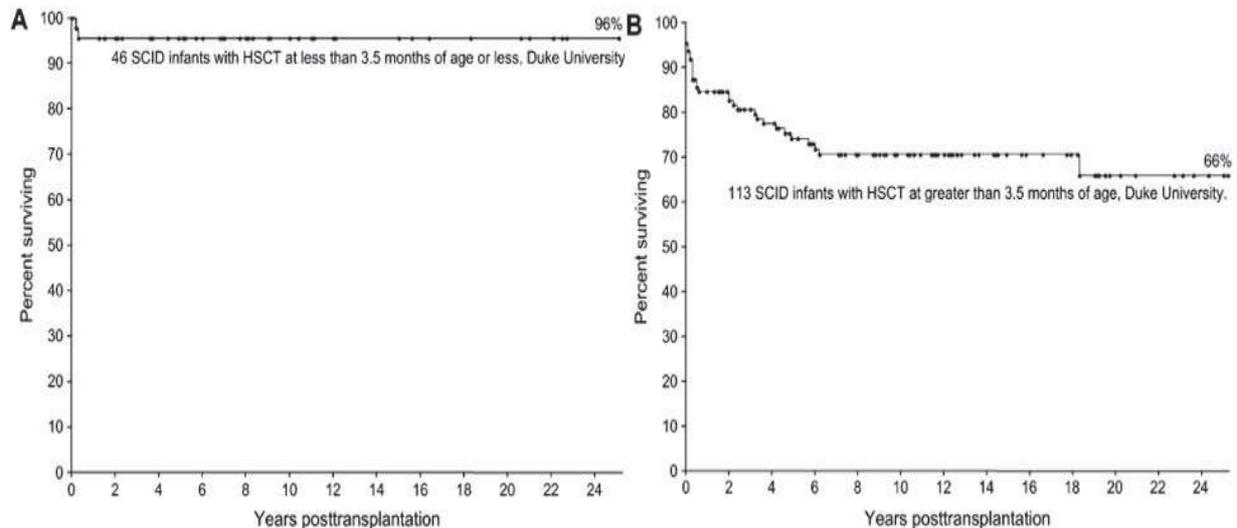


Figure 9 : Courbes de survie Kaplan-Meier des patients atteints d'un DICS transplantés dans le centre médical de l'Université de Duke. **A**, 46 nourrissons diagnostiqués et traités dans les 3.5 premiers mois de vie. **B**, 113 nourrissons traités après l'âge de 3.5 mois (Puck, 2007).

Toutes ces études montrent clairement, que le résultat de la transplantation d'un DICS dépend grandement de l'âge du diagnostic et de l'intervention. Dans la mesure du possible, les patients atteints devraient avoir une reconstitution immunologique au moyen d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (recommandation grade B) (Bonilla, 2015).

5.7.2 La thérapie génique

In vitro, le transfert du gène γ_c permet de restaurer l'expression de γ_c et le développement des lymphocytes T et NK. Des études montrent, que le transfert ex-vivo d'un gène γ_c dans des précurseurs hématopoïétiques de souris γ_c^- corrige le déficit immunitaire après la réintroduction de ces cellules modifiées. En 2000, Cavazzana et al font l'expérience d'un transfert ex vivo du gène γ_c dans les CD34⁺ de deux jeunes enfants (11 et 8 mois) atteints de XDICS (Cavazzana-Calvo M., 2000). A J15 et J30 respectivement après l'injection des cellules traitées sans conditionnement ablatif ou immunosuppresseur, ils observent l'expression de γ_c par PCR dans le sang périphérique. Le nombre de lymphocytes augmente à partir de J30 pour l'un et J60 pour l'autre pour ensuite progresser avec le temps (Figure 1010), même observation

pour les capacités de prolifération. Les taux d'anticorps sont normaux, même si on retrouve peu de cellules B porteuses du gène transféré. Une amélioration clinique des deux patients est observée grâce à la reconstitution du système immunitaire.

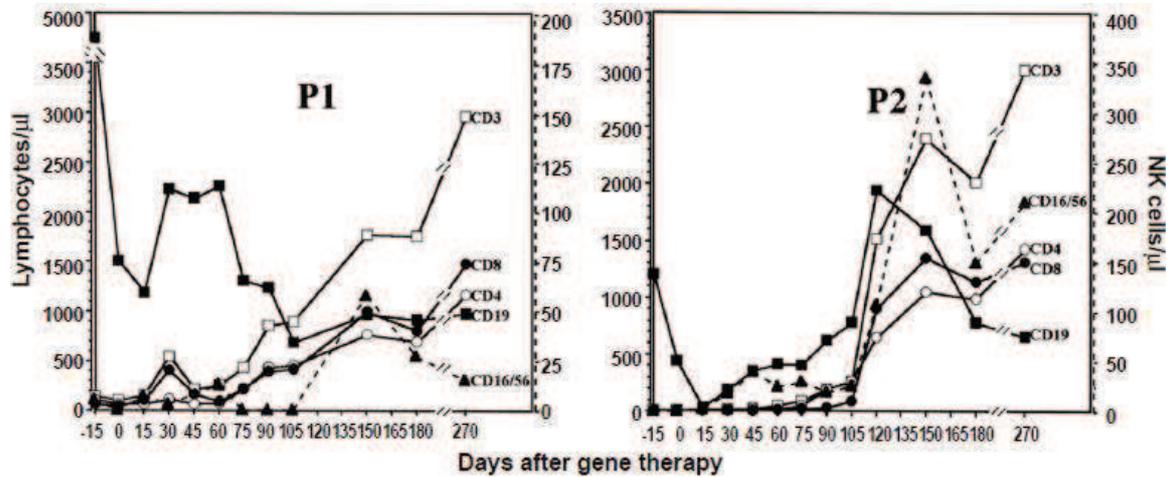


Figure 10 : Etude longitudinale des différents types de lymphocytes provenant du patient 1 (P1) et du patient 2 (P2). Les valeurs absolues des cellules T, B et NK sont montrées en fonction du temps (le jour 0 correspond au début du traitement) (Cavazzana-Calvo M, 2000).

Dans une nouvelle étude, cinq patients atteints de XDICS sont traités par injection de cellules CD34⁺ autologues transgéniques γ_c^+ (Hacein-Bey-Abina, 2002). En quatre mois, des lymphocytes transduits circulaient dans le sang pour 4 enfants sur 5, ce délai est comparable avec l'étude ci-dessus et avec les greffes haplo identiques T déplétées. Le nombre et le phénotype des cellules T (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, ...), la diversité du TCR, les tests de prolifération lymphocytaire aux différents mitogènes sont tous très proches des valeurs normales deux ans et demi après le traitement. Comme dans l'étude précédente, les taux d'anticorps après immunisation étaient suffisants pour permettre un arrêt des immunoglobulines IV, même si le nombre de cellules B modifiées génétiquement restaient rares. Aucun incident majeur n'est observé durant la procédure.

Le déficit en ADA est la première maladie monogénique qui a bénéficié de la thérapie génique et les premières études cliniques sur des patients ADA-DICS se sont déroulées dans les années 90. La stratégie est la même, c'est-à-dire la transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues transduites par un vecteur (retrovirus) codant l'adéosine déaminase. Une amélioration des réponses antigènes dépendantes, des titres d'isohémagglutinines et des taux d'ADA dans les lymphocytes est observée, mais le bénéfice clinique de la thérapie génique n'est pas clairement montré à cause de l'administration de PEG-ADA durant toute l'étude. Cependant, des essais ont mis en évidence la persistance des cellules modifiées plusieurs années après le traitement.

En 2002, une augmentation (10 fois plus) des cellules transduites en périphérie est observée suite à l'arrêt du PEG-ADA chez un patient, à cause de complications (Aiuti, 2002a). Par conséquent, la pression sélective des progéniteurs modifiés est meilleure en absence de traitement de substitution enzymatique. En Italie, 15 patients déficients en ADA bénéficient de la thérapie génique, en raison de l'absence de donneur compatible pour une HSCT ou du coût du traitement par PEG-ADA (Aiuti, 2002b). Ils ont eu un conditionnement réduit par busulfan et le PEG-ADA a été stoppé pour laisser la priorité à la thérapie génique. Les premiers résultats montrent le succès de l'opération avec la présence de 50 à 90% de cellules lymphoïdes marquées, la circulation de cellules T naïves et les tests de prolifération aux mitogènes et aux alloantigènes normaux. Les taux d'ADA sont inférieurs à la valeur normale mais restent suffisants pour empêcher l'accumulation des métabolites toxiques (Aiuti, 2009). En 2003, une étude similaire est lancée au Royaume-Uni et a montré des résultats identiques (Gaspar, 2006). Pour résumer, la thérapie génique a permis de traiter plus de 30 ADA-DICS, avec des reconstitutions immunitaires partielles ou totales pour la plupart des patients, et avec un taux de survie globale de 100%.

Malheureusement, des événements indésirables majeurs se sont produits chez deux patients atteints de XDICS dans le groupe français (Hacein-Bey-Abina, 2003). 3 ans après la thérapie génique, les deux plus jeunes enfants ont développé des populations clonales de cellules T avec des caractéristiques identiques aux leucémies (Figure 11). Les deux clones portaient le gène γ_c et montraient des insertions du retrovirus à proximité du promoteur de l'oncogène *LMO2* (chromosome 11) conduisant à une dérégulation et une expression aberrante de la protéine. *LMO2* joue un rôle important de contrôle de l'hématopoïèse. Des expressions aberrantes de *LMO2* ont déjà été retrouvées dans des leucémies aiguës de l'enfant. Par la suite, les autres patients de l'étude ont été monitorés et une insertion supplémentaire proche de *LMO2* a été retrouvée chez un enfant, actuellement sans prolifération clonale. Jusqu'à présent, aucun événement de ce genre n'a été observé pour les ADA-DICS traités par thérapie génique.

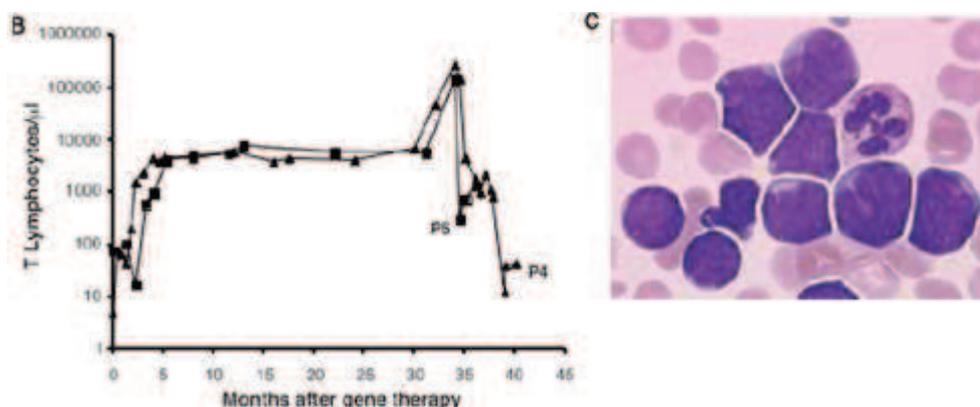


Figure 11 : (B) Profils cinétiques des cellules T du patient P4 (triangles) et du patient P5 (carrés), qui ont développé une prolifération lymphocytaire T incontrôlée. Le jour 0 correspond au début du

traitement par thérapie génique. (C) Un frottis sanguine, coloré au MGG, du patient 4 à 34 mois montrant des blastes lymphoïdes (grossissement, 1000x) (Hacein-Bey-Abina, 2003).

5.7.3 Traitement de substitution enzymatique

Le traitement de substitution enzymatique est la première solution thérapeutique utilisée, parmi les trois disponibles actuellement, pour traiter les déficits en ADA. Dès 1986, des malades en bénéficient et maintenant de nombreux patients ont reçu ce médicament. Polmar et al démontrent *in vitro*, qu'en additionnant des érythrocytes normaux (ADA +) avec des lymphocytes (ADA -) d'un patient ADA-DICS, les capacités de prolifération en présence de mitogène se rétablissent (Polmar, 1975). Pour la première fois, un traitement par remplacement enzymatique est suggéré pour traiter cette maladie. Initialement, les patients recevaient des transfusions itératives de culots érythrocytaires tous les 2 à 4 semaines. Les premiers résultats indiquaient une amélioration de la clinique et des fonctions immunitaires (qualitativement et quantitativement). Cependant, l'efficacité est transitoire et les risques de la transfusion au long terme sont importants (surcharge en fer, infections virales, séjours à l'hôpital, ...). Après l'introduction du PEG-ADA, des études comparatives montrent sa supériorité par rapport aux transfusions pour le remplacement enzymatique des déficits en ADA (Bory, 1990).

Le traitement de substitution enzymatique par le PEG-ADA (commercialisé sous le nom d'ADAGEN®) pour traiter le déficit en ADA, est disponible depuis plus de 20 ans et un médicament orphelin. Les médicaments dits « orphelins » sont des médicaments destinés au traitement des maladies rares non développés par l'industrie pharmaceutique pour des raisons de rentabilité mais répondent à un besoin de santé publique. Le PEG-ADA fournit une alternative aux autres traitements, bien qu'il ne s'agisse pas d'une solution curative puisque son efficacité nécessite des injections intramusculaires régulières.

La PEGylation est un procédé de chimie organique, qui consiste à attacher des chaînes de polyéthylène glycol (PEG) à une molécule, par exemple une protéine enzymatique. Le PEG n'est ni toxique ni immunogène. L'attachement du PEG à l'ADA lui confère de nombreux avantages thérapeutiques principalement grâce à l'augmentation du poids moléculaire : protections vis-à-vis de la protéolyse, de l'élimination rénale, de la liaison des anticorps et immunogénicité réduite. Ainsi la durée de vie est allongée de quelques minutes à plusieurs jours permettant de réduire la fréquence d'administration et les doses du médicament et donc de diminuer les coûts et le nombre d'injection. En 1986, Hershfield et al utilisent pour la première fois de l'ADA issu des intestins de bovins PEGylé pour traiter deux enfants ADA-DICS (Hershfield, 1987).

Le PEG-ADA s'administre par voie intramusculaire une à deux fois par semaine. Le pic d'activité est obtenu 24 à 48h après l'injection et la durée de demi-vie varie de 3 à 6 jours. La

variabilité interindividuelle de la pharmacocinétique nécessite un suivi grâce à des dosages répétés de l'activité plasmatique de l'ADA. Ce monitoring permet d'adapter les doses et la fréquence des administrations. L'absorption cellulaire du PEG-ADA est très faible, mais le maintien des niveaux d'ADA supérieur à 100 fois la normale permet de contourner ce problème et donc de corriger les anomalies métaboliques (diminution des métabolites toxiques, ...) en 1 à 3 mois après le début du traitement. L'efficacité du PEG-ADA varie en fonction de certains paramètres comme l'âge de début du traitement, l'état clinique de l'enfant, l'activité thymique résiduelle (Booth and Gaspar, 2009). Environ 20% des patients ne répondent pas au traitement. Pour les répondeurs, les fonctions immunitaires sont rapidement et partiellement retrouvées après l'administration du PEG-ADA. Mais cet effet ne persiste pas dans le temps et est suivi d'une décroissance du nombre de lymphocytes T. Pour 50 % des patients traités par PEG-ADA, les injections d'immunoglobulines IV sont encore nécessaires. Egalement, 50% des patients répondent normalement aux tests de proliférations en présence de mitogène. Bien que la reconstitution immunitaire ne soit pas entière et durable, il est important de préciser que la majorité des patients traités depuis de nombreuses années va cliniquement bien même si le nombre de cellules T reste faible (indemne d'infection et croissance normale). Mais lorsque le système immunitaire devient trop faible (lymphopénie T trop profonde), les patients peuvent développer des affections opportunistes comme un lymphome de Hodgkin, un lymphome de Burkitt, lymphome cérébral.

Au jour d'aujourd'hui, pas de réactions toxiques ou d'hypersensibilité n'ont été décrites avec l'ADAGEN®. Des symptômes de dérégulation immunitaire (anémies hémolytiques auto-immunes, thrombopénies immunes) peuvent apparaître lors la reconstitution des fonctions immunitaires. L'évènement indésirable majeur est l'apparition d'anticorps IgG anti-ADA. Dans seulement 10% des cas, ces anticorps ont un effet inhibiteur et conduisent à une clairance augmentée du médicament. On peut alors voir une diminution des fonctions immunitaires et métaboliques de ces patients lorsque le niveau d'inhibiteur est trop important, nécessitant alors une modification de la prise en charge (augmentation des doses, induction d'une tolérance, ...).

A ce jour, la greffe de cellules souches hématopoïétiques reste la meilleure et parfois l'unique solution pour traiter durablement tous les différents DICS (taux de survie > 90 % avec des donneurs apparentés compatibles et reconstitution immunitaire efficace). L'amélioration de la préparation des greffons et des procédures, a permis d'augmenter considérablement les taux de survie des patients traités de cette manière. De plus, d'autres solutions thérapeutiques existent pour certains DICS. Par exemple, la thérapie génique a montré son efficacité dans le XDICS et ADA-DICS voir sa supériorité en comparaison avec les greffes incompatibles et avec le traitement par PEG-ADA, et pourrait être une excellente alternative. Cependant, l'apparition d'évènements indésirables majeurs (hémopathies malignes) a mis un coup d'arrêt aux essais thérapeutiques. La thérapie génique reste utilisable en fonction du

rapport bénéfice/risque ou lorsque les autres solutions ne sont pas disponibles (cout trop élevé du PEG-ADA ou absence de donneur compatible). D'autres vecteurs plus sécurisants (lentivirus) sont en préparation pour les prochaines études cliniques. Les traitements de substitution enzymatique sont uniquement disponibles pour traiter les déficits en ADA. Le PEG-ADA est bien toléré et peut restaurer partiellement les fonctions immunitaires, au moins jusqu'à un niveau protecteur. Mais les suivis au long terme suggèrent que cette reconstitution incomplète s'altère avec le temps, bien que la majorité des patients reste cliniquement bien. Le PEG-ADA est une alternative importante dans la prise en charge des déficits en ADA, permettant un traitement au long court quand aucun donneur n'est disponible ou une stabilisation des patients avant une greffe. La réalisation d'un arbre décisionnel est difficile et dépend souvent des préférences personnelles, des expériences des unités de soins et de la disponibilité des traitements.

5.7.4 Les traitements annexes

Les patients atteints d'un DICS sont incapables de mener une réponse humorale spécifique contre un pathogène. Les injections IV d'immunoglobuline permettent de compenser ce déficit. Elles peuvent être rapidement instaurées afin de fournir une protection contre les bactéries et les virus. De nombreux patients traités par PEG-ADA, HSCT ou thérapie génique bénéficient toujours de ces injections en raison de l'échec de la greffe des cellules B (Bonilla., 2015).

Des mesures d'isolement doivent être prises vis-à-vis des patients avérés ou suspectés DICS, afin de les protéger de l'exposition aux agents pathogènes. En effet, l'absence d'infection est un élément important pour la réussite de la greffe (voir ci-dessus) (Bonilla, 2015).

La pneumocystose, infection par *Pneumocystis jirovecii*, est une complication courante et grave des enfants DICS. Le BACTRIM® (triméthoprime/sulfaméthoxazole) doit être administré en prophylaxie pour ces patients (5 mg/kg/j par voie orale 3 fois par semaine) (Bonilla, 2015). Une prophylaxie par fluconazole ou itraconazole est couramment prescrite pour lutter contre les infections fongiques.

Dès les premiers signes d'infection, les investigations doivent être larges et rapidement mener. Les antibiotiques à spectres étendus doivent être utilisés si la mise en évidence de la bactérie est incertaine ou retardée. Pour finir, les traitements anti-infectieux seront prolongés car la clairance des agents infectieux est diminuée chez les patients atteints d'un déficit immunitaire (Bonilla, 2015).

La vaccination des personnes atteintes d'une immunodépression congénitale présente des particularités qui justifient des recommandations spécifiques. En ce qui concerne les DICS, tous les vaccins vivants sont formellement contre indiqués et les vaccins inactivés sont inefficaces (HCSP, 2012) jusqu'à la reconstitution immunitaire post-greffe.

6 Le dépistage néonatal

6.1 Introduction

Les programmes de dépistage néonatal ont commencé dans les années 1960, avec le développement de tests sensibles pour dépister la phénylcétonurie, maladie métabolique innée. Non traités, les enfants affectés souffrent de troubles mentaux majeurs irréversibles à cause de l'accumulation de phénylalanine. Une alimentation pauvre en phénylalanine rapidement après la naissance permet une réduction des symptômes et un développement normal des enfants. Les analyses se font sur une goutte de sang séché prélevée au talon du nouveau-né, 72H après la naissance. Le sang est collecté sur un papier absorbant, aussi appelé buvard ou Guthrie, facilement transportable et peu coûteux. Le test du Guthrie a permis le développement des dépistages néonataux dans les pays développés. Introduit en France en 1978 pour la phénylcétonurie, il permet actuellement de détecter 4 maladies génétiques supplémentaires : hypothyroïdie congénitale, hyperplasie congénitale des surrénales, mucoviscidose et la drépanocytose (dépistage ciblé pour ce dernier).

Par définition, le dépistage néonatal consiste à identifier parmi tous les nouveau-nés, ceux qui sont susceptibles d'être affectés d'une maladie. Et en bénéficiant d'un diagnostic précoce, ils auront accès à un traitement ou une prise en charge efficace pouvant modifier l'évolution de la maladie avant l'apparition des lésions irréversibles.

Les critères d'un DNN sont variables selon les pays. En France ils répondent à trois grands objectifs :

- « égalité » c'est-à-dire un accès identique de tous les nouveau-nés aux tests de dépistage et à la prise en charge thérapeutique, en France métropolitaine ou d'outre-mer.

- « efficacité » avec des tests de dépistage à la fois sensibles et spécifiques, pour limiter le nombre de faux négatifs (enfants malades non dépistés) et de faux positifs (enfants dépistés mais non malades).
- « utilité » c'est-à-dire un bénéfice direct pour le malade. Par conséquent, ces programmes ne se soucient que des affections dont le diagnostic précoce permet une amélioration du pronostic. En France, le DNN est en accord avec les critères de dépistages en population générale, appelés critères de Wilson et Jungner, édités par l'OMS en 1968 (Wilson and Jungner, 1968) :
 1. la maladie doit être un problème important de santé ;
 2. on doit disposer d'un traitement ;
 3. il faut organiser le diagnostic et le traitement des malades ;
 4. la maladie doit être reconnue à un stade pré-symptomatique ;
 5. la confirmation du dépistage par des méthodes de certitude est obligatoire ;
 6. le test doit être accepté par la population ;
 7. l'histoire naturelle (évolution) de la maladie doit être comprise ;
 8. le protocole de traitement doit être défini ;
 9. le rapport économique coût/bénéfice doit être apprécié ;
 10. la pérennité du programme doit être assurée.

A la suite de plusieurs conférences, d'autres critères ont été ajoutés, sans modifier les principes de base du DNN, comme : l'information de la famille, la confidentialité des résultats, une prévalence suffisante de la maladie dépistée, le recueil simple de l'échantillon biologique, ... En France, presque 100% des enfants bénéficient du DNN bien qu'il ne soit pas obligatoire.

En ce qui concerne les DICS, des traitements efficaces (HSCT, thérapie génique, substitution enzymatique) existent. La survie est nettement meilleure lorsque ce traitement est mis en place avant 3.5 mois (96%, contre 66% après 3.5 mois), c'est-à-dire avant l'apparition des complications infectieuses. Mais en général, le diagnostic de DICS est posé après l'âge de 3.5 mois (6.6 mois en moyenne), puisque les enfants naissent asymptomatiques. Uniquement 10% de ces patients ont des antécédents familiaux et peuvent bénéficier d'un dépistage anténatal ou néonatal et donc, d'un traitement précoce. Par conséquent, le seul obstacle reste le développement d'un dépistage néonatal généralisé pour assurer un diagnostic rapide de tous les bébés. En effet, le DICS remplit les critères généraux pour un dépistage néonatal (MMWR, 2004) :

- il est asymptomatique à la naissance ;
- il est fatal avant l'âge de 1 an en l'absence de traitement ;
- des traitements existent ;
- la survie est meilleure si le traitement est effectué avant 3.5 mois ;
- il existe des tests de dépistage efficaces.

L'établissement rapide d'un diagnostic de DICS permet également de diminuer les durées d'hospitalisation et les traitements annexes liés aux complications (50000 \$ pour une greffe avant 3.5 mois et 1 à 2 millions \$ pour une greffe plus tardive).

6.2 Les méthodes de dépistage

Au vu de l'organisation actuelle du DNN, il est souhaitable que les tests se fassent sur le Guthrie (déjà utilisé dans nos laboratoires). Ces tests devront être à la fois hautement sensibles (pour éviter les faux négatifs) et spécifiques (pour ne pas surcharger le système de santé par les faux positifs et ne pas générer trop d'anxiété générée par l'annonce du contrôle ou des examens complémentaires nécessaires). De plus, la rareté des DICS oblige une valeur prédictive négative extrêmement élevée (ou VPN, la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif). La faisabilité du test à haut débit et le faible coût unitaire sont d'autres caractéristiques importantes pour implémentation du dépistage.

Les tests de dépistages se basent sur la particularité qu'ont les patients DICS de ne pas produire un nombre normal de lymphocytes T, mais doivent prendre en compte la présence possible de cellules T maternelles greffées et la présence de lymphocytes B dans des phénotypes T-B⁺. Différentes approches ont été proposées pour mettre en évidence ce déficit et sont résumées dans le Tableau 3.

Method	Platform	DBS	Preliminary published data	Comment	Investigators
CBC and differential for absolute lymphocyte count (ALC)	Hospital clinical laboratory test on liquid cord blood	No	Most SCIDs have low ALC, ² high false-negatives and false-positives	Expensive, decentralized; manual differential count may be required	A. Knutsen, R. Buckley
Absent TRECs	DNA copy number by quantitative PCR	Yes	Sensitive, but samples with inadequate DNA limit specificity ¹⁴	Inadequate samples have low DNA (low TRECs and genomic actin copies)	J. Puck, K. Chan, D. Gonzalez, S. Panny
Absent TRECs in 2 separate samples	DNA copy number by quantitative PCR	Yes	Sensitive and specific ¹⁴	Maryland, 11 more states now mandate 2 samples	J. Puck, S. Panny, K. Chan
IL-7 immunoassay	ELISA or other method	Yes	Limited data, ¹⁶ blood interference with detection	Possible 2nd tier test with TRECs	S. McGhee
Low CD3 (multiplex) immunoassay	Luminex	Yes	None	Might extend with additional antibodies, define a SCID signature profile	K. Pass
Microarray mutation detection	DNA on Affymetrix custom resequencing array	Yes	None	Possible 2nd tier test; specific gene diagnosis, but may have false-negatives	J. Puck, T. Lebet, E. Mansfield, J. Warrington

Tableau 3 : Les différentes méthodes de dépistage proposées pour les DICS (Puck and SCID Newborn Screening Working Group, 2007)

La numération des lymphocytes, introduite par Buckley en 2001 (Buckley RH, 2004) lors de la conférence intitulée « Applying Public Health Strategies to Primary Immunodeficiency Diseases », n'est pas utilisable. A première vue, la NFS semble une bonne méthode de dépistage puisque elle est peu chère, rapide et très répandue dans nos laboratoires, mais certains patients gardent des valeurs normales à cause de la présence de

lymphocytes B ou de lymphocytes maternels. En effet, les données montrent que la majorité des DICS est dépistée mais il y a toujours un nombre important de faux positifs et de faux négatifs. De plus, un compte manuel est parfois nécessaire (forte variabilité interindividuelle) et on ne peut pas utiliser le Guthrie avec cette méthode.

La recherche et la mise au point de nouveaux tests de dépistage des DICS sur buvard ont commencé aux Etats-Unis à partir de 2005 avec la quantification des TRECs (T-cell receptor excision circles) et le dosage de l'interleukine 7.

Jusqu'en 1998, il n'y avait aucun moyen de différencier phénotypiquement les cellules produites récemment par le thymus (appelées RTE, recent thymic emigrants) et les cellules naïves de longue durée de vie, et donc de quantifier l'activité thymique. Les TRECs sont des séquences d'ADN excisées lors des réarrangements du TCR. Dans l'ensemble des cellules exprimant le TCR $\alpha\beta$, les réarrangements des gènes *TCRA* et *TCRB* produisent des TRECs, mais ils sont tous différents les uns des autres en raison de l'énorme variabilité de recombinaison de *TCRAVJ* et *TCRBVDJ*. Par conséquent, ils ne peuvent pas être quantifiés et donc utilisés comme marqueur de l'activité thymique. Cependant, un évènement est nécessaire pour le réarrangement du gène *TRCA*, et correspond à la délétion du gène *TCRD* qui se situe dans le locus du *TCRA* avec la production de deux TRECs : un signal joint TREC et un coding joint TREC (Figure 12). C'est deux TRECS sont identiques et présents dans 70% des réarrangements des *TCRA*.

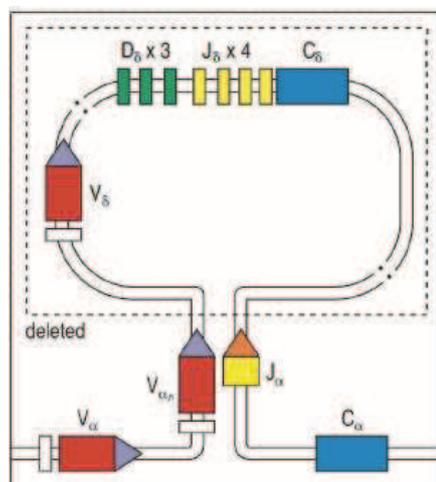


Figure 12 : Délétion du gène *TCRD* est induit par le réarrangement du gène *TCRA* au niveau des segments V_α et J_α , formant un TREC contenant une séquence commune (Murphy, 2012).

La quantification des TRECs permet donc de quantifier la sortie des lymphocytes T matures naïfs du thymus (Douek DC, 1998). Ils sont stables et ne sont pas dupliqués mais dilués pendant les mitoses. Les TRECs sont détectés dans les cellules naïves et on ne les trouve pas dans les T mémoires, ni dans les B, ni dans les T $\gamma\delta$. Les TRECs diminuent avec l'âge alors

que la diminution des cellules T naïves est moins nette. Le nombre de TRECs ne dépend pas des cellules maternelles transférées puisque ce sont généralement des lymphocytes mémoires (absence de TRECs). En résumé, la quantification des TRECs dans les lymphocytes du sang périphérique est une bonne mesure des RTE : la thymopoïèse va augmenter les TRECs, l'expansion périphérique ou l'absence de thymopoïèse les diminuer.

En 2005, Chan et Puck propose et développe une technique de quantification des TRECs pour le dépistage des DICS (Chan K. and Puck, 2005). Il s'agit d'une PCR quantitative temps réel amplifiant les extrémités jointes δ Rec- ϕ J α des TRECs sur du sang séché recueilli sur une carte de Guthrie pour mimer le dépistage néonatal déjà en place. Une PCR du gène de la β -actine sert de contrôle de l'extraction et de l'amplification de l'ADN. Bien que simple à prélever, le contenu en ADN des buvards varie largement entre deux échantillons ou entre deux poinçons d'un même échantillon. Malgré tout, les résultats montrent une forte corrélation positive entre les TRECs et le contenu en ADN ; les copies de β -actine et le contenu en ADN ; les TRECs et les copies de β -actine. Les données démontrent que la méthode est reproductible sur un échantillon donné et dans le temps. De nombreux sangs d'adultes (164) et de cordon (740) sont testés et le nombre de TRECs est nettement supérieur dans ce dernier. Pour s'assurer que l'ADN a bien été amplifié dans les deux groupes, les TRECs sont normalisés par le nombre de copies de β -actine (rapport TRECs/ β -actine). On retrouve des résultats identiques avec une moyenne 4 fois plus élevée pour le sang de cordons (0.0109, contre 0.0024 pour les adultes). Les TRECs sont indétectables ou très bas (<30) dans du sang adulte déplété en lymphocytes T et chez 23/23 des patients atteints de différentes formes de DICS (Figure 1313). L'équipe de Chan et Puck a testé également des cartes de Guthrie de 2 unités de pédiatrie (routine et soins intensifs) et a montré qu'il existait des faux positifs et des résultats indéterminés (dus à une mauvaise quantité ou qualité d'ADN), c'est-à-dire des patients qui n'ont pas de TRECs mais qui ne sont pas des DICS. Par conséquent, la méthode est très sensible mais manque de spécificité. McGhee démontre également que le paramètre clé pour optimiser le dépistage des DICS est le taux de faux positifs (McGhee SA, 2005a). L'acceptabilité du test devra passer nécessairement par une amélioration de la spécificité et donc de la valeur prédictive positive. L'analyse des TRECs est très intéressante pour le dépistage néonatal des DICS car : les TRECs sont le reflet exact de l'activité thymique de l'enfant, ils sont stables et quantifiables sur du sang séché et un dépistage à haut débit peut être mis en place permettant un coût par test faible.

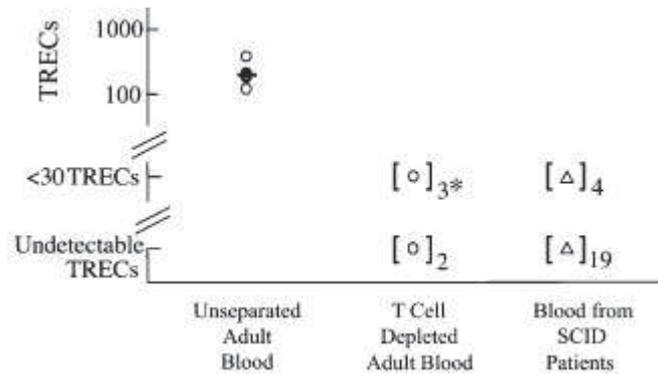


Figure 13 : Valeurs des TRECs sur des buvards de sang non modifié contre du sang dépleté en cellules T (cercles) et du sang de patients atteints de DICS (triangles). La barre représente la moyenne des échantillons répétés à partir du même sujet ; *échantillons ayant la même valeur sont entre parenthèses (Chan K. and Puck, 2005).

Les principaux obstacles à une implémentation du dépistage par l'analyse des TRECs restent les taux élevés de faux positifs et de résultats indéterminés. De nouvelles stratégies sont proposées pour diminuer ces taux afin de rendre le niveau de rappels acceptable. En 2007, Puck a estimé que le pourcentage de résultats indéterminés était réduit à 0,1% si on refaisait le test une deuxième fois sur un 2^e prélèvement (Puck, 2007). La répétition de l'analyse sur le même échantillon peut également diminuer le nombre de résultats indéterminés.

Dans une autre étude, McGhee propose le dosage de l'interleukine 7 pour le dépistage des DICS (McGhee SA, 2005b). L'IL-7 est une cytokine impliquée dans la survie et la croissance des lymphocytes T, elle est augmentée chez les enfants atteints. Un ELISA adapté à l'analyse sur sang séché permet son dosage. Le test à une excellente spécificité (96.1%) meilleure qu'avec les TRECs (92.3%) mais une sensibilité trop faible (85%, contre 100% pour les TRECs) pour un seuil choisi à 15 pg/ml (Figure 1414). Dans une étude médico-économique précédente (McGhee SA, 2005a), McGhee avait estimé qu'une spécificité d'au moins 97% serait nécessaire pour le dépistage des DICS. En combinant l'analyse des TRECs et le dosage de l'IL-7, McGhee trouve une spécificité proche de 100%, suffisante pour permettre un DNN acceptable pour la population. Le coût supplémentaire d'un second test ne serait pas excessif car il ne serait requis que dans seulement 4% des cas. Cette stratégie nécessite d'être testée dans des études prospectives multicentriques afin de déterminer précisément l'incidence, la sensibilité, la spécificité et le coût d'un dépistage néonatal des DICS.

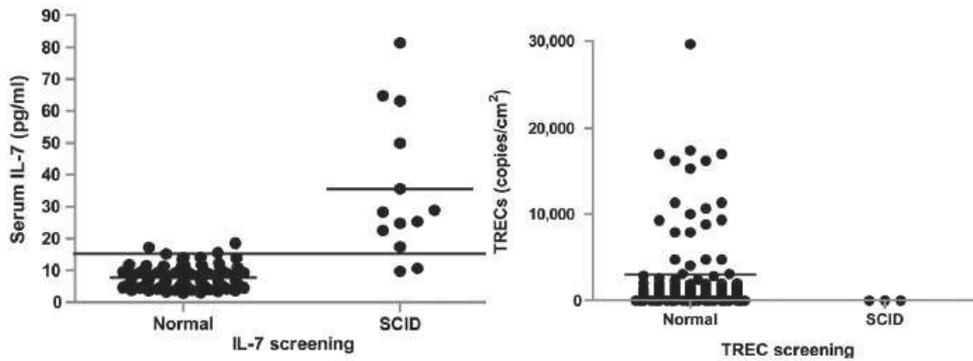


Figure 14 : Résultats du dépistage à l'aide du dosage de l'IL-7 et du dosage des TRECs. La ligne correspond à la valeur seuil de 15pg/mL pour le dépistage avec l'IL-7. La valeur des TRECs est exprimée en copies par centimètre carré de papier filtre (McGhee SA, 2005b).

Une autre alternative proposée consiste à quantifier les molécules CD3 et CD45 par un dosage par la technologie multiplex (xMAP® : multiple analyte profile développée par la firme Luminex® Corp) après élution à partir d'une carte de Guthrie (Janik, 2010). Le CD3 est un marqueur des lymphocytes T et le CD45 est un marqueur pan-leucocytaire et sert de contrôle interne pour la technique. C'est la première fois que des marqueurs de surfaces des cellules T sont utilisés pour identifier les déficits immunitaires chez les nouveau-nés. Dans cette étude, les résultats sont concordants avec ceux des TRECs et ceci suggère que ce test pourrait être une alternative au dépistage des DICS. Actuellement, la technique est beaucoup trop longue pour tester en routine un nombre important d'échantillons, mais le développement d'un kit optimisé est envisageable. Cette technologie nécessite d'être testée sur des études plus grandes.

Quant à la détection des mutations par puces à ADN ou micro-array (Warrington, 2002), on ne connaît actuellement pas l'anomalie moléculaire à l'origine de tous les déficits. Cette approche ne permet donc pas un dépistage de tous les DICS même si elle a l'avantage de donner directement l'anomalie génétique responsable du déficit.

Au final, la méthode retenue et utilisée par toutes les équipes pour le dépistage néonatal des DICS est la méthode de quantification des TRECs. Cette méthode est bien une méthode de dépistage et non une méthode diagnostique. Le diagnostic de DICS sera porté après exploration complémentaire des enfants pour qui le test de dépistage est positif avec une numération formule sanguine et l'exploration des sous-populations lymphocytaires en cytométrie de flux (test diagnostique gold standard dont le résultat peut être obtenu dans la journée sur une petite quantité de sang : 750 µL minimum pour une numération formule sanguine et une exploration des sous-populations lymphocytaires).

6.3 Le dépistage néonatal généralisé des DICS aux Etats-Unis

Malheureusement comme nous l'avons vu auparavant, la plupart des enfants atteints de DICS ne sont pas identifiés avant la survenue des infections. En théorie, un dépistage néonatal généralisé permettrait de remédier à ce problème. Une uniformisation des pratiques ainsi qu'une modernisation du dépistage néonatal est en cours aux Etats-Unis afin d'augmenter le nombre de maladies génétiques détectées par le test de Guthrie. Depuis 2001, des groupes d'experts se réunissent (CDC 2001 et 2004 ; National Institute of Health 2002 ; Jeffrey Modell Foundation 2006)) pour discuter de l'addition des DICS aux panels des maladies dépistées par le buvard, puisqu'ils remplissent les principaux critères d'un dépistage généralisé (voir ci-dessus), mais à ce moment aucun test n'est suffisamment bon pour une large utilisation. Par conséquent, différentes techniques de dépistages sont développées en parallèle. En 2005, Chan et Puck proposent avec succès un dosage des TRECs, permettant de distinguer les enfants atteints de DICS des patients normaux, sur les buvards déjà utilisés quotidiennement dans le cadre du dépistage néonatal (Chan K. and Puck, 2005). De plus, une étude coût/bénéfice hypothétique, menée par McGhee (McGhee SA, 2005a), montre que le dépistage des DICS serait acceptable et bénéfique pour la population si les tests étaient suffisamment spécifiques. En 2006, le « American College of Medical Genetics », à travers un rapport détaillé soutenu par le ministère de la santé américaine (« United States Department of Health and Human Services »), est favorable à une expansion du dépistage néonatal et notamment à l'implémentation du dépistage des DICS dans celui-ci si des études sont menées. En novembre 2006 à Atlanta, le « Center for Disease Control and Prevention » recherche des partenaires pour avancer le projet du dépistage des DICS, après quoi le Wisconsin annonce le souhait de piloter un tel programme. En même temps, le « New England Newborn Screening Program » convient de deux meetings en 2007 réunissant des groupes de travail comprenant des immunologistes, des infectiologues, des spécialistes des transplantations et des experts du DNN et de la santé publique afin de discuter et de partager les connaissances à propos des DICS. En 2008, les états du Wisconsin et du Massachusetts reçoivent les fonds du CDC pour le développement et l'évaluation du DNN des DICS. Les études pilotes du Wisconsin et du Massachusetts ont débuté en 2008 et en février 2009 respectivement.

6.3.1 Les premières études pilotes

Le 1^{er} janvier 2008, le Wisconsin démarre une étude pour déterminer si la quantification des TRECs utilisant une PCR quantitative en temps réel sur de l'ADN extrait de sang séché (buvard) permettrait de détecter les DICS et les lymphopénies T dans un programme de dépistage à l'échelle de l'Etat (Routes, 2009). Tous les enfants nés dans le Wisconsin ont été dépistés au cours de l'année 2008, 71000 naissances. Brièvement, l'amplification des δ Rec- ϕ J α TRECs et de la β -actine par RT-qPCR se fait sur de l'ADN extrait à

partir de punch de sang séché de 3.2 mm. En se basant sur leurs études préliminaires, un seuil à 25 TRECs/ μ L correspondant au premier percentile est utilisé. Les résultats montrent que 0.22% ont dû être re-testés pour un dépistage positif ou pour un test ininterprétable (amplification de la β -actine insuffisante). Au final, pour 0.015% (soit 11 nouveau-nés), une étude des sous-populations lymphocytaires a été demandée. 3 patients avaient des sous-populations normales, aucun DICS n'a été trouvé, mais 2 lymphopénies T idiopathiques, 2 syndromes de Di George (dont un des deux enfants n'avait pas de défaillances cardiaques ou d'autre stigmate caractéristique), 3 malformations lymphatiques type chylothorax et une mutation du gène *RAC2* (des récentes études montrent l'importance des *RAC1* et *RAC2* dans le développement des cellules T) ont été observées.

L'autre étude du Massachusetts débute en février 2009, 77491 échantillons représentant 68811 nouveau-nés sont inclus (Comeau, 2010). Une technique maison proche de celle utilisée au Wisconsin, développée par le « New England Newborn Screening Program », est utilisée (Comeau, 2008). 5% des échantillons ont été re-testés en double à partir du premier buvard afin d'obtenir un résultat. 0.39% des enfants avaient un test de dépistage positif (soit 272 enfants dont 181 provenant d'unités de soins intensifs) c'est-à-dire 2 dosages sur 3 inférieures à la valeur seuil, et 0.24% des échantillons avaient un test non concluant. Sur les 272 enfants positifs pour le dépistage, 72% avaient un test de dépistage normal sur un 2^e buvard et 19% (51 enfants, soit 0.07% dont 49 issus d'un service de soins intensifs de néonatalogie) avaient les critères pour une évaluation des sous-populations lymphocytaires. Les autres étaient ou décédés ou en attente d'un 2^e test au moment de la publication, ou avaient subi une thymectomie. En pourcentage, le nombre d'exploration des sous-populations lymphocytaires est presque 5 fois plus important au Massachusetts qu'au Wisconsin à cause d'un nombre de prématurés dépistés plus important. En effet, l'ensemble des publications insiste sur le fait que le nombre de faux positifs ou non concluants augmente dans la population d'enfants nés prématurément. Dans l'état du Wisconsin, l'analyse des TRECs est répétée jusqu'à ce qu'elle soit normale ou jusqu'à ce que l'enfant ait atteint l'équivalent de 37 SA permettant ainsi de diminuer le nombre d'exploration et de consultation. 19 des 51 enfants (soit 37%) évalués pour les sous-populations lymphocytaires avaient effectivement une lymphopénie T et 63% étaient normaux. Pour rappel, 73% des examens de cytométrie étaient anormaux dans le Wisconsin. Les diagnostics suivants ont été portés : 4 syndromes de DiGeorge, 1 syndrome de Jacobsen, 2 thymectomies après chirurgie cardiaque, 9 lymphopénies T idiopathiques, 3 autres, mais aucun DICS. Ces 2 études n'ont pas retrouvé de DICS, mais compte tenu de la fréquence de la maladie, ce résultat n'est pas surprenant et ne reflète en aucun cas un manque de sensibilité du test. En revanche, elles mettent en évidence les lymphopénies T non DICS (probablement les plus marquées) associées à d'autres pathologies. Une limitation importante de ces 2 études est l'impossibilité d'estimer le nombre de naissances avec des lymphopénies T non DICS cliniquement significatives, et donc de calculer précisément la sensibilité et la spécificité de l'analyse des TRECs pour détecter ces déficits.

6.3.2 Les études médico-économiques

Le coût du test est relativement peu élevé, estimé approximativement à 5 \$/test (McGhee SA, 2005a ; Routes, 2009). L'incidence relativement élevée des lymphopénies T, le faible coût de l'analyse des TRECs et l'analyse hypothétique de McGhee (McGhee SA, 2005a) suggèrent que le dépistage néonatal généralisé des DICS peut avoir un bénéfice pour la population, mais des études médico-économiques formelles sont nécessaires. Chan grâce à un modèle Markov a évalué le rapport coût/efficacité d'un dépistage universel néonatal dans l'amélioration de la qualité de vie et de l'espérance de vie des enfants malades à travers une population testée dans cinq Etats (Chan, 2011). Le but est de montrer que le bénéfice d'une détection précoce des DICS excède le coût du dépistage en utilisant le coût des années de vie et le coût des années de vie ajustées à la qualité sauvées (traduction de l'expression « quality-adjusted life years » ou QALYs, un indicateur économique visant à estimer la valeur de la vie). Le coût global du dépistage correspond à la somme des coûts moyens estimés : le dépistage 4.22 \$/test (machine, laboratoire, réactifs), les tests de confirmations 250 \$ (NFS, immunophénotypages), le coût d'un greffe tardive, le coût d'une greffe précoce, le coût des visites médicales, le coût des hospitalisations, le coût des immunoglobulines IV 1070 \$/mois, le coût du transport 5 \$/visite, le coût de l'absentéisme des parents 16.50 \$/heure d'assistance. Le coût global dépend aussi grandement de l'incidence de la maladie, de la sensibilité et la spécificité du test. La valeur de l'utilité est exprimé en QALYs, où 1 QALY est défini comme une année de vie passée en parfaite santé. Le QALY pour les DICS est estimé à 0.91 après une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le coût annuel du dépistage des DICS aux USA est estimé à 22377379 \$/an pour une cohorte de 4112052 naissances (chiffre de 2003), puisque la différence entre les dépistés et les non dépistés est de 5.44 \$/enfant. Sur une perspective de 70 ans, le dépistage permettrait de gagner 880 années de vie ou 802 QALYs, soit un rapport coût (coût global)/efficacité (années de vie ou QALYs sauvés) = 25429 \$/année de vie ou 27907 \$/QALY (représentent le coût additionnel pour le gain d'un QALY entre une greffe tardive et une greffe précoce). Une analyse de sensibilité est réalisée permettant de mesurer l'importance des différents facteurs (incidence, sensibilité, spécificité, coût du test de dépistage, ...). Elle montre que l'incidence et la spécificité sont les variables les plus impactantes. Elle permet aussi de déterminer les valeurs pour lesquelles le coût d'un QALY sauvé est égal au prix d'acceptabilité pour un QALY (coût maximal acceptable par la société pour une année de vie en parfaite santé supplémentaire ; « willingness to pay » ou WTP). Dans la mesure où le prix d'acceptabilité pour un QALY n'est pas connu et qu'il existe aussi de l'incertitude sur les paramètres de l'analyse de sensibilité, l'analyse coût/utilité est représentée sur une courbe d'acceptabilité qui indique la probabilité que le programme à évaluer soit coût-efficace (en ordonnée) compte tenu de la disponibilité à payer de la société pour un QALY (en abscisse) (Figure 1515). Dans cette étude, 63000 \$/QALY est le point d'indifférence entre un dépistage ou non. Pour conclure, au prix estimé de leur dépistage 4.22

\$/enfant, le dépistage néonatal des DICS serait probablement un moyen coût/efficace pour améliorer la qualité et la durée de vie des enfants malades.

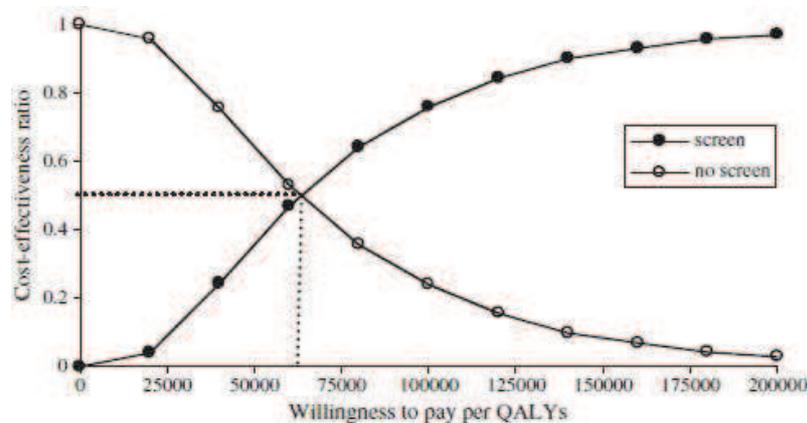


Figure 15 : Les incertitudes et les différentes dispositions à payer un QALY sont illustrés par une courbe d'acceptabilité (Chan, 2011).

Tout dernièrement, Yao Ding a réalisé l'étude médico-économique afin d'évaluer le rapport coût/efficacité et le bénéfice net de l'implémentation du dépistage néonatal des DICS par les TREC sur buvard dans l'Etat de Washington (Ding, 2016). L'analyse est faite sur une cohorte de 86600 naissances par an et les variables, issus de données publiées et d'avis d'experts, utilisées sont : l'incidence des DICS, la proportion d'enfants dépistés avec les antécédents familiaux, l'incidence des lymphopénies non-DICS, les caractéristiques du test (sensibilité, spécificité), les taux de survie, le coût du dépistage, le coût du diagnostic, le coût des traitements. Dans cette étude, ils ont analysé le rapport coût/efficacité du test qui fait état du nombre d'années sauvées et l'analyse du rapport coût/bénéfice en tenant compte de la valeur pécuniaire d'une mort évitée. Pour l'analyse coût/efficacité, le coût annuel du dépistage est estimé à 424470 \$/an, correspondant au prix global du dépistage (741376 \$) moins les économies de traitements faites grâce au dépistage (316905 \$). De plus, le nombre d'années de vie sauvées serait de 12.02 et donc le prix d'une année de vie sauvée serait de 35311 \$. La valeur économique d'une vie (« value of a statistical life » ou VSL) est estimée entre 4.2 et 9 millions de dollars. Par conséquent, le rapport bénéfice/coût est très favorable au dépistage universel des DICS et est calculé entre 2.71 et 5.31 respectivement (des bénéfices nets de 1.26 et 3.19 millions de dollars/an respectivement). Pour finir, leur modèle suggère donc que le dépistage des DICS à Washington est probablement coût/efficace et montre un bénéfice économique net.

6.3.3 Le bilan

En conclusion, la quantification des TRECs est une méthode à la fois sensible et spécifique, ayant un intérêt médico-économique pour dépister les DICS. Elle permet également de détecter les autres lymphopénies T plus ou moins sévères mais avec une sensibilité et une spécificité du test non connues précisément. Les deux études pilotes du Wisconsin et du Massachusetts ont montré la faisabilité du dépistage néonatal des DICS à grande échelle par la méthode des TRECs et des études médico-économiques ont prouvé son bénéfice pour la population. En janvier 2010, le comité fédéral consultatif américain pour les maladies héréditaires des nouveau-nés et des enfants (« Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children », qui fournit les conseils, les recommandations et les informations techniques en terme de dépistage néonatal directement au département de HHS), recommande, après de longues discussions et une revue de la littérature, l'inclusion des DICS au panel du dépistage néonatal. Il s'agit de la première addition au panel de base recommandée par l'ACHDNC. Kathleen Sebelius, secrétaire à la Santé et aux Services sociaux des États-Unis (HHS), approuve cette recommandation. Cette action a permis une adoption rapide de la détection des DICS par les programmes américains de dépistage néonatal, à charge de chaque état de l'organiser.

Depuis, de nombreux états ont inclus le dépistage des DICS dans leur panel de base. Une publication récente fait état de plus de 3030083 nouveau-nés dépistés dans 11 programmes de dépistage avec les TRECs entre 2008 et 2013 (Kwan, 2014). Cette méta-analyse présente les données de 5 ans de dépistage aux USA, où 52 cas de DICS (42 DICS typiques, 9 DICS atténués et 1 syndrome d'Omenn) ont été trouvés, soit une incidence globale de 1/58000 naissances (IC 95%, 1/46000-1/80000). L'incidence des DICS n'était pas significativement différente entre les états, mais à cause de la consanguinité, était nettement plus élevée (1/3500) dans la Nation Navajo (réserve indienne). Aucun DICS n'a été oublié par l'analyse des TRECs (excellente sensibilité du test). En plus, le dépistage a permis de détecter 411 enfants avec des lymphopénies T non DICS: 33% syndromes congénitaux (DiGeorge, trisomie 21), 28% conditions médicales (malformations cardiaques), 7% prématurité seule, 3% lymphopénies idiopathiques, pour le reste aucune information n'était disponible, soit une incidence estimée à plus de 1/7300. A la différence des DICS, l'incidence des lymphopénies T non DICS est très variable en fonction des différents états. Bien que tous les programmes de dépistage soient capables de détecter les cas de DICS avec des TRECs bas ou indétectables, il existe des différences dans les étapes intermédiaires. Les valeurs seuils des TRECs et des sous-populations lymphocytaires ne sont pas identiques partout et ces variations influent sur les taux de détection des lymphopénies T non DICS. Une harmonisation des définitions et du suivi des lymphopénies T non DICS est nécessaire. En 2013 le CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) (26) a élaboré des recommandations sur le dépistage néonatal des DICS. A côté des DICS, il existe d'autres conditions qui peuvent être associées à des valeurs de TRECs indétectables ou très basses. D'après le CLSI, on distingue :

- les DICS typiques caractérisés par moins de 300 lymphocytes T autologues/ μL et qui nécessitent un traitement par HSCT, thérapie enzymatique ou génique,
- les DICS atténués ou syndrome de Omenn sont des déficits hypomorphiques dans les gènes connus dans le DICS (300 à 1500 lymphocytes T autologues/ μL sans lymphocytes T maternels) et qui nécessitent aussi HSCT, thérapie enzymatique ou génique,
- les DICS variant avec une lymphopénie entre 300 et 1500 lymphocytes T autologues/ μL , pas de mutation connue, et une fonction T plus ou moins altérée et qui nécessiteront ou non une transplantation,
- les syndromes avec lymphopénies T secondaires (<1500 lymphocytes T autologues/ μL) comme le DiGeorge, le syndrome de CHARGE, le déficit en DOCK8 ou l'ataxie-télangiectasie. Certains nécessiteront une greffe, d'autres non.
- les lymphopénies T secondaires (<1500 lymphocytes T autologues/ μL) avec autres pathologies comme atrésie gastro-intestinale, chirurgie cardiaque avec ou sans thymectomie, leucémie néonatale...
- les enfants prématurés peuvent avoir une lymphopénie T (<1500 lymphocytes T autologues/ μL).

Dans le premier cas, DICS typique, les TRECs sont indétectables ou très inférieurs à la valeur seuil établie chez des enfants sains. Dans les autres cas, les valeurs de TRECs peuvent être basses ou indétectables mais peuvent également être dans les fourchettes attendues. La classification des causes de lymphopénies T associées à des valeurs de TRECs anormales détectées par le dépistage des DICS est résumée dans le Tableau 4.

	Definition of Condition		
	CD3 T Cells/ μL	Proliferation to PHA	Other Supporting Features
Primary Targets of Newborn Screening			
Typical SCID ^a	<300 (autologous)	<10% of normal	Detectable maternal T cells in peripheral blood; proven deleterious defect(s) in a known SCID gene
Leaky SCID ^a	300-1500, few naive T cells	Reduced (10%-50% of normal)	No maternal T cells detectable; incomplete defect(s) in a known SCID gene
Omenn syndrome	Oligoclonal T cells	Reduced (10%-50% of normal)	Erythroderma, hepatosplenomegaly, eosinophilia, and elevated levels of serum IgE antibody
Secondary Targets of Newborn Screening			
Syndrome with low T-cell numbers	Recognized genetic syndrome that includes low T-cell numbers within its spectrum of clinical findings		
Secondary T-cell lymphopenia	Congenital malformation or disease process without an intrinsic defect in production of circulating T cells		
Preterm birth alone	Preterm birth and low birth weight, with low T-cell numbers early in life that normalize over time		
Idiopathic T-cell lymphopenia, also called variant SCID	Low T-cell numbers without recognized cause; 6 programs used 300-1500 autologous T cells/ μL plus evidence of functional immune cell impairment, while other programs included infants with higher T-cell numbers (see Table 4). ^b		

Abbreviations: PHA, phytohemagglutinin; SCID, severe combined immunodeficiency.

^a As adopted by the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium and R48 Laboratory Performance Database, SCID and leaky SCID were defined by laboratory criteria rather than infectious complications.

^b On discovery of an etiology for low T cells, the affected individual was moved to the appropriate alternative category.

Tableau 4 : Classification des conditions associées à des valeurs basses de TRECs et de lymphocytes T, détectées par le dépistage néonatal des DICS (Kwan, 2014).

Grâce à un environnement dynamique, l'implémentation du dépistage des DICS a été rapide et exponentielle depuis les premières études pilotes du Wisconsin et du Massachusetts mais encore plus prononcée après 2010, date de la recommandation officielle (Figure 1616).

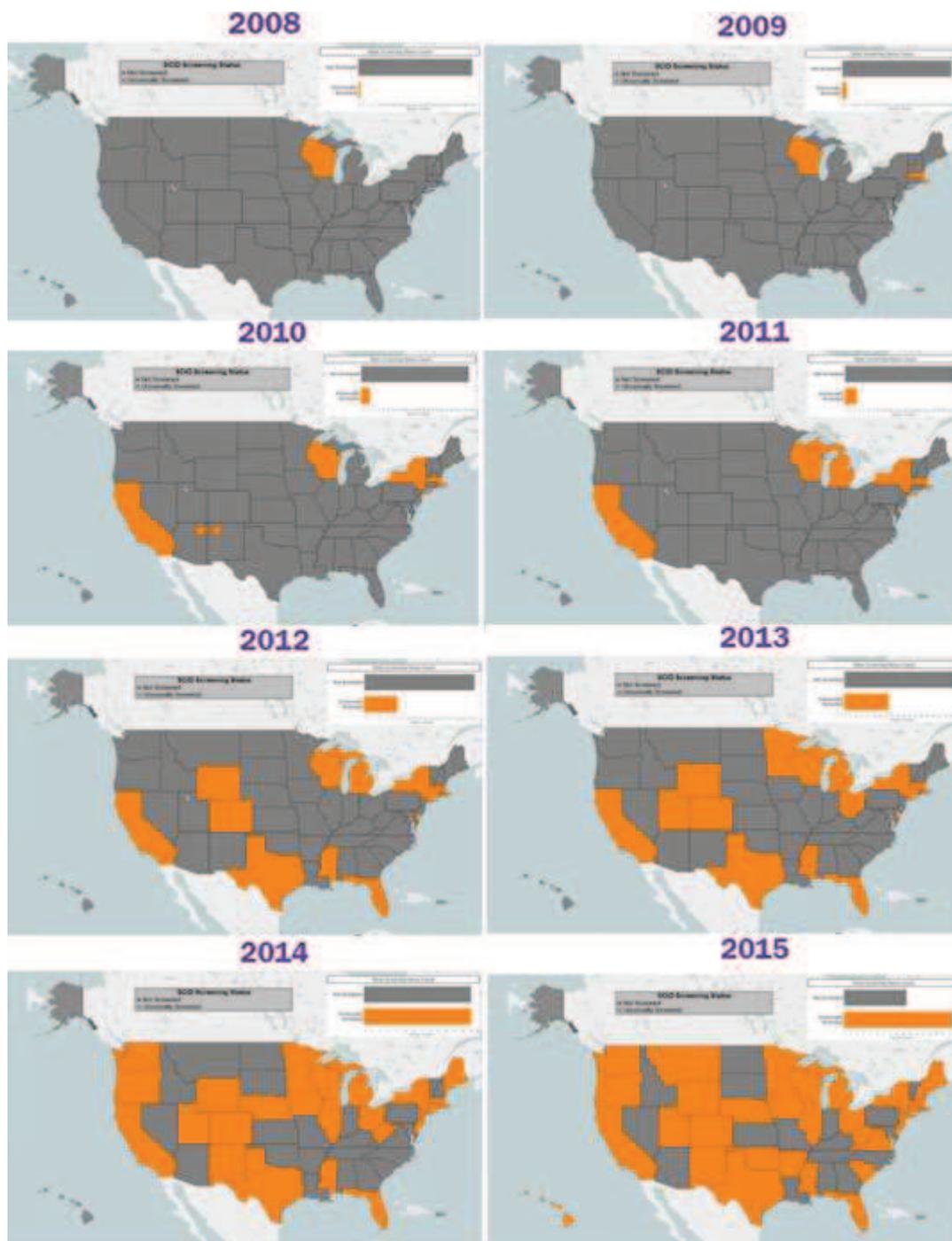


Figure 16 : Les progrès réalisés dans la mise en œuvre du dépistage des DICS (Ojodu, 2015).

En 2015, 72% des enfants sont nés dans les 32 états qui pratiquent le dépistage universel des DICS. A la fin de 2016, on estime que 86% des naissances pourront bénéficier d'un dépistage des DICS, soit 45 états (Figure 1717).

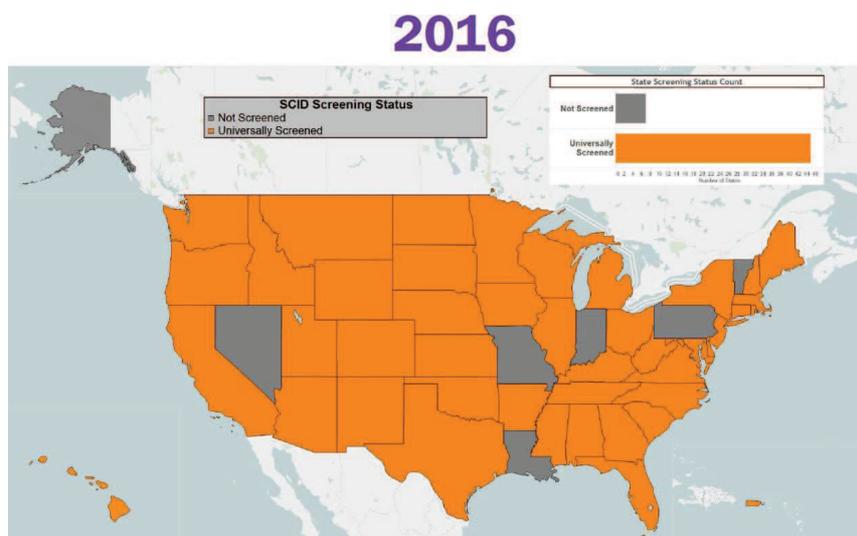


Figure 17 : Estimation de la mise en œuvre du dépistage des DICS à la fin de l'année 2016 (Ojodu, 2015).

6.4 Le dépistage néonatal généralisé des DICS en France

A ce moment en Europe, aucun état n'a mis en place le dépistage généralisé du DICS, mais des études pilotes sont initiées dans certains pays et des réunions entre les équipes de ces différents pays ont lieu. Y participent notamment l'Allemagne, la Suède, le Royaume-Uni, l'Italie, la France au travers du réseau de la Jeffrey Model Foundation, qui soutient les centres de référence sur les déficits immunitaires. En France, le CEREDIH, centre de référence des déficits immunitaires primitifs (ou héréditaires), coordonne un réseau de cliniciens et biologistes pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique des déficits immunitaires primitifs. Il permet un maillage de l'ensemble du territoire à travers des centres de compétence sur le plan clinique et thérapeutique. Il a également des missions d'expertise, d'enseignement, de formation et de recherche. Le CHU de Nantes fait partie de ce réseau et a initié un projet sur le dépistage néonatal généralisé des déficits immunitaires combinés sévères. Deux études préliminaires ont été initiées (détaillées plus loin) : l'une au laboratoire d'immunologie a permis de tester les performances de la méthode de quantification des TRECs et l'autre avec l'hôpital Necker et l'URC-Eco de l'AP-HP a évalué le coût du test, le coût de la greffe précoce et le coût de la greffe tardive.

6.4.1 L'organisation du dépistage néonatal en France

En France, le dépistage néonatal est sous la tutelle du ministère de la Santé et la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (Cnamts) finance en totalité ce programme. Son organisation est confiée à une association nationale, l'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) qui est un

regroupement d'associations régionales (AR). Ce maillage du réseau national permet d'être à proximité des maternités où a lieu le prélèvement sanguin (réalisé au talon au moyen d'une lancette) à chaque bébé à J3 soit après 72 heures de vie. Un papier buvard spécial permet de recueillir les quelques gouttes de sang nécessaires et est ensuite envoyé quotidiennement par courrier postal dans une enveloppe T au laboratoire de l'AR, garantissant un résultat vers la fin de la première semaine de vie. Cette rapidité est importante pour détecter les maladies à un stade pré-symptomatique, en particulier pour l'hyperplasie congénitale des surrénales où des décès précoces par déshydratation aiguë peuvent survenir dès la 2^{ème} semaine de vie. Dans le cadre de la phénylcétonurie et de l'hypothyroïdie congénitale, le dépistage néonatal permet l'instauration d'un régime restrictif en phénylalanine ou un traitement substitutif en hormones thyroïdiennes, respectivement, pour prévenir des lésions cérébrales.

Lorsqu'un dépistage est positif, c'est-à-dire qu'un marqueur dépasse le seuil déterminé pour chaque maladie et fixé pour avoir le moins de faux positifs et de faux négatifs, alors l'enfant est convoqué par un centre de référence ou de compétence de sa région correspondant à la maladie identifiée. Ensuite y sera effectué un test de diagnostic pour confirmer ou infirmer le test de dépistage. Par exemple pour la mucoviscidose, le test de dépistage est le dosage de la trypsine immuno-réactive mais le test de diagnostic est le dosage du chlore dans la sueur. Si l'enfant est réellement atteint, alors il devra être suivi dans ce centre. En effet, les maladies dépistées sont des maladies rares et par conséquent, les malades et leurs familles doivent être pris en charge par des spécialistes.

Tous les trimestres, les laboratoires régionaux, qui effectuent les dosages, ont l'obligation de rendre leurs résultats à l'association nationale (AFDPHE) afin qu'ils puissent être payés en fonction de leur activité (c'est-à-dire en fonction du nombre de naissances). L'association nationale garantit ensuite à la Cnamts, le financeur, que le DNN a bien été réalisé dans les régions et que les enfants atteints repérés sont bien pris en charge. La centralisation des résultats permet ainsi d'avoir des données épidémiologiques fiables sur les maladies dépistées et d'évaluer l'efficience et l'efficacité de la prévention. L'organisation est résumée dans la Figure 1818.

Les avancées technologiques majeures, comme la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et la biologie moléculaire, offrent de nouvelles perspectives pour le dépistage néonatal. De ce fait, la liste des maladies pouvant dès maintenant être dépistées en période néonatale est très importante. Mais attention, certaines de ces maladies ne correspondent pas aux critères de Wilson (voir ci-dessus), qui limitent le dépistage aux maladies bien connues, d'évolution sévère, accessibles à un traitement efficace prévenant cette évolution et ayant une fréquence suffisante pour justifier l'effort financier nécessaire. Dans tous les cas, chaque nouveau dépistage doit faire l'objet d'une évaluation scientifique et médico-économique au travers d'études pilotes, notamment par la Haute Autorité de Santé (HAS), avant d'être validé par l'Agence de Biomédecine et décidé en dernier ressort par le Ministre de la Santé.

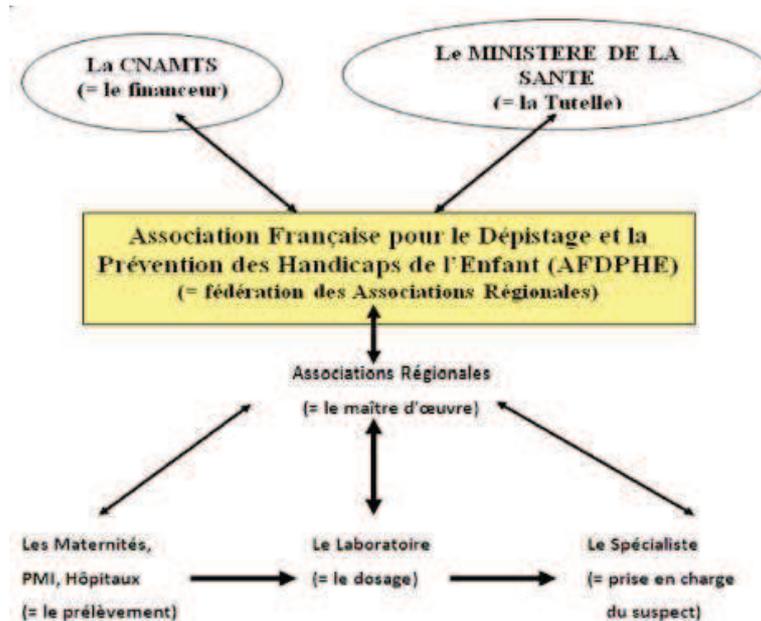


Figure 18 : L'organisation pratique du DNN en France (Roussey, 2010).

6.4.2 Les études préliminaires

En 2012, le laboratoire du CHU de Nantes conduit une étude préliminaire pour évaluer les performances d'un test de quantification des TREC sur Guthrie pour détecter les DICS et les lymphopénies T non DICS, avant de l'utiliser pour une vaste étude médico-économique multicentrique (Audrain, 2014). 5028 échantillons anonymisés ont été testés entre juin et octobre 2012, ainsi que 8 buvards de patients atteints d'un DICS (1 *CD3E* muté, 3 *IL2RG*, 1 *RAG1*, 1 *RAG2*, 1 *ZAP70*, 1 mutation non identifiée). La technique utilisée est une RT-qPCR décrite par l'équipe du Dr AM Comeau à l'université du Massachusetts (Gerstel-Thompson, 2010), incluant à chaque série une courbe de calibration, 3 contrôles de qualité et 2 blancs.

Dans la mesure où chaque équipe a développé sa méthode, chacune a ses propres valeurs seuil. Les valeurs ont été établies en utilisant la méthode des percentiles. La valeur moyenne du 99^e percentile était 183 copies de TREC. Lorsque le gène de contrôle (RNaseP) était correctement amplifié, les résultats au-dessus du seuil étaient considérés négatifs, les résultats inférieurs à 39 TREC/réaction positifs et les résultats étaient équivoques entre 39 et 183 TREC/réaction. Les résultats inférieurs à 183 TREC/réaction sans amplification du gène contrôle étaient rendus indéterminés. Les tests de reproductibilité et de répétabilité ont montré des CV inférieurs à 2.5%.

Parmi les 8 patients DICS testés, tous avaient des TREC indétectables, sauf un qui avait un dépistage équivoque (attendu parce qu'il s'agissait d'un déficit en *ZAP70*, compatible avec la présence d'un faible nombre de cellules T naïves). En ce qui concerne les 5028 échantillons, 2.62% ont dû être re-testés, à cause de résultats dans la zone équivoque ou indéterminés (pas

d'amplification du gène contrôle). Après le re-test, seulement 2 échantillons sont restés non concluants et 9 équivoques. L'étude d'échantillons contrôles provenant du CDC d'Atlanta a montré que le seuil était trop élevé puisque nous étions les seuls à classer certains échantillons en équivoque alors que les autres équipes les classaient en normaux. Ceci a donc permis de recalculer une valeur seuil d'après ces échantillons contrôles, un seuil à 100 TREC/réaction a été préféré. Avec le nouveau seuil, seulement 2 tests étaient équivoques après le re-test, soit un taux de rappel pour un deuxième buvard estimé à 0.04% et aucun DICS n'était oublié.

Parallèlement, le coffret en cours de développement chez PerkinElmer a été testé sur 283 échantillons. A la valeur seuil choisie, nous avons eu après un premier test 3% d'échantillons à re-tester. Sur la moitié des échantillons que nous avons effectivement pu re-tester (sur la même carte) tous ont montré des résultats normaux au second passage. Les patients DICS testés par ce coffret ont montré un résultat positif (TREC indétectable ou à 1 copie) à l'exception du patient porteur du déficit en *ZAP70* qui a montré un résultat équivoque (résultat cependant attendu parce ce patient avait des lymphocytes T naïfs présents). Les échantillons contrôles du CDC que nous avons testé ont montré également des TREC entre 1 et 3 copies/ μ L pour les 2 catégories d'échantillons mimant un résultat compatible avec un DICS (échantillons déplétés en cellules mononucléées) ou mimant un résultat non concluant (échantillons déplétés en leucocytes). Dans l'ensemble, le kit de PerkinElmer a montré de bonnes performances analytiques.

Dans le cadre de cette étude, l'URC-Eco Ile de France (Unité de Recherche Clinique en économie de la santé ; Groupe hospitalier A. Chenevier Henri Mondor, AP-HP, 51 avenue du maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil France) a réalisé une étude médico-économique, après avoir visité le laboratoire d'immunologie de Nantes, pour savoir si un dépistage universel des DICS et des lymphopénies T sévères serait coût/efficace en France (Clément, 2015). Une analyse par micro-costing a permis d'évaluer le coût global d'un dépistage par les TREC sur carte de Guthrie en prenant en compte les ressources humaines, les consommables, le matériel (paillasse et automates). Le prix unitaire du test variait entre 4.69 € et 6.79 € pour une activité de 33800 échantillons par an et par laboratoire. Une optimisation de l'utilisation des équipements (partage pour d'autres analyses) ainsi qu'une augmentation des volumes permettraient une diminution des coûts. Le coût des traitements est estimé par l'analyse rétrospective de 30 patients atteints de DICS typique, le but étant de comparer le coût d'une greffe tardive effectuée après l'âge de 3 mois ($n = 27$) par rapport à une greffe précoce effectuée avant l'âge de 3 mois ($n = 3$). Chez les patients subissant une greffe tardive, les infections actives ont contribué à augmenter les coûts de prise en charge (augmentation du nombre d'hospitalisation, du nombre de consultation, plus d'admission dans des services de soins intensifs, plus de traitements, ... et par conséquent un prix/admission plus important). Le coût médical pour une greffe de cellules souches hématopoïétiques après 3 mois est évalué à 195776 € contre 86179 €, quand elle est effectuée avant l'âge de 3 mois. Donc, une détection rapide des cas de DICS permettrait de diminuer les coûts des traitements de 50000 € à 100000 € par enfant malade. En faisant l'hypothèse d'un

coût unitaire de 5 €, le dépistage généralisé des DICS coûterait 4150000 € par an à la France et l'équilibre budgétaire serait donc atteint si l'incidence des DICS était au minimum de 1 : 20000 naissances. Cela reste largement plus élevé que les estimations actuelles qui sont plutôt de l'ordre de 1 : 58000 naissances (Kwan, 2014). Cependant, il est important de ne pas négliger le bénéfice de survie qui doit être pris en compte dans une étude médico-économique. On sait que l'avantage de survie entre une greffe tardive et précoce est considérable (Puck, 2007) et le coût par année supplémentaire de vie gagnée est susceptible de tomber bien en dessous du seuil de 50000 € généralement accepté. En prenant en compte tous les éléments, le dépistage des DICS est très probablement coût/efficace.

6.4.3 L'étude DEPISTREC

En 2014, une étude pilote de grande envergure est initiée dans le but d'évaluer la faisabilité et le ratio coût/efficacité (délai de prise en charge et espérance de vie à 10 ans), du dépistage néonatal généralisé des déficits immunitaires combinés sévères sur l'ensemble du territoire français. Elle porte sur 200 000 nouveau-nés a priori sains, ainsi que sur tous les enfants diagnostiqués hors dépistage pendant la période d'inclusion par l'un des pédiatres référents des déficits immunitaires participant à l'étude. L'étude s'appuie sur l'organisation déjà existante du dépistage néonatal (

Figure 1919). 2 gouttes supplémentaires sont déposées sur une deuxième carte de Guthrie à 72 heures de vie sous réserve d'information et du consentement des parents. Il s'agit d'une étude multicentrique car onze associations régionales y participent, grâce à l'inclusion des enfants dans environ 50 maternités. Ensuite, les cartes supplémentaires prélevées sont réparties dans deux laboratoires (Nantes et Lyon), au lieu des onze laboratoires des AR dans le circuit habituel. Les Associations Régionales investigatrices (AR) représentent près de 600 000 naissances/an et le chiffre de 200 000 enfants pourra être atteint en deux ans (durée d'inclusion). Tous les enfants naissant dans ces maternités peuvent participer à l'étude s'ils remplissent les critères d'inclusions : nouveau-né à J+3 de la naissance (prématuré et non prématuré) plus consentement d'un des parents. Pour information, les critères d'exclusion sont : absence de consentement, les enfants dont les parents sont sous tutelle ou curatelle, les enfants sans couverture sociale, une sortie prématurée de la maternité ne permettant pas de faire le Guthrie.

A chacune des onze AR est associé le pédiatre référent régional des déficits immunitaires primitifs, membre d'un centre de compétences affilié au CEREDIH et qui appelle les parents pour les convoquer, leur proposer une consultation et une exploration complémentaire si le résultat du dépistage est présumé positif.

Une étude de micro-costing sera réalisée pour évaluer le coût du test de dépistage.

Le groupe des 200 000 enfants forme le groupe expérimental et permet d'évaluer certains paramètres comme le coût du dépistage, l'acceptabilité par les parents (taux de participation), le taux de rappel pour un résultat anormal ou non concluant, le taux de suivi, le délai de rendu de résultats, l'incidence de la maladie. Il permet également de quantifier les faux positifs et de calculer la spécificité de la méthode. A la fin de l'étude, les statuts vitaux à 18 mois de vie seront recherchés ainsi que les causes de décès, afin de retrouver les DICS qui n'auraient pas été détectés par le dépistage. La sensibilité du test pourra ensuite être calculée. De plus, les données cliniques (date de diagnostic, date de greffe, traitements, survie ...) et péculniaires des DICS dépistés sont recueillies pour être comparées au groupe contrôle dans le cadre de l'analyse médico-économique.

L'étude est contrôlée pour la partie analyse de coût. Le groupe contrôle est constitué d'enfants ayant un DICS diagnostiqué lors d'infections et n'ayant pas bénéficié du dépistage durant la même période. Ces enfants sont identifiés par les pédiatres référents DIP participant au protocole et inclus dans le groupe contrôle si les parents le souhaitent. Parallèlement ces enfants sont tous inclus dans le registre national du CEREDIH. Le schéma récapitulatif de définition des groupes de patients est présenté en *Annexe 1*.

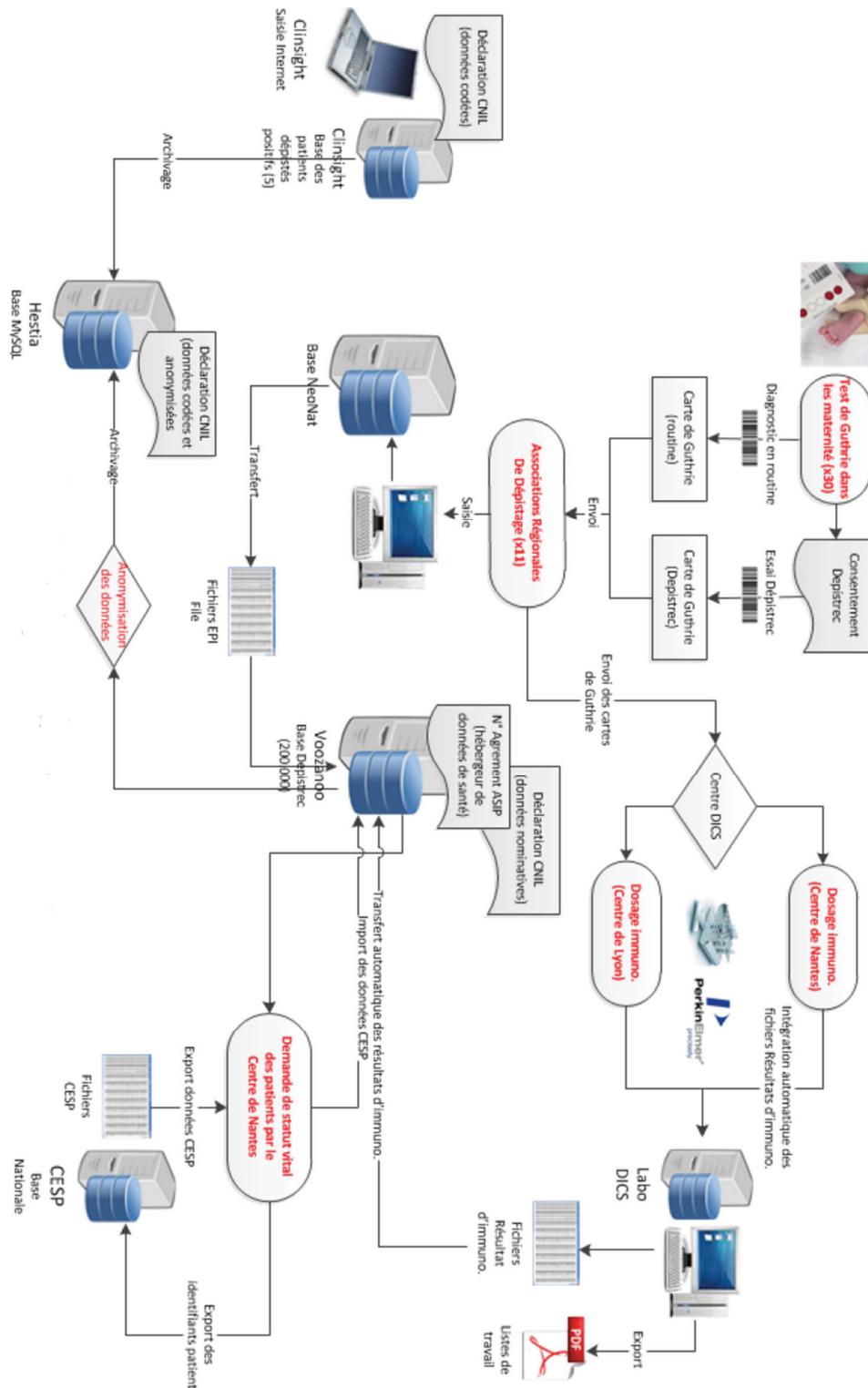


Figure 19 : Essai DEPISTREC, circulation de l'information (protocole DEPISTREC).

Comme dans l'organisation actuelle du dépistage néonatal, en cas de résultat négatif les parents ne sont pas informés. En cas de résultat non concluant, le laboratoire d'analyse prévient l'AR qui se charge de prévenir la famille ou la maternité pour demander un 2^{ème}

prélèvement. Si le dépistage est positif, l'AR contacte le pédiatre référent DIP local, qui convoque la famille pour une consultation spécialisée, des explorations complémentaires et un contrôle des TRECs. Le schéma récapitulatif du rendu des résultats est présenté en Annexe 2.

Comme précisé auparavant, le taux de dépistages faux positifs et non concluants augmentent dans les populations nées prématurément, c'est-à-dire avant 37 semaines d'aménorrhée. Pour éviter un taux de rappels trop important, le test est répété sur un nouveau buvard chez les prématurés. Cependant, il existe une différence entre des TRECs indétectables et des TRECs abaissés mais détectables. C'est pourquoi dans cette étude, si les TRECs sont inférieurs ou égales à 5 alors ces enfants bénéficient directement d'une consultation, d'une analyse des sous-populations lymphocytaires et d'un contrôle des TRECs.

Au total, il y a donc trois possibilités :

- Schéma 1 : dépistage négatif (TRECs > valeur seuil) : arrêt des investigations, rendu de résultats à l'AR.
- Schéma 2 : dépistage positif chez un enfant non prématuré (TRECs < valeur seuil) ou dépistage positif chez un enfant prématuré (TRECs indétectables ou ≤ 5 copies/ μ L) (Figure 2020).

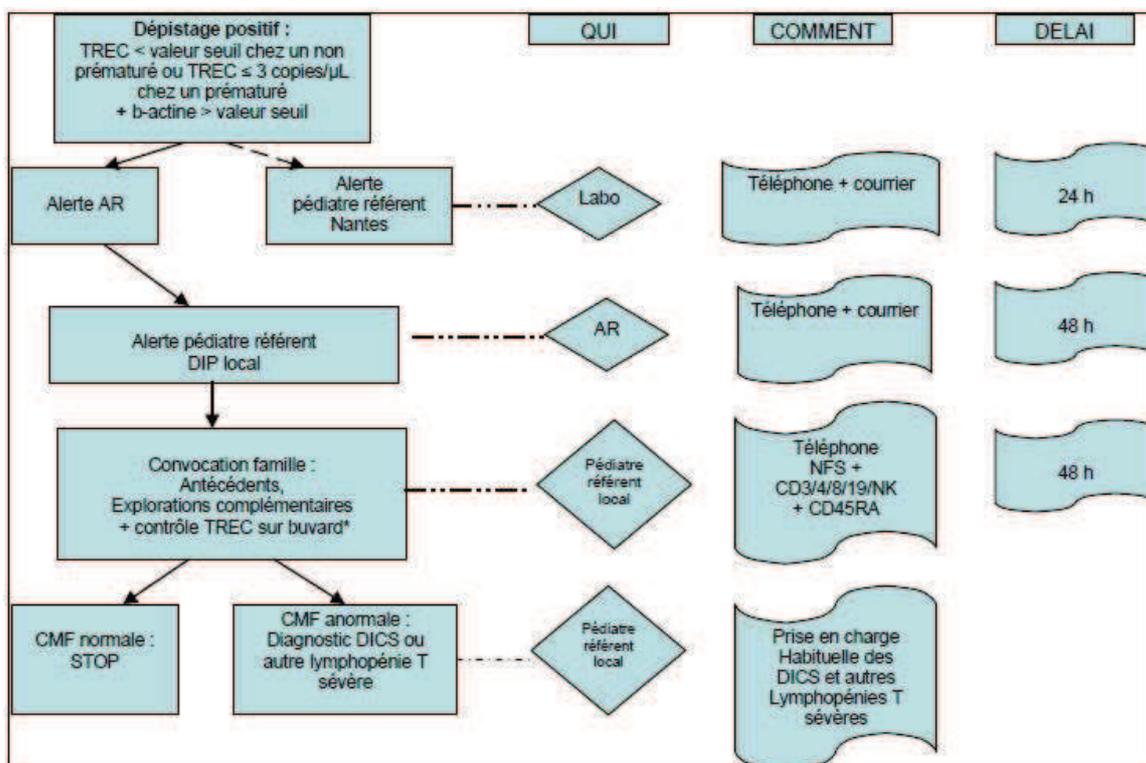


Figure 20 : Organigramme pour un dépistage positif (protocole DEPISTREC).

c) Schéma 3 : épistage positif avec TREC_s inférieurs à la valeur seuil mais supérieurs à 5 copies/ μ L chez un enfant prématuré ou dépistage non concluant (TREC_s et gène contrôle < valeur seuil) (Figure 2121).

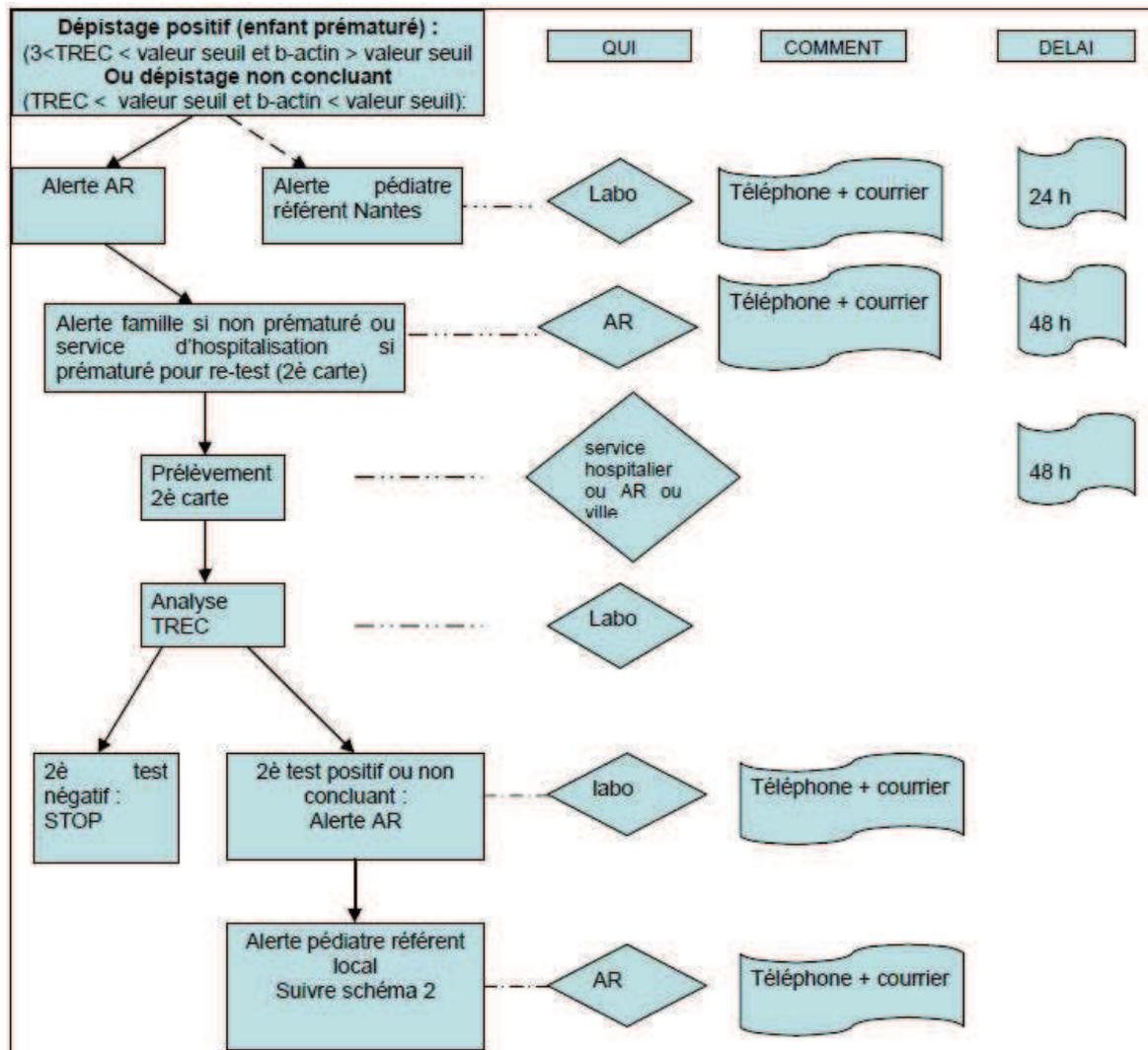


Figure 21 : Organigramme pour un dépistage non concluant ou positif (enfant prématuré) (protocole DEPISTREC).

Dans le cadre de cette étude, le dispositif médical utilisé et évalué est le « EnLite™ neonatal TREC kit » commercialisé par la société Perkin Elmer, leader mondial du dépistage néonatal. Il s'agit du premier kit mis sur le marché permettant de détecter les déficits immunitaires combinés sévères et ayant le marquage CE (le 27 août 2013).

Le principe du test est une PCR en point final. L'ADN de l'échantillon est élué à partir d'un disque de 1.5 mm de diamètre prélevé sur une tache de sang séchée (carte de Guthrie), puis mis en présence d'un mélange réactionnel contenant les amorces et la sonde TREC, les amorces et la sonde β -actine (utilisé comme gène de référence pour vérifier que l'ADN est

bien amplifié), le tampon de PCR. Les segments TREC et β -actine sont amplifiés, puis hybridés avec la sonde. Celles-ci utilisent la technologie de transfert d'énergie (FRET : fluorescent resonance energy transfer) entre deux molécules fluorescentes : un donneur et un accepteur. La détection de cette fluorescence est basée sur la technologie TR-FRET (time-resolved fluorescent resonance energy transfer) (Figure 22). Dans cette technique, un donneur avec une durée de vie de fluorescence longue (le lanthanide) et un fluorophore accepteur sont situés à chacune des extrémités de la sonde. Lorsque la sonde n'est pas hybridée alors le donneur et l'accepteur sont proches l'un de l'autre et le transfert d'énergie est très efficace et très intense mais la durée d'émission est courte. Tandis que lorsqu'ils sont éloignés, alors le transfert d'énergie est moins important et l'accepteur émet plus longtemps. La lecture du signal s'effectue après un délai de quelques microsecondes de manière à s'affranchir des fluorescences parasites des sondes non fixées et des effets matrices (durée de vie de l'ordre de la nanoseconde). Ce système permet d'augmenter la sensibilité du test. Ensuite, la mesure de fluorescence de chaque échantillon est rapportée sur la courbe de calibration pour permettre le calcul du nombre de copies de TREC et de β -actine. Toutes les réactions se déroulent dans le même puits. Il n'y a aucun transfert d'ADN ni de résidu d'ADN après l'analyse.

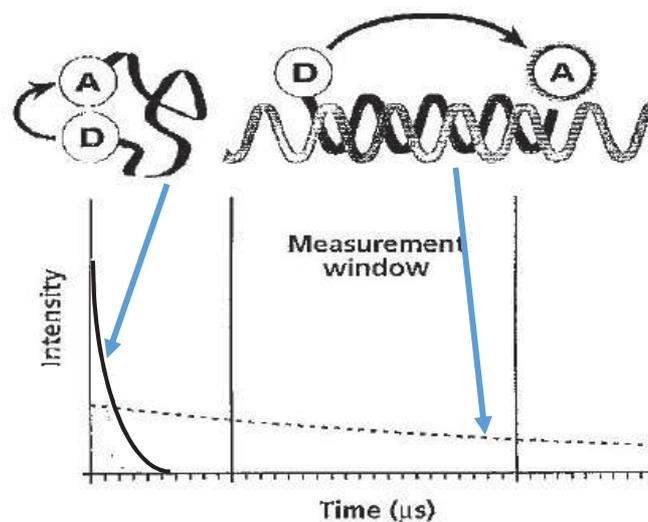


Figure 22 : Technologie TR-FRET. (A) Accepteur, (D) Donneur (notice du kit EnLite™ neonatal TREC).

A propos de l'accréditation, le coffret étant considéré comme une innovation, il n'a pas l'obligation d'être accrédité. Cependant le laboratoire d'Immunologie de Nantes est déjà accrédité pour certaines analyses selon la norme ISO 15189. Avec le soutien de la société Perkin Elmer, la validation de la technique a été faite au début du protocole en se rapprochant de la portée A de la norme, des documents Cofrac et des documents du CLSI.

En ce qui concerne les modalités d'utilisation du coffret, elles sont résumées à l'aide d'un tableau en Annexe 3. Brièvement, après préparation des réactifs et établissement du plan de plaque de test, chaque carte-échantillon est identifiée par son code barre à l'aide de

la douchette du perforateur ou « puncher » (PerkinElmer) et ensuite perforée par le « puncher ». Le « punch » de 1.5 mm de diamètre est déposé dans la plaque 96 puits selon le schéma prévu. Toute la réaction se déroulera dans cette plaque. Dans le plan de plaque, le dépôt de 3 blancs, 3 points de gamme en triplicatas et 3 contrôles en duplicatas est prévu (points de gamme et contrôles sont inclus dans le coffret sous forme de taches de sang déposées sur buvard). 10 μ L de tampon d'élution sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est scellée, centrifugée et incubée à 98°C pendant 45 mn. Puis la réaction est arrêtée à +4°C pendant 2 mn minimum avant la suite de l'analyse. Après une nouvelle centrifugation, la plaque est descellée et 20 μ L de réactifs de PCR sont ajoutés. La plaque est de nouveau scellée et centrifugée puis déposée dans le thermocycleur pour la réaction d'amplification et d'hybridation (2h30 environ). Dans l'heure qui suit la fin de la réaction, la détection de la fluorescence est effectuée sur le lecteur de fluorescence (Victor Enlite). Le nombre de copies de TRECs est calculé grâce à l'inclusion dans chaque série d'une gamme dont le nombre de copies est connu. Pour rappel, dans cette technique de l'ADN est amplifié, les règles de bonnes pratiques associées à un laboratoire de biologie moléculaire sont donc à respecter notamment le principe de la « marche en avant » (1 zone propre, 1 zone pré-PCR et 1 zone post-PCR). Des contrôles négatifs et positifs permettent de valider la technique au jour le jour et sont inclus dans le kit. D'autres critères d'acceptation d'analyse de plaque sont définis : l'absence d'amplification en TREC et en beta-actine dans les puits blanc d'extraction, le suivi dans le temps des points de calibration et des contrôles en TREC et en beta-actine, le suivi dans le temps du nombre de positifs ou non concluants par plaque et le suivi pour chaque plaque de la médiane des valeurs obtenues en TREC et en beta-actine.

Chaque laboratoire doit établir ses propres limites de signal et ses propres valeurs seuils en testant au minimum 3000 échantillons de nouveau-nés, afin d'établir la distribution normale de la population et la valeur seuil. Ceci a été fait au début de l'étude sur des échantillons frais anonymisés où il y avait suffisamment de sang séché, en collaboration avec le fournisseur. Une recherche similaire a été faite auparavant sur 5081 échantillons par le fournisseur pour proposer des valeurs. Leur distribution montre que 97.5 % des échantillons sont supérieurs à 36 copies/ μ L de TRECs et 53 copies/ μ L de β -actine. La valeur seuil obtenue en utilisant le 99^{ième} percentile est de 31 pour les TRECs et 33 pour la β -actine, et en utilisant le 99.5^{ième} percentile, 26 pour les TRECs et 23 pour la β -actine. Leur étude d'efficacité a aussi inclus les données résultant de l'analyse de 18 échantillons rétrospectifs de patients pour qui un diagnostic de DICS avait été porté. 23 échantillons sur 5079 échantillons de dépistage sont présumés positifs (au seuil de 2.5^{ième} percentile) soit 0.45% (2 échantillons sont invalides, soit 0.04 %). 16/18 échantillons de patients atteints de DICS ont un dépistage positif (2 ont un résultat invalide). Le nombre de copies maximum obtenu chez ces patients DICS est de 15 pour le résultat initial et de 9 pour le résultat après redosage. L'utilisation d'une valeur seuil choisie au 2.5^{ième} percentile donne donc un taux de rappel à 0.5 %, ce qui est trop élevé.

Comme prévu, une étude d'efficacité a été réalisée à Nantes avant le début de l'étude à l'aide d'un seul lot de réactifs. L'analyse de 3451 tests sur 2925 échantillons a permis de

déterminer des cut-offs. Cependant, comme il existait des différences entre les lots, les valeurs seuils ont évolué jusqu'à une stabilisation au mois de mai. Les cut-offs (TREC) pour le test initial et les re-tests ont été établis à 34 copies/ μL et à 20 copies/ μL respectivement. Pour la β -actine, la valeur seuil est à 36 copies/ μL .

De plus, le fournisseur a proposé une conduite pour l'interprétation des résultats et c'est ce schéma quasiment identique qui est utilisé dans le protocole DEPISTREC. Ce schéma se divise en deux parties. Tout d'abord, le résultat initial avec deux possibilités :

- a) résultat négatif (TREC \geq valeur seuil) alors le test est normal et le laboratoire peut libérer le résultat.
- b) résultat positif (TREC < valeur seuil), le test est présumé positif et le laboratoire doit re-tester le même échantillon en duplicatas.

Ensuite, le rendu du résultat final est issu de l'interprétation des 3 valeurs obtenues (1 valeur initiale et 2 valeurs re-tests). Il y a alors 3 possibilités :

- a) 2 tests sur 3 sont négatifs (TREC \geq valeur seuil), alors le dépistage est normal.
- b) 2 tests sur 3 sont positifs (TREC < valeur seuil et β -actine \geq valeur seuil pour au moins 2 tests sur 3), alors le dépistage est anormal.
- c) tous les autres résultats, le dépistage est invalide

Par la suite, l'arbre décisionnel ci-dessous (Figure 2323) a été utilisé. Ces résultats servent à déclencher les schémas 1, 2 (Figure 2020) et 3 (Figure 2121) présentés ci-dessus.

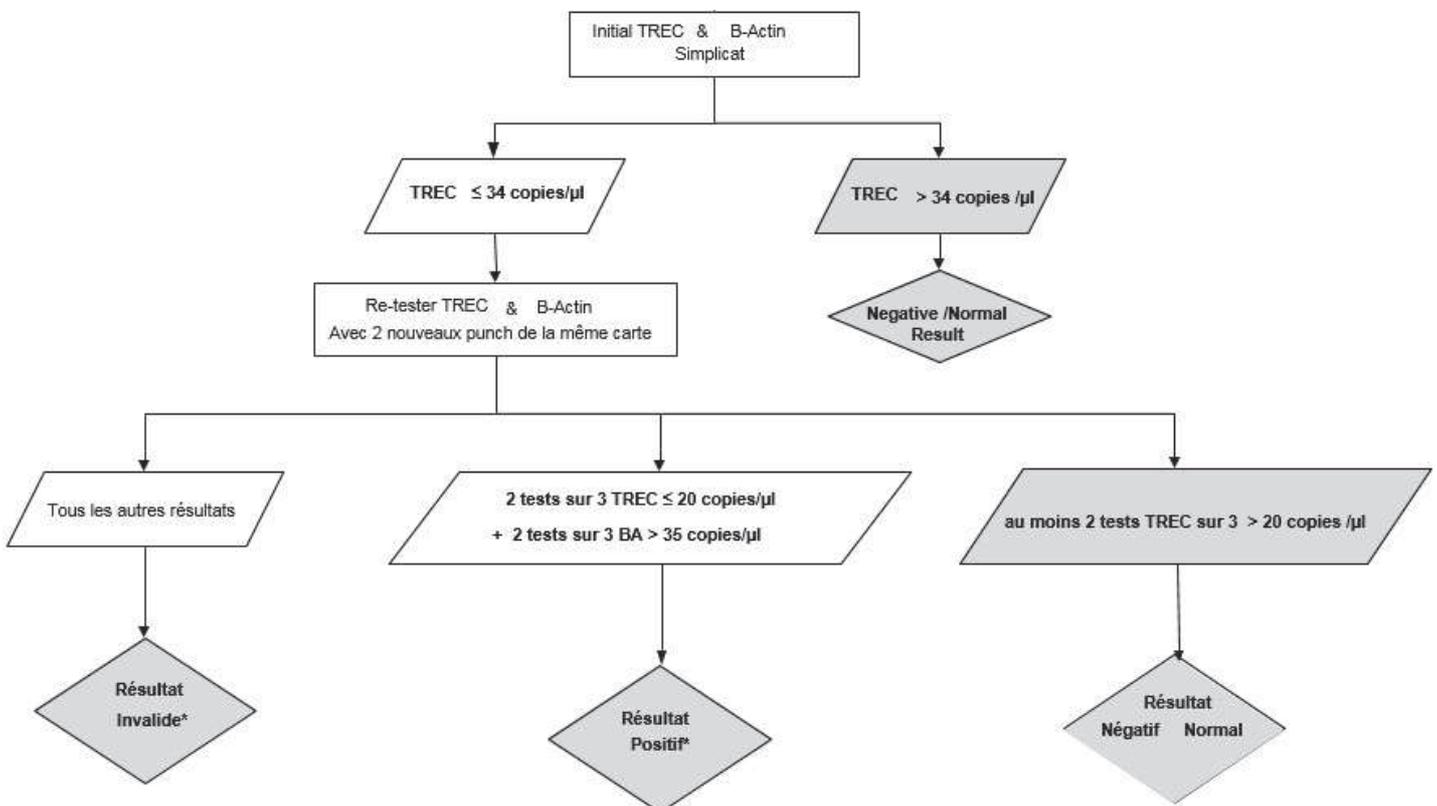


Figure 23 : Arbre décisionnel du laboratoire (étude DEPISTREC).

7 Objectifs

Le but de l'étude pilote DEPISTREC est de démontrer l'utilité clinique et médico-économique, ainsi que la faisabilité du dépistage néonatal généralisé des DICS, tout en développant et en optimisant la technique du dosage des TRECs, les algorithmes décisionnels du laboratoire et des suivis cliniques. L'objectif principal de ce programme sera de calculer le rapport coût/efficacité d'une mise en place généralisée à toute la France (protocole DEPISTREC). En plus, des objectifs secondaires seront également évalués à la fin de l'étude comme quantifier la durée des hospitalisations des enfants atteints de DICS au cours des 18 premiers mois de leur vie, estimer le nombre de décès évités à 18 mois par le dépistage, estimer plus précisément l'incidence de la maladie actuellement sous-estimée, vérifier les performances du test (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives), examiner certains indicateurs (notamment taux de rappel, taux de suivi, délai de rendu des résultats, délai de prise en charge, acceptabilité par les familles). L'identification des autres maladies avec lymphopénie T non DICS dépistées par l'étude chez un enfant positif pour le test de dépistage fait partie également des objectifs secondaires. Ce travail de thèse s'intéresse aux patients dépistés positifs, ainsi qu'aux anomalies cliniques associées. Le but est d'analyser (catégoriser, comprendre) les lymphopénies T retrouvées à la mi-étude, c'est-à-dire dans une cohorte de 100000 enfants ayant bénéficié du dépistage néonatal.

8 Résultats

8.1 Analyse des TRECs

A la mi-étude, la distribution globale du nombre de copies de TRECs par microlitre est la suivante : la moyenne est de 142 copies/ μ l et la médiane est de 112 copies/ μ l. En mars 2016, 101938 nouveau-nés ont bénéficié du dépistage en France. 101669 (99.74 %) enfants nés à terme ou prématurément ont obtenu un résultat négatif dès le dosage initial ou après les deux re-tests (Figure 2323). 152 (0.15 %) résultats étaient non concluants après les trois dosages effectués sur le premier buvard, à cause essentiellement d'un résultat positif chez un bébé prématuré ou dans une moindre mesure à cause d'une non amplification du gène de la β -actine. Le résultat du premier prélèvement étant non concluant un second buvard a été prélevé. A la mi-étude, le taux de rappel pour un buvard de contrôle est donc de 0.15 %. Seulement 13 dépistages sont restés anormaux à la suite du deuxième prélèvement, 12

étaient des résultats positifs et 1 résultat invalide (non amplification de la β -actine). Les 139 autres enfants ont normalisé leur nombre de TRECs ou sont décédés dans la période périnatale de causes non immunologiques. Ces 13 buvards sont tous issus d'enfants prématurés et ont bénéficié d'une consultation spécialisée et d'explorations complémentaires. 116 (0.11 %) patients étaient positifs dès le premier buvard, 8 étaient des enfants prématurés (< 37 SA) avec au moins deux TRECs inférieurs à 5 copies/ μ L et les autres étaient des enfants nés à terme. Avec les 13 nouveau-nés positifs sur le deuxième prélèvement, cela porte le nombre total d'enfants dépistés positifs et donc à voir en consultation à 129, soit 0.13 % de tous les enfants testés jusqu'au mois de mars 2016. Ces 129 nouveau-nés (81 garçons et 48 filles) ont bénéficié au minimum d'une consultation spécialisée avec un praticien membre du CEREDIH, d'une numération formule sanguine et d'une exploration des sous-populations lymphocytaires par cytométrie en flux. L'analyse des TRECs à la moitié de l'étude DEPISTREC est résumée dans la Figure 24.

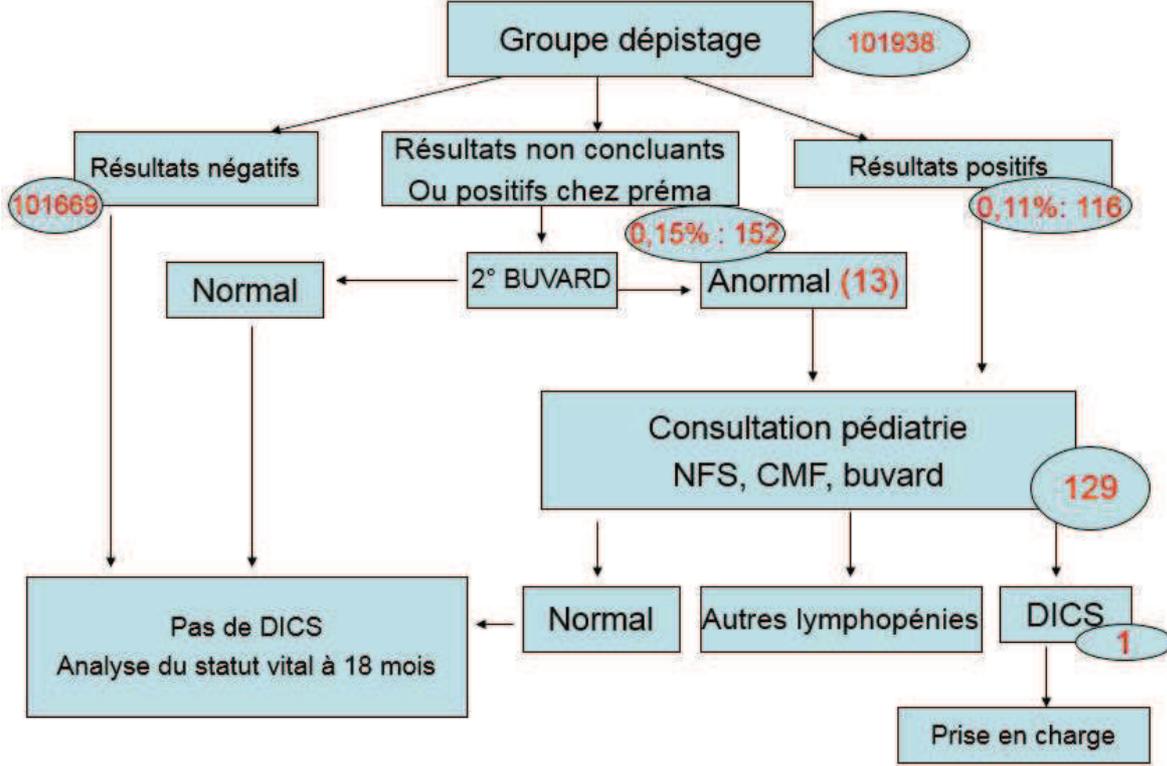


Figure 24 : Analyse des TRECs à la moitié de l'étude DEPISTREC.

8.2 Analyse des lymphopénies T

8.2.1 Définition d'une lymphopénie T

Les lymphocytes T, B et NK ainsi que les sous-populations T subissent des modifications majeures de la naissance jusqu'à l'adolescence. Des valeurs de référence pour chacun des sous-groupes de lymphocytes en fonction des âges sont nécessaires pour pouvoir interpréter correctement les résultats. En 2003, William T. Shearer fournit des valeurs de référence notamment pour les différents compartiments T pendant l'enfance (Shearer, 2003). Entre 0 et 3 mois de vie, les nouveau-nés en bonne santé ont des cellules T abondantes, soit une médiane à 3680 CD3⁺/mm³ (n = 709). 2500 et 5500 CD3⁺/mm³ représentent respectivement les 10^{ième} et 90^{ième} percentiles. Entre 0 et 3 mois, 90 % (64 % - 95 %) des cellules CD4⁺ expriment aussi CD45RA⁺ et sont donc des cellules T Helper naïves. L'ensemble des valeurs de cette étude sont présentées en Annexe 44 (pourcentages) et en Annexe 5 (valeurs absolues). En 2009, R. van Gent annonce des valeurs similaires (van Gent, 2009). Dans ce travail, la médiane (n = 98) est de 2732 CD3⁺/mm³ (1688 – 5827 CD3⁺/mm³) chez les enfants entre 0 et 6 mois. Il est important de noter, que le taux de faux positifs varie en fonction des valeurs seuils choisies pour les TRECs mais également pour les lymphopénies T. En effet, un résultat faux positif est défini comme une discordance entre un taux de TRECs anormal mais un compte lymphocytaire supérieur à la valeur seuil établie dans l'étude. Par conséquent, il est important de bien les définir auparavant. Dans ce travail, les enfants dépistés positifs ayant moins de 2500 CD3⁺/mm³ sont des vrais positifs et sont par conséquent des vrais lymphopénies T. Les lymphopénies inférieures à 1500 CD3⁺/mm³ et 300 CD3⁺/mm³ seront considérées comme des lymphopénies sévères et profondes respectivement.

8.2.2 Méthodes

Afin d'analyser les données des 129 patients positifs, les comptes rendus de consultation et de biologie médicale ont été demandés auprès des maternités. Ce travail de recherche a permis de retrouver un certain nombre d'informations cliniques. Les pédiatres et les immunologistes ont répondu de différentes manières (fax, email, courrier). Les données récoltées ont été ensuite retranscrites dans des tableaux Excel.

Comme définis dans la Tableau 4, les DICS typiques et atténués ainsi que le syndrome d'Omenn, mettant la vie en danger et nécessitant une intervention médicale pour leur survie, constituent les cibles principales du dépistage néonatal des DICS. Tandis que les pathologies supplémentaires détectées sont considérées comme des cibles secondaires. 104 (80.6 %) renseignements cliniques et 109 (84.5 %) examens de cytométrie en flux ont au final été récupérés. Parmi ces informations, plusieurs étiologies de lymphopénie T ont été retrouvées

permettant d'expliquer un nombre de TRECs bas et donc un test de dépistage positif. Le Tableau 5 représente le classement de toutes ces anomalies retrouvées grâce aux renseignements cliniques et biologiques récupérés.

8.2.3 Détection des DICS typiques, des DICS atténués et du syndrome d'Omenn (n = 1)

Sur les 101938 enfants testés, 1 DICS a été identifié, soit une incidence de 1 pour 102000 naissances à ce stade de l'étude. Cet enfant a bénéficié d'un diagnostic anténatal dans un contexte familial de DICS. Cependant, la maman a signé à la naissance le consentement pour l'étude DEPISTREC qui lui a été proposée. Celui-ci a été réalisé sans que les biologistes soient au courant du diagnostic anténatal. Il s'agit d'un garçon né à terme (40 SA) avec un poids de naissance de 3930 g et est le 3^{ème} enfant d'un couple de parents non consanguins. La maman est conductrice d'un DICS lié à l'X, notamment de la mutation c697delA du gène de *IL2RG*. Dans les antécédents familiaux, le frère de la maman est atteint tandis que les 2 enfants issus des grossesses antérieures ne le sont pas. Pendant la grossesse, la maman a fait une séroconversion toxoplasmique asymptomatique entre 5 SA et 18 SA. En raison du contexte familial de DICS, une biopsie de trophoblaste a été faite montrant que le fœtus était atteint de la mutation. Par conséquent, devant le risque infectieux majeur (séroconversion toxoplasmique) dans un contexte de DICS typique, une injection intra-cordone de moelle (ou greffe *in-utero*) provenant de la sœur a été effectuée dès 25 SA à l'hôpital Necker. A la naissance, l'enfant a bon état général et l'auscultation ne retrouve pas d'anomalie. Les NFS et les sous-populations lymphocytaires (exploration poussée) ont été prélevés dès la naissance sur sang de cordon dans ce contexte de déficit immunitaire, alors que les TRECs ont été prélevés à 72 heures comme prévu. Ce typage lymphocytaire retrouvait une lymphopénie T majoritairement CD4⁺ (1153 CD3⁺/mm³ et 524 CD4⁺/mm³). Les lymphocytes B étaient quant à eux en nombre normal (860 CD19⁺/mm³). D'autres prélèvements au cordon ont été faits, notamment un bilan de toxoplasmose qui était négatif, un dosage pondéral des immunoglobulines qui était subnormal (IgG 12.5 g/L, IgA < 0.04 g/L, IgM 0.04 g/L). Un test de prolifération lymphocytaire a également été demandé et était légèrement diminué. L'analyse du premier buvard retrouvait des TRECs très bas : 0/4/4 copies/μL. A 1 mois, la reconstitution immunitaire était quasiment complète même si une lymphopénie T modérée persistait (2074 CD3⁺/mm³) avec une répartition normale pour l'âge des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ naïfs et mémoires (89 % de CD45RA⁺/CD4⁺ = cellules T Helper naïves) et les TRECs restaient diminués : 13/6/1. Ces résultats témoignaient d'une bonne prise de greffe et donc l'isolement protecteur a été retiré rapidement. De plus, aucun argument biologique en faveur d'une toxoplasmose congénitale n'a été retrouvé. Depuis, son évolution s'est déroulé sans incidence et il bénéficie d'un suivi particulier, notamment pour exclure définitivement la toxoplasmose congénitale (disparition des IgG anti-toxoplasmes d'origine maternelle).

8.2.4 Autres causes de lymphopénies T non DICS (n = 41)

Comme vu précédemment, d'autres conditions médicales peuvent être associées à des valeurs de TRECs abaissées et donc à un test de dépistage positif. L'analyse par cytométrie en flux montre, que dans un peu plus de un tiers des cas, il s'agit de vraies lymphopénies T plus ou moins sévères, soit 42 enfants lymphopéniques (38.5%). Les pathologies rencontrées sont variées et détaillées ci-dessous. La majorité de ces lymphopénies T non DICS peuvent être regroupées en 4 grands groupes : les syndromes ayant une déficience connue en cellules T, les lymphopénies secondaires à une condition médicale, les lymphopénies T idiopathiques (ou DCIS variant) et les enfants prématurés sans aucune autre anomalie.

8.2.4.1 Les syndromes avec lymphopénie T (n = 6)

Ce groupe représente les syndromes génétiques connus pour avoir des lymphopénies T dans leur spectre d'anomalies. Sur les 42 enfants atteints d'une lymphopénie T non DICS, 6 (14.3 %) ont un syndrome congénital associé à une anomalie des cellules T reconnue. De ces nouveau-nés syndromiques, 3 (50 %) ont un syndrome de DiGeorge, 2 (33.3 %) sont suivis pour une trisomie 21 et le dernier (16.7 %) a un syndrome d'atrésie multiple du grêle associé à un déficit immunitaire. De plus, deux enfants dépistés, pour lesquelles les sous-populations non pas pu être récupérées, appartiennent aussi à ce groupe : une trisomie 21 et un syndrome de CHARGE.

3 enfants avec des lymphopénies T ont été diagnostiqués avec un syndrome de DiGeorge. Le syndrome de DiGeorge ou syndrome de délétion 22q11.2 est une anomalie chromosomique congénitale dont la prévalence est estimée entre 1/2000 et 1/4000 naissances. Il se caractérise essentiellement par des malformations cardiaques (77 %) et palatines (75 %), mais également par une dysmorphie faciale, un retard de croissance fréquent et une immunodéficience. Les malformations cardiaques incluent des malformations conotruncales (tronc artériel commun, tétralogie de Fallot, communication interventriculaire). 75% ont une immunodéficience secondaire à une aplasie/hypoplasie thymique qui les expose à des infections, des maladies auto-immunes, tels que le purpura thrombopénique immunologique, la neutropénie et l'anémie hémolytique auto-immune). Comme pour les autres anomalies du syndrome de Di George, l'atteinte des lymphocytes T varie d'un patient à l'autre. Le diagnostic est suspecté devant un tableau clinique compatible et une imagerie montrant des malformations cardiaques et vertébrales. La détection de la délétion 22q11.2 confirme le diagnostic. Le diagnostic prénatal est possible en cas d'antécédents familiaux ou en cas d'anomalies échographiques. Ici, les 3 enfants atteints avaient des lymphopénies T sévères, c'est-à-dire inférieures à $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$, entre 959 et $1488 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$. Deux sur trois avaient des anomalies cardiaques associées de type tétralogie de Fallot et ont bénéficié d'un diagnostic anténatal. Cependant, le dépistage néonatal des DICS

a permis de faire le diagnostic de syndrome de DiGeorge chez un enfant qui ne présentait aucun signe clinique. Dans le cadre de l'étude DEPISTREC, l'enfant a eu une consultation et un examen des sous-populations lymphocytaires mettant en évidence une lymphopénie T profonde ($959 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$). La recherche de la délétion 22q11.2 a ensuite été demandée et a confirmé le diagnostic. L'enfant étant originaire de Mayotte, où les conditions de vie sont souvent difficiles et les risques infectieux majeurs, bénéficie d'une antibioprophylaxie par BACTRIM® et d'un suivi médical adapté à sa maladie.

3 enfants sont suivis pour une trisomie 21. La trisomie 21 est une anomalie chromosomique définie par la présence d'un 3^{ième} exemplaire du chromosome 21. Il ne s'agit pas d'une maladie rare mais son incidence a fortement chuté depuis la mise en place du dépistage prénatal. Elle se caractérise par une déficience mentale variable et par des particularités morphologiques, mais aussi par des malformations cardiaques (canal atrio-ventriculaire), digestives (atrésie duodénale), ... Chez ces patients, il existe aussi un surcroît d'infections ORL ou broncho-pulmonaires et de pathologie auto-immunes. Les désordres immunologiques, pouvant être rencontrés dans la trisomie 21, ne sont pas spécifiques. Les déficits peuvent donc toucher aussi bien l'immunité acquise qu'innée. Une lymphopénie T a été retrouvée chez les 2 enfants pour lesquels nous avons un compte rendu de cytométrie en flux. 1 avait une lymphopénie T sévère à $627 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$, néanmoins il souffrait également d'un chylothorax à la naissance. Pour le 3^{ième} enfant, le compte rendu de CMF n'a pas encore été récupéré. Il s'agit d'une trisomie 21 compliquée d'une atrésie duodénale. Il est très probable, au vu des valeurs basses des TRECs, que ce patient soit aussi lymphopénique T.

Parmi les enfants syndromiques, 1 enfant était atteint du syndrome de CHARGE. Il s'agit d'un ensemble d'anomalies congénitales caractérisé par l'association variable de plusieurs défauts, principalement un colobome (75 à 90 % des cas), des malformations cardiaques, une atrésie/sténose choanale, des anomalies des nerfs crâniens et de l'oreille. Le tableau clinique est extrêmement variable, car de nombreuses autres anomalies peuvent être associées. Des déficits immunitaires combinés ou à cellules T isolées peuvent aussi s'observer dans le syndrome de CHARGE. Par conséquent, ces patients ont eux aussi une susceptibilité augmentée pour les infections. L'enfant dépisté avait des TRECs indétectables et donc très probablement une lymphopénie T très profonde. Malheureusement, les sous-populations lymphocytaires n'ont pas pu être explorées chez cet enfant qui est décédé peu de temps après l'analyse des TRECs.

Pour finir, un enfant est suivi dans un service de gastroentérologie pour un syndrome d'atrésie multiple du grêle associé à un déficit immunitaire. L'atrésie intestinale multiple est habituellement une maladie congénitale mortelle impliquant des lésions multiples à différents niveaux du petit et/ou du gros intestin. Plusieurs cas sont associés à des déficits immunitaires combinés. Contrairement aux DIC où les infections opportunistes sont courantes, les patients atteints d'AIM-DIC souffrent fréquemment de sepsis causés par des bactéries intestinales. Le pronostic est très mauvais, à cause de la dépendance totale à l'alimentation parentérale et

aux sepsis répétés. Récemment, une équipe canadienne a montré, que l'AIM-DIC était liée à des mutations dans le gène TTC7A (tetratricopeptide repeat domain 7A). Chez l'enfant dépisté, une telle mutation a été mise en évidence. Cet enfant avait une lymphopénie T sévère à $693 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$, essentiellement T CD8^+ ($46 \text{ CD8}^+/\text{mm}^3$). Cette cytopénie T CD8^+ profonde est l'anomalie la plus constante rencontrée dans l'AIM-DIC (Agarwal, 2014). Les émigrants thymiques récents de type CD4^+ étaient en proportion normale. Il reste maintenant à bien comprendre le rôle du gène TTC7A dans le développement du système immunitaire.

8.2.4.2 Les lymphopénies T secondaires ($n = 9$)

Ce groupe représente les lymphopénies T secondaires à une condition médicale, telle que les malformations congénitales ou les intoxications médicamenteuses, sans défaut intrinsèque de production des cellules T. Sur les 42 enfants atteints d'une lymphopénie T non DICS, 9 (21.4%) ont une lymphopénie T secondaire. Tout d'abord, 2 enfants dépistés avaient des anomalies digestives. Le premier avait une duplication grêlique, anomalie congénitale rare, associée à des hétérotopies pancréatiques. Les manifestations cliniques, les plus couramment observées, sont l'occlusion intestinale et les saignements digestifs. Chez cet enfant, le tableau clinique s'est compliqué d'hémorragies digestives massives. Il est probable que les pertes de sang sont à l'origine de la fuite des lymphocytes circulant et de la lymphopénie T subnormale ($2310 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$). Le deuxième patient dépisté était prématuré (35 SA) et avait une hernie inguinale bilatérale prise en charge chirurgicalement. Il avait une lymphopénie sévère à $645 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$ avec un pourcentage normal de cellules T naïves et le test de prolifération lymphocytaire à la PHA était normal, permettant d'exclure un DICS. A noté qu'une hernie inguinale a été trouvée chez un autre enfant dépisté. Il s'agit d'un enfant prématuré pour lequel nous n'avons toujours pas réussi à récupérer les examens de cytométrie. De plus, 4 patients lymphopéniques, tous prématurés, avaient des manifestations cliniques résultant de l'extravasation des lymphocytes. 3 patients présentaient un chylothorax congénital permettant d'expliquer les lymphopénies. En effet, le chylothorax est un épanchement pleural de liquide lymphatique. Ce liquide biologique blanchâtre d'aspect laiteux est appelé le chyle et est constitué d'un mélange de graisses absorbé au niveau du jéjunum et de l'iléon et de lymphes (transsudat riche en lymphocytes et en déchets cellulaires). Ce liquide est transporté par le système lymphatique notamment à travers le conduit thoracique, le plus large vaisseau lymphatique. Ils existent 4 grands groupes étiologiques : 1) les tumeurs, 2) les traumatismes (chirurgicaux et non chirurgicaux), 3) idiopathiques, 4) autres causes rares. Les chylothorax néonataux appartiennent au 3^{ième} groupe. La physiopathologie est mal connue mais l'élévation de la pression veineuse fœtale au moment de la délivrance, associée à une faiblesse congénitale du conduit thoracique, serait en cause. La thérapeutique associe dans un premier temps le drainage de l'espace pleural et le régime pauvre en graisse (permet de diminuer le volume de lymphes). Le traitement chirurgical peut être envisagé dans certaines situations. Dans les chylothorax néonataux, les désordres immunologiques peuvent

être particulièrement sévères à cause des pertes de lymphes. Dans notre cas, il s'agit de 3 lymphopénies sévères 444-882-891 CD3⁺/mm³. Pour information, 1 enfant supplémentaire avait un chylothorax congénital mais nous n'avons toujours pas reçu les comptes rendus d'immunologie. L'autre enfant lymphopénique était prématuré et avait une ascite chyleuse lié à des lymphangiectasies. Les anomalies du drainage de la lymphe (vaisseaux lymphatiques dilatés ou rompus) sont responsables de la fuite des lymphocytes dans la cavité péritonéale et par conséquent de la lymphopénie. Un autre enfant dépisté souffrait de polymalformations congénitales. Il présentait une lymphopénie T globale, une diminution des CD4⁺ naïfs émigrant récent thymique et une lymphocytose B. De plus, 2 enfants atteints d'un syndrome polymalformatif ont été dépistés mais nous ne savons pas s'ils sont lymphopéniques (1 décédé et 1 prématuré). La dernière anomalie clinique répertoriée est une hernie diaphragmatique congénitale. Cet enfant a été opéré avant J3, c'est-à-dire avant le prélèvement du buvard. Il est possible que l'intervention chirurgicale ait endommagé le réseau lymphatique et soit responsable de la lymphopénie. D'autant plus qu'une hernie diaphragmatique avec prise en charge chirurgicale et apparition d'un chylothorax dans les suites opératoires a été retrouvée chez un autre bébé dépisté, mais il n'était pas lymphopénique lors du contrôle des sous-populations lymphocytaires (3100 CD3⁺/mm³).

Il est important de préciser que 5 enfants, présentant des anomalies cardiaques, ont été dépistés lors de l'étude. Cependant, aucun ne présentait de lymphopénie T au moment de l'examen des sous-populations lymphocytaires. Tout d'abord, le premier enfant présentait une cardiopathie congénitale rare de type malformation d'Ebstein de découverte anténatale. Il a développé une forme sévère de la maladie et est décédé avant la réalisation des explorations lymphocytaires. L'absence de délétion 22q11.2 a permis d'éliminer une maladie de DiGeorge. Ensuite, les 4 autres enfants cardiopathes ont bénéficié d'une chirurgie cardiaque précoce avant le prélèvement du buvard. Or, 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. Même si ces 4 enfants n'étaient pas lymphopéniques T, ils avaient tous des taux de lymphocytes T proche de la limite inférieure (2500 CD3⁺/mm³) : 2650-2602-2773-2744 CD3⁺/mm³. Dans le cadre des thymectomies, les lymphopénies sont transitoires et le délai d'environ 20 jours entre l'analyse des TRECs et l'étude des sous-populations lymphocytaires a peut-être permis la correction des lymphopénies.

Dans ce groupe des lymphopénies T secondaires à une condition médicale, un cas de toxicité médicamenteuse a été rapporté. Il s'agit d'une contamination transplacentaire par de l'IMUREL® (azathioprine). L'IMUREL® est un médicament immunosuppresseur couramment utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'azathioprine est une pro-drogue rapidement métabolisée en un métabolite actif : la 6-mercaptopurine (6-MP). La 6-MP agit comme un anti-métabolite interférant dans le métabolisme des purines. Elle inhibe la synthèse de novo des purines et donc altère la biosynthèse de l'ADN, empêchant ainsi la prolifération des cellules, en particulier des lymphocytes. La 6-MP est dégradée grâce

à trois enzymes : la thiopurine S methyltransférase (TPMT), l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT) et la xanthine oxidase (XO). Le génotypage de la mère et l'enfant a montré un gène TPMT muté, la mère était hétérozygote et l'enfant homozygote (aucune activité TPMT). Le déficit en TPMT entraîne une augmentation de la durée de vie de la 6-mercaptopurine ainsi qu'une augmentation de la conversion en thioguanine nucléotides myélotoxiques. En effet, l'enfant avait une lymphopénie globale profonde à $108 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$ et des TRECs indétectables ($0/0/5 \text{ copies}/\text{mm}^3$) mimant un déficit immunitaire combiné sévère. Comme la lymphopénie était sévère, l'enfant a bénéficié d'une antibioprophylaxie par BACTRIM® et aucune infection n'est survenue. La lymphopénie a persisté pendant 3 mois, par la suite l'évolution clinique a été satisfaisante. La mère a profité d'une adaptation de ces doses d'azathioprine en fonction de son activité TPMT. Pour finir, un enfant a été dépisté après que sa maman avait reçu plusieurs cures de FEC 100 (5-FU, épirubicine, cyclophosphamide) et de TAXOTERE® dès le 1^{er} trimestre de la grossesse pour traiter un cancer du sein. Il est probable que l'utilisation de chimiothérapies hématotoxiques est un lien avec la positivité du test, à cause du passage transplacentaire de ces molécules. De plus, la capacité du nouveau-né à métaboliser et excréter de nombreuses drogues demeure sous-développée à la naissance, c'est pourquoi l'accouchement a lieu de préférence au moins 3 semaines après la dernière cure. Un mois après la naissance, l'enfant n'était pas lymphopénique ($3361 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$) et les TRECs s'étaient normalisés ($97 \text{ copies}/\text{mm}^3$).

8.2.4.3 Les lymphopénies T idiopathiques (n = 17)

Ce groupe correspond aux lymphopénies T pour lesquels aucune cause, permettant de les expliquer, n'a été retrouvée. Cliniquement ces bébés vont bien, mais ils sont plus ou moins lymphopéniques et peuvent avoir des fonctions cellulaires altérées. A la mi-étude, 17 nouveau-nés ont été dépisté, soit 40.5 %. Parmi ces enfants, 4 avait des lymphopénies sévères ($< 1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$) et ont donc bénéficié d'un suivi particulier avec des explorations plus approfondies (recherche de délétion 22q11.2, dosage de l'activité ADA, ...). A 12 mois, une mutation délétère hétérozygote du gène ADA (p.R235Q) a été identifiée chez un de ces enfants lymphopéniques sévères. Durant l'année, ce bébé a toujours eu des lymphocytes T très bas entre 828 et $1057 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$ et plusieurs infections (bronchiolite, otite, laryngite, rhinopharyngite) pendant la période hivernale. Généralement, les mutations hétérozygotes sont responsables d'une diminution de l'activité adénosine déaminase de moitié. Ces patients ne sont habituellement pas lymphopéniques, car une activité enzymatique résiduelle d'environ 50 % permet d'éviter l'accumulation des métabolites toxiques. En attendant, les résultats de l'activité en ADA, cet enfant est classé dans ce groupe.

8.2.4.4 Les prématurés sans autre anomalie (n = 2)

La prématurité peut être une cause à elle seule de positivité ou d'invalidité du test de dépistage. En effet, plusieurs raisons permettent d'expliquer ce résultat : faible poids des bébés, prélèvement des gouttes de sang à travers un cathéter (sang dilué, inhibiteur de RT-PCR), valeur seuil de TRECs différentes des enfants nés à terme. Au final, peu d'enfants ont nécessité une consultation et une exploration des sous-populations lymphocytaires car dans la plupart des cas, le dosage des TRECs sur le 2^{ème} buvard se normalise. Parmi les enfants dépistés, seulement 2 avaient une prématurité isolée associée à une lymphopénie T. Il s'agissait de deux très grands prématurés (25 et 27 SA) et sont décédés. L'immaturité du système immunitaire à la naissance chez les prématurés peut expliquer les lymphopénies. En général, elles se corrigent avec le temps plus ou moins rapidement en fonction du déficit initial. De plus, 3 autres enfants prématurés ont été dépistés, mais ils n'étaient pas lymphopéniques au moment de l'analyse des sous-populations lymphocytaires.

8.2.4.5 Absence d'information clinique (n = 7)

Pour ces 7 enfants, nous n'avons toujours pas réussi à obtenir des informations cliniques. 1 avait une lymphopénie sévère (1349 CD3⁺/mm³) et 1 autre était prématuré (26 SA).

Diagnostics	TREC Copies/ μL	CD3 ⁺ (2500- 5500/μL)	CD4 ⁺ (1600- 4000/μL)	CD8 ⁺ (560- 1700/μL)	CD45 RA ⁺ %	CD19 ⁺ (300- 2000/μL)	Autres commentaires
I. <u>Cibles primaires</u>							
A. DICS typiques (n = 1)							
1) DICS lié à l'X	0-4	1153	524	461	x	860	IgA et IgM subnormales, test de prolifération lymphocytaire à la PHA diminué, mutation c697delA
B. DICS atténués (n = 0)							

C. Syndromes de Omenn (n = 0)

II. Cibles secondaires

A. Syndromes associés à une lymphopénie T (n = 6)

2) Syndrome de DiGeorge	6-21	1172	899	246	87.4	x	Prématurité 31 SA, tétralogie de Fallot, malformations ORL, petit thymus (TDM), diagnostic anténatal échographique
3) Syndrome de DiGeorge	9-18	1488	1023	434	99	837	Tétralogie de Fallot, petit thymus (TDM), diagnostic anténatal échographique
4) Syndrome de DiGeorge	11-24	959	700	204	x	972	Test de prolifération lymphocytaire à la PHA normal, petit thymus (TDM), absence d'anomalie échographique (pas de diagnostic anténatal)
5) Trisomie 21	13-28	1730	1296	351	87.8	232	Anomalies cardiaques échographiques, petit thymus (TDM)
6) Trisomie 21	9-23	627	388	209	84	552	Chylothorax
7) Syndrome d'atrésie multiple du grêle	13-28	693	615	46	81	584	Lymphopénie T CD8 ⁺ profonde

B. Lymphopénies T secondaires (n = 9)

8) Anomalie gastro-intestinale	13-24	2310	1386	660	96	462	Duplication grêlique avec hétérotopies pancréatiques, hémorragie digestive massive
9) Anomalie gastro-intestinale	4-13	645	598	72	x	733	Hernie inguinale bilatérale, prématurité, test de prolifération lymphocytaire à la PHA normal
10) Anomalie congénitale multiple	6-20	1243	718	377	55	3275	Syndrome polymalformatif
11) Fuite dans le 3 ^{ème} secteur	2-22	990	608	135	82	832	Ascite chyleuse lié à des lymphangiectasie, prématurité
12) Fuite dans le 3 ^{ème} secteur	0-4	882	305	513	86	561	Chylothorax congénital, prématurité
13) Fuite dans le 3 ^{ème} secteur	9-12	444	281	156	x	891	Chylothorax congénital, prématurité
14) Fuite dans le 3 ^{ème} secteur	1-10	891	567	270	81	1323	Chylothorax congénital, prématurité

15) Anomalie pulmonaire	3-7	2339	x	x	x	763	Hernie diaphragmatique congénitale, opérée avant J3
16) Toxicité médicamenteuse	0-5	108	80	25	x	<5	Activité TPMT diminuée chez la maman et effondrée chez le BB, contamination transplacentaire par IMUREL

C. Lymphopénies T idiopathiques (n = 17)

D. Prématurité sans autre anomalie (n = 2)

E. Absence d'information clinique (n = 7)

Tableau 5 : Etiologies des lymphopénies T rencontrées dans l'étude DEPISTREC à la mi-étude (n = 42 enfants).

Pour conclure, le dépistage néonatal des DICS et des lymphopénies T a détecté 129 patients, mais seulement 42 enfants sont considérés comme des vrais positifs (vrais lymphopénies T) sur les 109 immunophénotypages récupérés, soit 38.5 %. Si on prend l'ensemble des enfants dépistés, le taux de faux positif est compris entre 0.066 et 0.085 %. Parmi ces 42 nouveau-nés, 35 renseignements cliniques ont été récupérés et dans la moitié des cas, une étiologie expliquant la lymphopénie T a été retrouvée (51.4 %). La *Figure 25* est une représentation schématique des différentes étiologies en fonction des valeurs de CD3⁺, permettant de voir rapidement les causes les plus lymphopéniantes et donc les plus sévères.

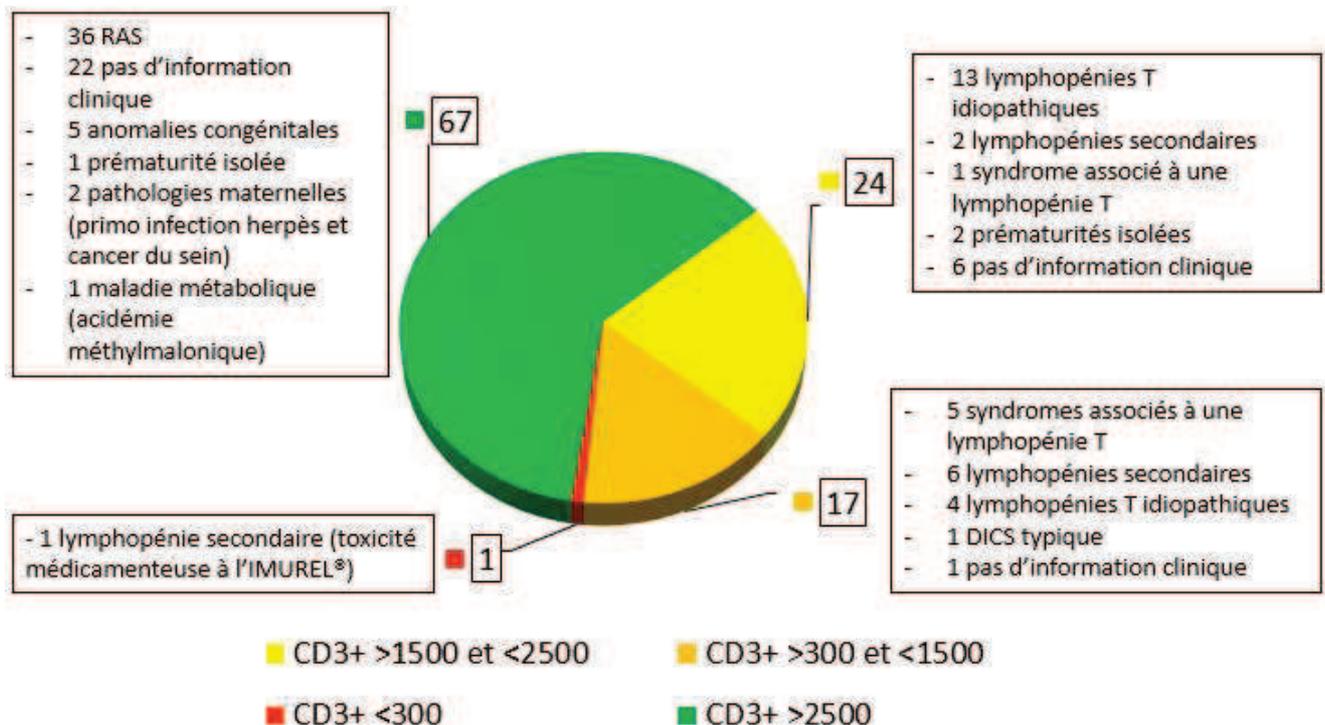


Figure 25 : Répartition des étiologies en fonction des valeurs absolues de CD3⁺ (n = 109).

On remarque facilement, que plus le nombre de cellules T est bas plus la probabilité de lui associer une étiologie est élevée. Par exemple, 12 causes ont été rencontrées parmi les 17 lymphopénies T inférieures à $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$, soit 70.6 %. Tandis que dans le groupe 1500-2500 $\text{CD3}^+/\text{mm}^3$, dans 20.8 % des cas seulement une anomalie a été retrouvée. Pour le groupe des patients non lymphopéniques (supérieur à $2500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$), la majorité des enfants (53.7 %) ne présentait aucune anomalie lors de la consultation. A noté qu'une ville ne voyait pas systématiquement en consultation les enfants non lymphopéniques, permettant d'expliquer le nombre plus important d'absence de renseignement clinique dans ce dernier groupe (32.8 % contre 25 % dans le groupe 1500-2500 $\text{CD3}^+/\text{mm}^3$ et 5.9 % pour le groupe des lymphopénies sévères).

Ensuite, nous nous sommes intéressés au caractère persistant ou transitoire des lymphopénies T sévères et plus particulièrement aux patients atteints de lymphopénies T idiopathiques. Parmi les patients avec syndrome associé à une lymphopénie, 5 avaient moins de $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$. 2 syndromes de DiGeorge avaient encore des comptes lymphocytaires anormaux plus de 2 mois après les premiers examens, montrant le caractère persistant de la lymphopénie. Pour l'autre DiGeorge, le bébé est retourné vivre à Mayotte et nous n'avons pas encore récupéré les immunophénotypes de contrôle. Seulement 1 patient trisomique 21 (avec chylothorax) avait une anomalie sévère, mais il n'y a pas eu de phénotypage de contrôle. Cependant, pour les deux autres enfants trisomiques dépistés, des contrôles ont été réalisés et il semblerait que les lymphopénies soient moins sévères et s'améliorent avec le temps. Pour le nouveau-né atteint du syndrome d'atrésie intestinale multiple, les examens de suivi sont en cours de récupération auprès du service de gastroentérologie. Parmi les patients atteints d'une lymphopénie T secondaires, 7 avaient moins de $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$. 4 avait une extravasation de lymphocytes (3 chylothorax et 1 ascite chyleuse associée à des lymphangiectasies). Pour 3 enfants, le nombre de lymphocytes T s'est normalisé au bout de 2 mois et pour l'autre enfant, il n'y a pas eu de contrôle. Dans ces situations de fuite lymphocytaire, les lymphopénies s'avèrent plutôt transitoires. 2 bébés avaient des anomalies congénitales (hernie inguinale et syndrome polymalformatif) et des immunophénotypes à 2 mois anormaux. Le dernier enfant correspond à l'intoxication à l'IMUREL®, pour qui la lymphopénie T a persisté 3 mois avant de se corriger. L'enfant atteint d'un DICS typique greffé *in-utero* avait moins de $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$ à la naissance, mais les lymphocytes T se sont normalisés par la suite témoignant d'une bonne prise de greffe. Parmi les patients atteints de lymphopénies T idiopathiques, 4 avaient moins de $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$. 3, dont l'enfant avec la mutation délétère hétérozygote du gène ADA (p.R235Q), ont toujours des lymphopénies T. Ces derniers bénéficient actuellement d'un suivi médical et d'explorations complémentaires (génotypage, dosage enzymatique, ...) afin de trouver une explication au déficit T persistant. Le 4^{ème} enfant n'a plus de lymphopénie. Pour finir, nous n'avons pas réussi pour le moment à récupérer les informations cliniques et les immunophénotypes de contrôle pour un enfant né lymphopénique sévère ($1349 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$) à 41 SA.

9 Discussion

Dans ce travail, nous présentons les résultats à mi-étude du premier programme national de dépistage néonatal des DICS en France grâce à l'analyse des TREC par PCR sur de l'ADN extrait à partir de sang séché sur buvard. Au total, 268 sur 101938 nouveau-nés testés avaient un nombre de TREC en-dessous la valeur seuil, soit 0.26 % d'enfants positifs. Pour 152 d'entre eux, en raison de la prématurité ou de l'absence d'amplification du gène de référence, un nouveau buvard a été demandé. Parmi ces enfants, 13 avaient toujours un dépistage anormal. Ces 13 enfants ainsi que les 116 autres enfants qui avaient un nombre de TREC en-dessous de la valeur seuil, ont bénéficié normalement au minimum d'une consultation spécialisée, d'une numération formule sanguine et d'une exploration des sous-populations lymphocytaires par cytométrie en flux. L'immunophénotypage a confirmé la présence d'une lymphopénie T chez 42 enfants sur les 109 bilans d'immunologie récupérés (38.5 %).

Malheureusement, un certain nombre de comptes rendus cliniques et/ou biologiques n'ont pas pu être récupérés pour le moment. En général, il était assez aisé de retrouver les informations des enfants nés en province puisque il y avait moins de positifs, moins de maternités et moins de pédiatres. Tandis que dans la région parisienne, le nombre important de maternités investigatrices et de praticiens référents rendait le travail de récupération des données plus difficile. Cependant on remarque facilement sur la *Figure 25*, que le plus grand nombre d'informations cliniques manquantes se situe dans le groupe des patients non lymphopéniques. En effet, une ville ne voyait pas systématiquement en consultation les enfants non lymphopéniques, il n'y a donc pas de renseignements cliniques pour ces derniers. On peut aussi voir, que les informations des patients les plus graves ont été majoritairement récupérées. Par contre, il nous manque toujours 20 immunophénotypages et il est impossible de savoir s'il s'agit de patients lymphopéniques ou non.

Sur les 101938 enfants testés, 1 DICS a été identifié, soit une incidence d'environ 1 pour 102000 naissances à ce stade de l'étude. Pour rappel, les DICS ont une incidence à 1 pour 100000 naissances/an pour l'estimation la plus basse (MMWR, 2004), et 1 pour 58000 naissances/an pour la plus forte et la plus récente (Kwan, 2014). On peut voir, que l'incidence est légèrement supérieure à l'estimation la plus basse, mais c'est probablement secondaire à la rareté relative de la maladie. Il faudra attendre la fin de l'étude pour avoir une évaluation précise. De plus, 1 nouveau DICS a été détecté vers les 120000 enfants testés. Par conséquent, l'incidence passe à 1 pour 60000 naissances, se rapprochant nettement de l'estimation la plus fine (1 pour 58000 naissances/an). A la mi-étude, l'incidence des lymphopénies T non DICS est de 1 pour 2486 naissances. Dans la méta-analyse de Kwan (Kwan, 2014), cette incidence est estimée à 1 pour 14000 naissances (95%CI, 1/11600-1/16400) et varie entre 1/32000 (Californie) à 1/2600 (Texas) en fonction des États. Il y a donc une différence importante entre notre estimation et la leur. Cependant, la valeur seuil utilisée pour définir une lymphopénie T

non DICS n'est pas la même que celle que nous avons prise : $< 1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$ contre $< 2500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$. Nous avons détecté 16 enfants avec moins de $1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$ (lymphopénies sévères), soit une incidence de 1 pour 6371 naissances. Notre estimation reste supérieure, peut-être à cause d'une sensibilité trop importante du test de dépistage pour les lymphopénies T non DICS.

La sensibilité de l'analyse des TRECs ou la capacité du dépistage à détecter correctement les nouveau-nés atteints d'un DICS, est de 100 %. En effet, les tests de dépistage étaient positifs pour tous les échantillons de contrôle (contrôles externes de qualité, groupe contrôle). De plus, aucun cas manqué n'est à déplorer pour le moment (c'est-à-dire avant la récupération des statuts vitaux à 18 mois et des causes de décès des enfants) dans le groupe dépistage. Quant à la spécificité, elle est estimée à 99.87 % (128 faux positifs). Ces performances sont identiques à celles rencontrées dans la littérature (Ding, 2016). Par contre, il est impossible de connaître le nombre d'enfants nés avec une lymphopénie T non DICS. Sans cette information, on ne peut pas calculer avec précision la sensibilité et la spécificité de l'analyse des TRECs pour détecter une lymphopénie T sévère.

En France, les programmes de dépistage néonatal doivent répondre à trois conditions : égalité, efficacité et utilité (voir le chapitre : *Le dépistage néonatal*). En ce qui concerne les déficits immunitaires combinés sévères, ils remplissent bien les critères généraux pour un dépistage néonatal (MMWR, 2004). De plus, plusieurs études médico-économiques ont prouvé son bénéfice pour la population (Chan, 2011 ; Ding, 2016). Par contre, les lymphopénies T non DICS ne répondent pas à l'ensemble des critères pour un dépistage. Par exemple, elles ne sont pas toutes fatales avant l'âge de 1 an en l'absence de traitement, il n'y a pas forcément de traitement et la survie n'est pas meilleure si le traitement est effectué avant 3.5 mois. De plus, les tests de dépistage ne sont probablement pas efficaces (sensibilité et spécificité non calculables) pour détecter ces lymphopénies. Sur les 109 immunophénotypes récupérés, seulement 41 avaient réellement une lymphopénie T non DICS, soit un taux de faux positifs (défini ici comme les enfants ayant eu un dépistage positif mais un compte de cellules T normal) qui était de 62.4 %. Ce pourcentage augmente à 85.3 %, si on prend la valeur seuil $< 1500 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$. C'est supérieur au 64 % (95%CI, 59-68 %) rapporté dans l'étude de Ding (Ding, 2016). Ensuite, l'utilité de la détection des lymphopénies T non DICS au travers du dépistage des DICS reste à déterminer. De manière générale, le dépistage a un intérêt si un résultat positif engendre un bénéfice pour le malade. Dans notre cohorte, trois enfants cependant ont bénéficié d'une intervention médicale, dont ils n'auraient pas profité s'ils n'avaient pas été dépistés. Tout d'abord, un enfant atteint d'un syndrome de DiGeorge ne présentant pas d'anomalies cardiaques ou d'autres signes associés à la maladie a été dépisté. Suite au dépistage positif, il a eu une consultation et un examen des sous-populations lymphocytaires confirmant une lymphopénie T profonde ($959 \text{ CD3}^+/\text{mm}^3$). L'enfant étant originaire de Mayotte, où les conditions de vie sont souvent difficiles et les risques infectieux majeurs, a bénéficié d'une antibioprophylaxie par BACTRIM® et d'un suivi médical adapté à sa maladie avant son départ. Ensuite, deux anomalies

généétiques ont été mises en évidence grâce au dépistage : mutation du gène *TPMT* et du gène *ADA*. C'est deux enfants pourront profiter d'un conseil génétique afin de les informer sur les risques et les conséquences de leurs mutations. Par conséquent, l'intérêt du dépistage des lymphopénies T non DICS reste limité (3 patients). En revanche, son coût est bien réel et influe le rapport coût/bénéfice du dépistage. Le coût additionnel des lymphopénies T transitoires a été estimé à 2360 \$. Et celui des lymphopénies T idiopathiques et des autres lymphopénies T non DICS a été évalué à 6000 \$ chacun (Ding, 2016). Attention, il ne faudrait pas dépister inutilement trop de lymphopénies T non DICS, au risque de diminuer le ratio coût/bénéfice.

Il est intéressant de comparer le taux de rappel de l'étude de DEPISTREC avec ceux des autres dépistages néonataux nationaux pour évaluer l'algorithme décisionnel. En France, le test de Guthrie permet de dépister 4 maladies génétiques : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales et la mucoviscidose. En 2014, leurs taux de rappel pour une consultation étaient respectivement de : 0.016 %, 0.061 %, 0.028 % et 0.050 % (AFDPHE, 2014). Le taux de rappel de l'étude DEPISTREC est supérieur, 0.13% à la mi-étude. Un taux de rappel trop élevé augmente le coût global du dépistage (plus de consultations, d'exams complémentaires, ...) et donc modifie le rapport coût/bénéfice. De plus, le rappel d'une famille pour une consultation génère une anxiété dans la famille qui doit être prise en compte. La diminution du taux de rappel passe nécessairement par la modification des valeurs seuils et l'établissement d'un nouvel algorithme décisionnel.

En avril 2016, un nouvel algorithme est mis en application pour diminuer le taux de rappel et se rapprocher au maximum des valeurs des autres dépistages néonataux. Seule la conduite à tenir en cas de dépistage positif chez les bébés nés à terme change. Sur le premier buvard, uniquement les enfants nés à terme avec des TRECs inférieurs à 11 copies/mm³ sur au moins deux dosages sont vus directement en consultation contre 21 copies/mm³ auparavant. Pour ceux nés à terme avec des valeurs de TRECs entre 11 et 20 copies/mm³, un nouveau buvard est demandé. L'arbre décisionnel du buvard de contrôle ne change pas. Concernant la détection des DICS, la modification des valeurs seuils n'influence pas la sensibilité du test, puisque les enfants malades ont des TRECs indétectables ou très bas (< 11 copies/mm³). Par contre, elle permet d'améliorer sa spécificité en diminuant le nombre de faux positifs. En effet, la détection des lymphopénies T à travers le dépistage des DICS est modifiée. Dans un premier temps, le test détecte les enfants les plus sévèrement atteints, c'est-à-dire avec des TRECs inférieurs à 11 copies/mm³. Ceci permet de voir en consultation les lymphopénies T les plus profondes dès l'analyse du premier buvard. Par contre, pour les enfants avec des TRECs intermédiaires entre 11 et 20 copies/mm³, un second prélèvement est demandé à l'image de ce qui est déjà fait avec les nouveau-nés prématurés. Ce délai supplémentaire permet d'éviter de dépister les lymphopénies T transitoires, tout en détectant encore les lymphopénies T persistantes mais moins sévères.

Comme nous avons récupéré les valeurs des TRECs issues de l'analyse des buvards de contrôle, nous sommes en mesure de connaître le taux de rappel avec le nouvel algorithme.

Si ce nouvel algorithme avait été mis en place dès le début de l'étude, 41 enfants auraient été convoqués pour une consultation et des examens complémentaires. Parmi ces derniers, 32 auraient été dépistés dès l'analyse du premier buvard, c'est-à-dire 2 TRECs inférieurs à 11 copies/mm³ pour les enfants nés à terme et inférieurs à 5 copies/mm³ pour les prématurés. Dans ce groupe, on retrouve entre autres l'enfant atteint du DICS typique greffé *in-utero*, 8 lymphopénies secondaires, 4 lymphopénies idiopathiques et 1 syndrome associé à une lymphopénie T... Ensuite, les 97 nouveau-nés restant auraient été convoqués pour un buvard de contrôle. Pour 36 de ces bébés, il n'y a pas eu de buvards de contrôle, il est impossible de savoir s'ils auraient été dépistés. Par conséquent, 41 est le nombre de rappel minimal. 9 auraient été vus en consultation après le deuxième buvard, on trouve notamment 3 syndromes associés à une lymphopénie T, 1 lymphopénie idiopathique, ... Par contre, 52 enfants ont des TRECs normaux après l'analyse du buvard de contrôle et ne sont donc plus positifs au dépistage. Avec cet algorithme, le nouveau taux de rappel est au minimum de 0.04 % et est comparable aux autres dépistages néonataux nationaux. Sur les 41 enfants, 32 immunophénotypages ont été récupérés montrant 21 lymphopénies T, soit un taux de faux positifs (défini ici comme les enfants ayant eu un dépistage positif mais un compte de cellules T normal) de 34.4 % nettement inférieur qu'avec l'ancien algorithme (62.4 %). La spécificité du test est maintenant de 99.96 % contre 99.87 % auparavant. De plus, le nouvel algorithme permet de détecter la quasi-totalité des enfants les plus gravement atteints, c'est-à-dire ceux dont l'état de santé est susceptible de requérir une intervention médicale. En effet, 14 lymphopénies T sévères sont détectées au minimum (pas de buvard de contrôle pour 2 enfants) contre 17 avec l'ancien algorithme. L'ensemble de ces résultats sont schématisés dans la Figure 26.

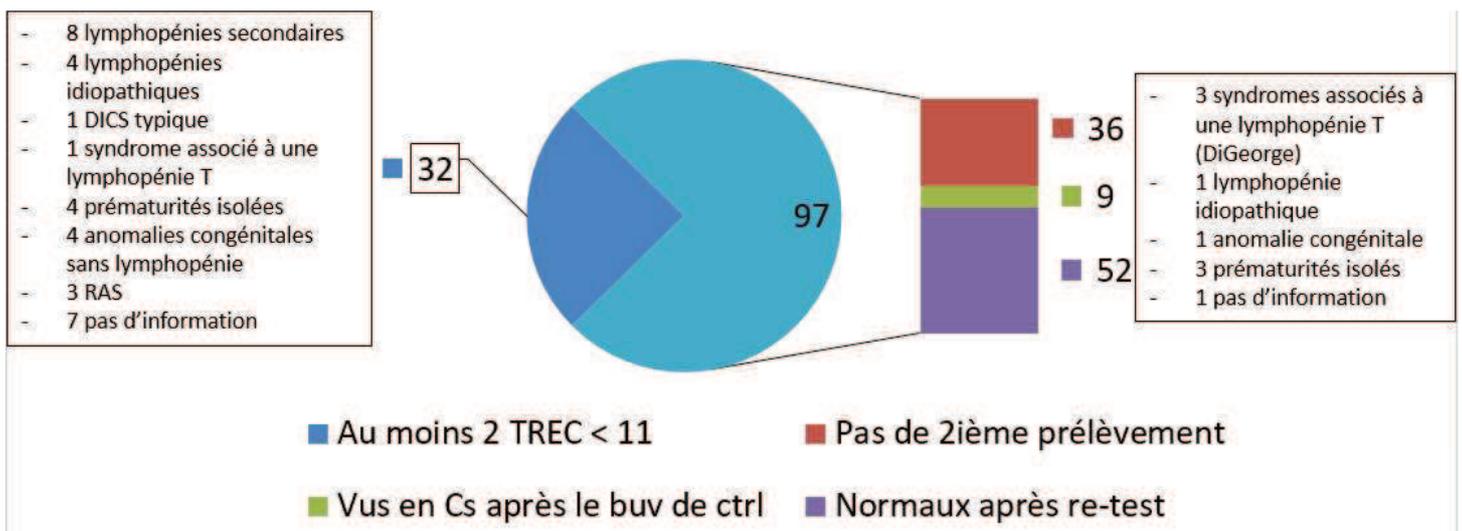


Figure 26 : Répartition des 129 enfants dépistés avec le nouvel algorithme en fonction du résultat de l'analyse des TRECs. Soit au minimum 41 enfants vus en consultation au lieu de 129.

Pour conclure, le dépistage néonatal des déficits immunitaires combinés sévères est réalisable en France avec cette organisation nationale. Tout d'abord, l'étude montre que l'analyse des TRECs détecte efficacement les DICS permettant une prise en charge rapide des enfants atteints. De plus, certaines lymphopénies T non DICS, pouvant engager le pronostic vital, sont trouvées au travers de ce test. Cependant, l'utilité de la détection des lymphopénies T non DICS reste à être déterminée. En effet, elle représente un coût non négligeable pour un intérêt qui semble pour le moment limité. A la fin de l'étude, les valeurs seuils seront recalculées afin d'optimiser le test pour une spécificité la plus haute possible tout en assurant une sensibilité de 100%. Le travail de recueil des renseignements cliniques et biologiques des bébés dépistés se poursuivra également. Le statut vital de tous les enfants inclus sera recherché ainsi que les causes de décès afin de vérifier qu'aucun cas de DICS n'a été « manqué » par le dépistage. L'étude médico-économique évaluera le rapport coût/efficacité de la mise en place du dépistage généralisé des DICS à la fin de l'étude. L'ensemble de ces données seront présentées aux autorités, notamment la Haute Autorité de Santé qui a été saisie par le Direction Générale de la Santé pour émettre des recommandations concernant ce dépistage. Le test de quantification des TRECs bénéficie d'ores et déjà d'une inscription au Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature (RIHN) qui va permettre de continuer à proposer le test. Le dépistage néonatal pourrait ensuite être implémenté sur décision ministérielle.

10 Références bibliographiques

AFDPHE (2014). Bilan AFDPHE 2014.

Agarwal, N.S., Northrop, L., Anyane-Yeboah, K., Aggarwal, V.S., Nagy, P.L., and Demirdag, Y.Y. (2014). Tetratricopeptide Repeat Domain 7A (TTC7A) Mutation in a Newborn with Multiple Intestinal Atresia and Combined Immunodeficiency. *J. Clin. Immunol.* *34*, 607–610.

Aiuti, A., Vai, S., Mortellaro, A., Casorati, G., Ficara, F., Andolfi, G., Ferrari, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Ochs, H.D., et al. (2002a). Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat. Med.* *8*, 423–425.

Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., et al. (2002b). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* *296*, 2410–2413.

Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolo, M., Brigida, I., et al. (2009). Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* *360*, 447–458.

Antoine, C., Müller, S., Cant, A., Cavazzana-Calvo, M., Veys, P., Vossen, J., Fasth, A., Heilmann, C., Wulffraat, N., Seger, R., et al. (2003). Long-term survival and transplantation of haemopoietic stem cells for immunodeficiencies: report of the European experience 1968-99. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 553–560.

Audrain, M., Thomas, C., Mirallie, S., Bourgeois, N., Sebille, V., Rabetrano, H., Durand-Zaleski, I., Boisson, R., Persyn, M., Pierres, C., et al. (2014). Evaluation of the T-cell receptor excision circle assay performances for severe combined immunodeficiency neonatal screening on Guthrie cards in a French single centre study. *Clin. Immunol.* *150*, 137–139.

Bonilla, F.A., Khan, D.A., Ballas, Z.K., Chinen, J., Frank, M.M., Hsu, J.T., Keller, M., Kobrynski, L.J., Komarow, H.D., Mazer, B., et al. (2015). Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* *136*, 1186–1205.e78.

Booth, C., and Gaspar, H.B. (2009). Pegademase bovine (PEG-ADA) for the treatment of infants and children with severe combined immunodeficiency (SCID). *Biol. Targets Ther.* *3*, 349–358.

Bory, C., Bouliou, R., Souillet, G., Chantin, C., Rolland, M.O., Mathieu, M., and Hershfield, M. (1990). Comparison of red cell transfusion and polyethylene glycol-modified adenosine deaminase therapy in an adenosine deaminase-deficient child: measurement of erythrocyte deoxyadenosine triphosphate as a useful tool. *Pediatr. Res.* *28*, 127–130.

Brown, L., Xu-Bayford, J., Allwood, Z., Slatter, M., Cant, A., Davies, E.G., Veys, P., Gennery, A.R., and Gaspar, H.B. (2011). Neonatal diagnosis of severe combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. *Blood* *117*, 3243–3246.

Buckley, R.H. (2000). Primary immunodeficiency diseases due to defects in lymphocytes. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1313–1324.

Buckley, R.H., Schiff, S.E., Schiff, R.I., Markert, L., Williams, L.W., Roberts, J.L., Myers, L.A., and Ward, F.E. (1999). Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* *340*, 508–516.

Buckley RH (2004). Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. - PubMed - NCBI.

Buckley RH, et al (1997). Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. - PubMed - NCBI.

Candotti, F., Oakes, S.A., Johnston, J.A., Giliani, S., Schumacher, R.F., Mella, P., Fiorini, M., Ugazio, A.G., Badolato, R., Notarangelo, L.D., et al. (1997). Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* *90*, 3996–4003.

Cavadini, P., Vermi, W., Facchetti, F., Fontana, S., Nagafuchi, S., Mazzolari, E., Sediva, A., Marrella, V., Villa, A., Fischer, A., et al. (2005). AIRE deficiency in thymus of 2 patients with Omenn syndrome. *J. Clin. Invest.* *115*, 728–732.

Cavazzana-Calvo M., et al, C.-C.M., et (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. - PubMed - NCBI.

Chan, K., Davis, J., Pai, S.-Y., Bonilla, F.A., Puck, J.M., and Apkon, M. (2011). A Markov model to analyze cost-effectiveness of screening for severe combined immunodeficiency (SCID). *Mol. Genet. Metab.* *104*, 383–389.

Chan K. and Puck, J. (2005). Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. - PubMed - NCBI.

Clément, M.C., Mahlaoui, N., Mignot, C., Le Bihan, C., Rabetrano, H., Hoang, L., Neven, B., Moshous, D., Cavazzana, M., Blanche, S., et al. (2015). Systematic neonatal screening for severe combined immunodeficiency and severe T-cell lymphopenia: Analysis of cost-effectiveness based on French real field data. *J. Allergy Clin. Immunol.* *135*, 1589–1593.

Comeau (2008). Development and Validation of a Multiplex Assay for Identification of Infants with SCID.

Comeau, A.M., Hale, J.E., Pai, S.-Y., Bonilla, F.A., Notarangelo, L.D., Pasternack, M.S., Meissner, H.C., Cooper, E.R., DeMaria, A., Sahai, I., et al. (2010). Guidelines for implementation of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* *33*, 273–281.

Ding, Y., Thompson, J.D., Kobrynski, L., Ojodu, J., Zarbalian, G., and Grosse, S.D. (2016). Cost-Effectiveness/Cost-Benefit Analysis of Newborn Screening for Severe Combined Immune Deficiency in Washington State. *J. Pediatr.* *172*, 127–135.

Douek DC, et al (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. - PubMed - NCBI.

Gaspar, H.B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K.C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L.D., et al. (2006). Successful reconstitution of

immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 505–513.

Gennery, A.R., Slatter, M.A., Grandin, L., Taupin, P., Cant, A.J., Veys, P., Amrolia, P.J., Gaspar, H.B., Davies, E.G., Friedrich, W., et al. (2010). Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in Europe: entering a new century, do we do better? *J. Allergy Clin. Immunol.* 126, 602-610-11.

van Gent, R., van Tilburg, C.M., Nibbelke, E.E., Otto, S.A., Gaiser, J.F., Janssens-Korpela, P.L., Sanders, E. a. M., Borghans, J. a. M., Wulffraat, N.M., Bierings, M.B., et al. (2009). Refined characterization and reference values of the pediatric T- and B-cell compartments. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 133, 95–107.

Gerstel-Thompson, J.L., Wilkey, J.F., Baptiste, J.C., Navas, J.S., Pai, S.-Y., Pass, K.A., Eaton, R.B., and Comeau, A.M. (2010). High-Throughput Multiplexed T-Cell-Receptor Excision Circle Quantitative PCR Assay with Internal Controls for Detection of Severe Combined Immunodeficiency in Population-Based Newborn Screening. *Clin. Chem.* 56, 1466–1474.

Giblett ER, et al Pillars article: Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *The Lancet.* 1972. 300: 1067-1069. - PubMed - NCBI.

Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J.-P., Thrasher, A.J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., et al. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* 346, 1185–1193.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415–419.

HCSP (2012). Vaccinations des personnes immunodéprimées ou aspléniques. Recommandations (Paris: Haut Conseil de la Santé Publique).

Hershfield, M.S., Buckley, R.H., Greenberg, M.L., Melton, A.L., Schiff, R., Hatem, C., Kurtzberg, J., Markert, M.L., Kobayashi, R.H., and Kobayashi, A.L. (1987). Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase. *N. Engl. J. Med.* 316, 589–596.

Janik, D.K., Lindau-Shepard, B., Comeau, A.M., and Pass, K.A. (2010). A Multiplex Immunoassay Using the Guthrie Specimen to Detect T-Cell Deficiencies Including Severe Combined Immunodeficiency Disease. *Clin. Chem.* 56, 1460–1465.

Kwan, A., Abraham, R.S., Currier, R., Brower, A., Andruszewski, K., Abbott, J.K., Baker, M., Ballow, M., Bartoshesky, L.E., Bonilla, F.A., et al. (2014). Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States. *JAMA* 312, 729.

Lynch, M., Baker, E., Park, L.S., Sutherland, G.R., and Goodwin, R.G. (1992). The interleukin-7 receptor gene is at 5p13. *Hum. Genet.* 89, 566–568.

McGhee SA, et al (2005a). Potential costs and benefits of newborn screening for severe combined immunodeficiency. - PubMed - NCBI.

McGhee SA, et al (2005b). Two-tiered universal newborn screening strategy for severe combined immunodeficiency. - PubMed - NCBI.

Mitchell, B.S., Mejias, E., Daddona, P.E., and Kelley, W.N. (1978). Purinogenic immunodeficiency diseases: selective toxicity of deoxyribonucleosides for T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5011–5014.

MMWR (2004). Applying Public Health Strategies to Primary Immunodeficiency Diseases: A Potential Approach to Genetic Disorders.

Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology* (New York: Garland Science).

Noguchi, M., Yi, H., Rosenblatt, H.M., Filipovich, A.H., Adelstein, S., Modi, W.S., McBride, O.W., and Leonard, W.J. (1993). Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 73, 147–157.

Notarangelo, L.D. (2010). Primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S182–S194.

Notarangelo, L.D., Mella, P., Jones, A., de Saint Basile, G., Savoldi, G., Cranston, T., Vihinen, M., and Schumacher, R.F. (2001). Mutations in severe combined immune deficiency (SCID) due to JAK3 deficiency. *Hum. Mutat.* 18, 255–263.

Notarangelo, L.D., Fischer, A., Geha, R.S., Casanova, J.-L., Chapel, H., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Hammartröm, L., Nonoyama, S., et al. (2009). Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124, 1161–1178.

Ojodu, J. (2015). Advisory Committee on Heritable Disorders in Newborns and Children : UPDATES ON IMPLEMENTATION OF SCREENING FOR SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY, CRITICAL CONGENITAL HEART DISEASE, AND POMPE DISEASE [http meeting august 28, 2015](http://meeting.august28,2015).

Polmar, S.H., Wetzler, E.M., Stern, R.C., and Hirschhorn, R. (1975). Restoration of in-vitro lymphocyte responses with exogenous adenosine deaminase in a patient with severe combined immunodeficiency. *Lancet Lond. Engl.* 2, 743–746.

Puck, J.M. (2007). Neonatal screening for severe combined immune deficiency. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7, 522–527.

Puck, J.M., and SCID Newborn Screening Working Group (2007). Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120, 760–768.

Puck, J.M., Deschênes, S.M., Porter, J.C., Dutra, A.S., Brown, C.J., Willard, H.F., and Henthorn, P.S. (1993). The interleukin-2 receptor gamma chain maps to Xq13.1 and is mutated in X-linked severe combined immunodeficiency, SCIDX1. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1099–1104.

Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H., and Leonard, W.J. (1998). Defective IL7R expression in T (-) B (+) NK (+) severe combined immunodeficiency. *Nat. Genet.* 20, 394–397.

Roifman, C.M., Zhang, J., Chitayat, D., and Sharfe, N. (2000). A partial deficiency of interleukin-7R alpha is sufficient to abrogate T-cell development and cause severe combined immunodeficiency. *Blood* 96, 2803–2807.

Rosen, F.S., Gotoff, S.P., Craig, J.M., Ritchie, J., and Janeway, C.A. (1966). Further observations on the Swiss type of agammaglobulinemia (alymphocytosis). The effect of syngeneic bone-marrow cells. *N. Engl. J. Med.* 274, 18–21.

Roussey (2010). Le dépistage néonatal.

Routes, J.M. (2009). Statewide Newborn Screening for Severe T-Cell Lymphopenia. *JAMA* 302, 2465.

De Saint Basile, G., Arveiler, B., Oberlé, I., Malcolm, S., Levinsky, R.J., Lau, Y.L., Hofker, M., Debre, M., Fischer, A., and Griscelli, C. (1987). Close linkage of the locus for X chromosome-linked severe combined immunodeficiency to polymorphic DNA markers in Xq11-q13. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7576–7579.

Schwarz, K., Gauss, G.H., Ludwig, L., Pannicke, U., Li, Z., Lindner, D., Friedrich, W., Seger, R.A., Hansen-Hagge, T.E., Desiderio, S., et al. (1996). RAG mutations in human B cell-negative SCID. *Science* 274, 97–99.

Shearer, W.T., Rosenblatt, H.M., Gelman, R.S., Oyomopito, R., Plaeger, S., Stiehm, E.R., Wara, D.W., Douglas, S.D., Luzuriaga, K., McFarland, E.J., et al. (2003). Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: the Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112, 973–980.

Shearer, W.T., Dunn, E., Notarangelo, L.D., Dvorak, C.C., Puck, J.M., Logan, B.R., Griffith, L.M., Kohn, D.B., O'Reilly, R.J., Fleisher, T.A., et al. (2014). Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: The Primary Immune Deficiency Treatment Consortium experience. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133, 1092–1098.

Shovlin CL, et al (1994). Adult onset immunodeficiency caused by inherited adenosine deaminase deficiency. - PubMed - NCBI.

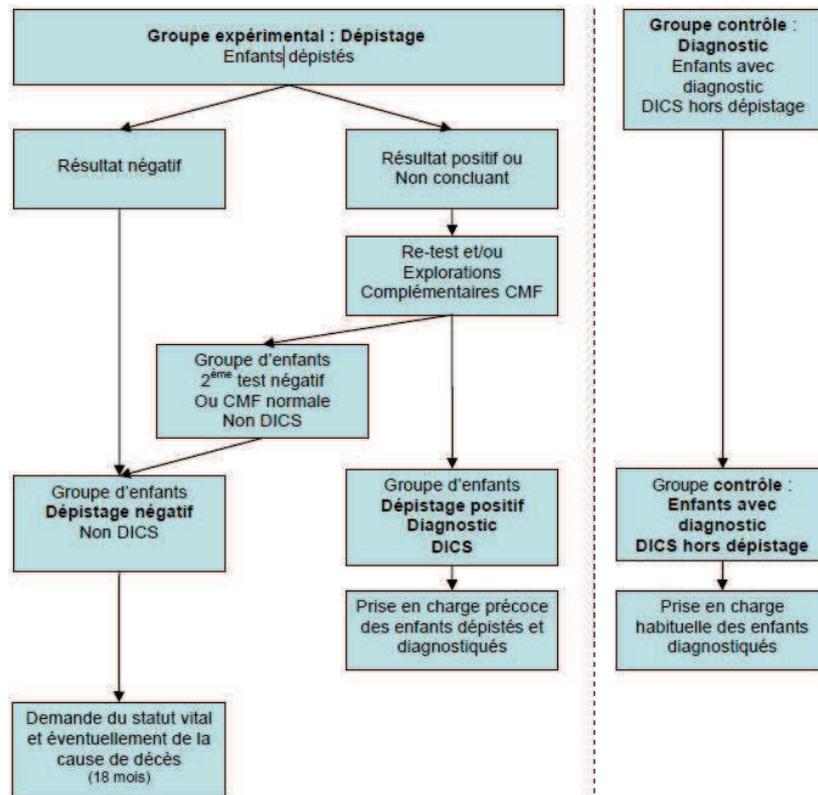
Van De Wiele, C.J., Vaughn, J.G., Blackburn, M.R., Ledent, C.A., Jacobson, M., Jiang, H., and Thompson, L.F. (2002). Adenosine kinase inhibition promotes survival of fetal adenosine deaminase-deficient thymocytes by blocking dATP accumulation. *J. Clin. Invest.* 110, 395–402.

Warrington, J.A., Shah, N.A., Chen, X., Janis, M., Liu, C., Kondapalli, S., Reyes, V., Savage, M.P., Zhang, Z., Watts, R., et al. (2002). New developments in high-throughput resequencing and variation detection using high density microarrays. *Hum. Mutat.* 19, 402–409.

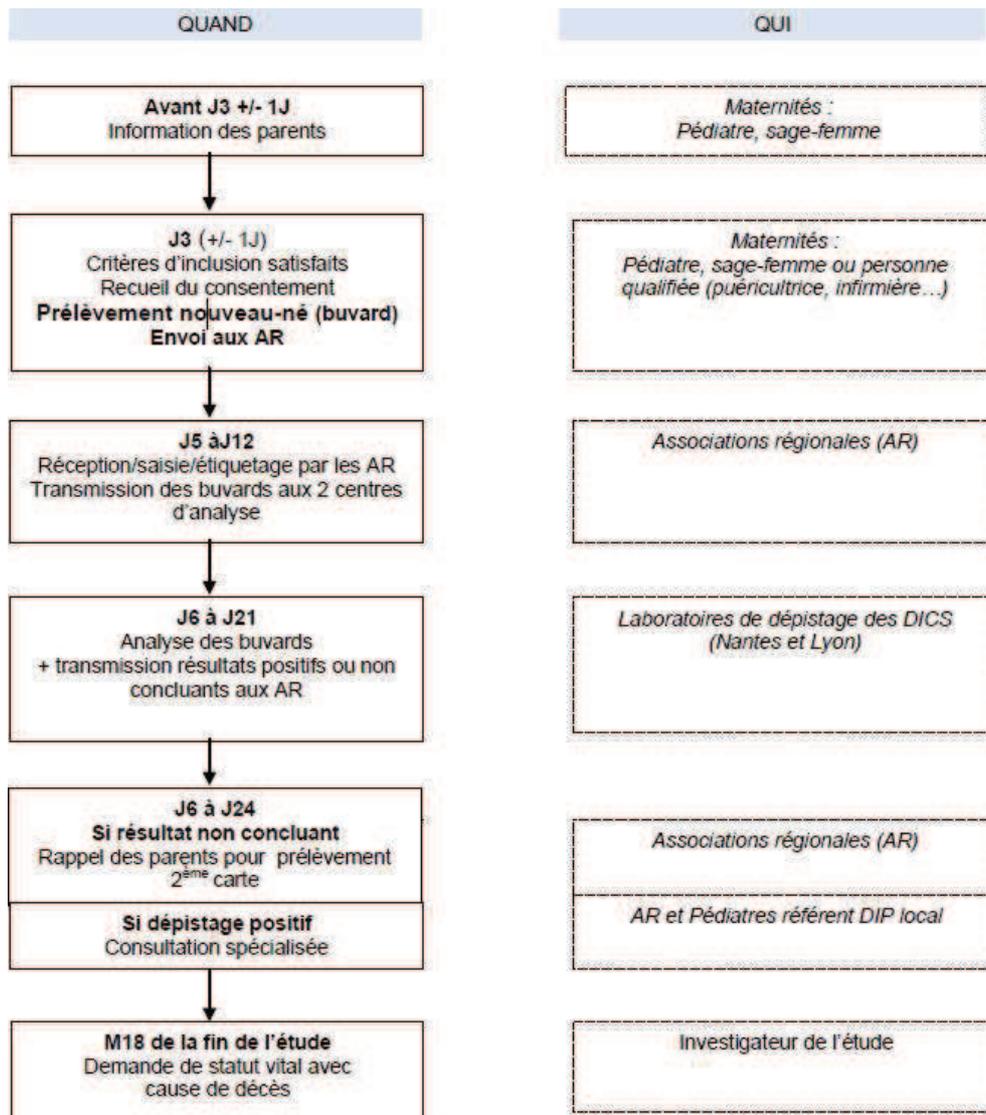
Wilson, J.M., and Jungner, Y.G. (1968). [Principles and practice of mass screening for disease]. *Bol. Oficina Sanit. Panam. Pan Am. Sanit. Bur.* 65, 281–393.

11 Annexes

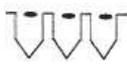
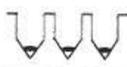
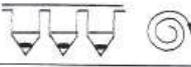
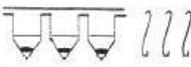
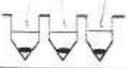
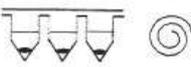
Annexe 1 : Schéma récapitulatif de définition des groupes de patients (protocole DEPISTREC)



Annexe 2 : Schéma récapitulatif du rendu des résultats (protocole DEPISTREC)



Annexe 3 : Résumé du protocole de dosage (EnLite™ neonatal TREC kit instructions).

Check DBS calibrator concentrations from QC certificate Thaw samples and reagents Create plate map Prepare elution buffer and reagent mixture Place unused reagents back to freezer		
Punch out DBS calibrators, DBS controls and samples		Punch out 1.5 mm filter paper disks of DBS calibrators, DBS controls, and samples into the PCR plate wells
Check visually that each well contains a disk according to the plate map		
Dispense elution buffer		10 µL/well
Seal and centrifuge		Plate centrifuge, 20 sec, 500 x g, +19–+25 °C
Start elution incubation		Thermal cycler, +98 °C 45 min, +4 °C 2 min
Unseal and dispense reagent mixture		20 µL/well
Seal and centrifuge		Plate centrifuge, 20 sec, 500 x g, +19–+25 °C
Start thermal incubation		Thermal cycler, ~2 h 40 min
Centrifuge		Plate centrifuge, 2 min, 500 x g, +19–+25 °C
Measure		Measure the plate within 60 min from the end of the thermal incubation (VICTOR EnLite instrument)
REMINDERS: Follow general practices for PCR work described in "PROCEDURAL NOTES" PCR plates should be labeled with appropriate barcodes A full calibration curve in triplicate must be run on each plate. Ensure proper sealing of the PCR plate Discard used PCR plates without opening them according to local regulations		

Annexe 4 : Les valeurs de référence en pourcentage des sous-populations lymphocytaires dans le sang périphérique chez des enfants en bonne santé (distribution en fonction de l'âge) (Shearer, 2003).

Subset	N	0-3 mo	3-6 mo	6-12 mo	1-2 y	2-6 y	6-12 y	12-18 y
3	709	73 (53-84)	66 (51-77)	65 (49-76)	65 (53-75)	66 (56-75)	69 (60-76)	73 (56-84)
19	709	15 (06-32)	25 (11-41)	24 (14-37)	25 (16-35)	21 (14-33)	18 (13-27)	14 (06-23)
16/56	784	8 (04-18)	6 (03-14)	7 (03-15)	7 (03-15)	9 (04-17)	9 (04-17)	9 (03-22)
4	709	52 (35-64)	46 (35-56)	46 (31-56)	41 (32-51)	38 (28-47)	37 (31-47)	41 (31-52)
8	709	18 (12-28)	16 (12-23)	17 (12-24)	20 (14-30)	23 (16-30)	25 (18-35)	26 (18-35)
4/45RA/62L	805	89 (61-94)	88 (64-92)	83 (58-91)	79 (62-90)	70 (50-85)	58 (42-74)	51 (31-65)
8/45RA/62L	807	79 (56-88)	77 (53-88)	72 (47-87)	71 (46-85)	64 (42-81)	58 (39-73)	56 (42-73)
4/45RA	805	90 (64-95)	90 (77-94)	86 (64-93)	81 (63-91)	71 (53-86)	59 (46-77)	53 (33-66)
8/45RA	807	93 (80-99)	94 (85-98)	91 (75-97)	89 (71-98)	86 (69-97)	80 (63-92)	79 (61-91)
4/DR/38	805	3 (01-06)	4 (02-09)	4 (01-09)	5 (02-09)	5 (02-09)	4 (01-08)	3 (02-06)
8/DR/38	807	5 (02-17)	7 (03-16)	8 (03-25)	15 (05-30)	13 (05-29)	9 (02-20)	7 (03-18)
4/DR	805	3 (02-06)	5 (02-10)	5 (02-11)	6 (02-11)	7 (03-12)	6 (03-13)	7 (04-11)
8/DR	807	5 (02-20)	7 (03-17)	10 (04-27)	16 (06-33)	16 (07-37)	12 (06-29)	12 (05-25)
4/38	805	98 (95-99)	96 (90-98)	95 (89-97)	93 (85-97)	87 (74-94)	79 (64-86)	69 (50-79)
8/38	807	97 (89-99)	95 (83-98)	93 (78-98)	91 (73-97)	82 (52-93)	70 (42-86)	64 (33-80)
4/28	806	99 (95-100)	99 (88-100)	98 (90-100)	98 (94-100)	98 (92-99)	98 (92-100)	97 (89-100)
8/28	806	76 (54-87)	75 (43-87)	70 (42-83)	69 (49-81)	63 (42-79)	60 (42-78)	58 (39-76)
4/95	806	11 (05-21)	14 (08-21)	18 (11-34)	23 (11-39)	31 (21-45)	39 (24-53)	49 (32-66)
8/95	806	12 (02-33)	15 (06-36)	22 (08-47)	31 (07-50)	34 (12-57)	36 (10-62)	44 (15-71)
3/4/45RO	676	10 (02-22)	8 (03-16)	9 (05-18)	12 (07-20)	16 (09-26)	21 (13-30)	28 (18-38)
3/4-/45RO	672	3 (01-09)	3 (01-07)	3 (01-08)	6 (02-12)	9 (04-16)	12 (04-21)	13 (04-23)
3/45RO	676	14 (03-31)	13 (04-24)	12 (06-25)	19 (09-31)	27 (15-41)	33 (20-46)	41 (24-57)
3-/19/38	686	49 (13-75)	66 (00-82)	66 (01-78)	60 (00-79)	55 (01-70)	39 (00-60)	19 (00-57)
3-/19	686	50 (14-76)	69 (00-84)	67 (01-80)	63 (00-80)	61 (02-76)	46 (00-67)	21 (00-60)

See legend to Table I. Values are the percentages of the cells expressing the indicated markers for the lymphocyte population defined by the anchor marker presented as medians (10th and 90th percentiles). For example, in the 3/4/45RO subset the value reflects the percentage of CD3⁺ T cells that are also positive for CD4 and CD45RO.

Annexe 5 : Les valeurs de référence en valeur absolue des sous-populations lymphocytaires dans le sang périphérique chez des enfants en bonne santé (distribution en fonction de l'âge) (Shearer, 2003).

Subset	N	0-3 mo	3-6 mo	6-12 mo	1-2 yr	2-6 yr	6-12 yr	12-18 yr
WBC	800	10.60 (7.20-18.00)	9.20 (6.70-14.00)	9.10 (6.40-13.00)	8.80 (6.40-12.00)	7.10 (5.20-11.00)	6.50 (4.40-9.50)	6.00 (4.40-8.10)
Lymphocytes	800	5.40 (3.40-7.60)	6.30 (3.90-9.00)	5.90 (3.40-9.00)	5.50 (3.60-8.90)	3.60 (2.30-5.40)	2.70 (1.90-3.70)	2.20 (1.40-3.30)
3	699	3.68 (2.50-5.50)	3.93 (2.50-5.60)	3.93 (1.90-5.90)	3.55 (2.10-6.20)	2.39 (1.40-3.70)	1.82 (1.20-2.60)	1.48 (1.00-2.20)
19	699	0.73 (0.30-2.00)	1.55 (0.43-3.00)	1.52 (0.61-2.60)	1.31 (0.72-2.60)	0.75 (0.39-1.40)	0.48 (0.27-0.86)	0.30 (0.11-0.57)
16/56	770	0.42 (0.17-1.10)	0.42 (0.17-0.83)	0.40 (0.16-0.95)	0.36 (0.18-0.92)	0.30 (0.13-0.72)	0.23 (0.10-0.48)	0.19 (0.07-0.48)
4	699	2.61 (1.60-4.00)	2.85 (1.80-4.00)	2.67 (1.40-4.30)	2.16 (1.30-3.40)	1.38 (0.70-2.20)	0.98 (0.65-1.50)	0.84 (0.53-1.30)
8	699	0.98 (0.56-1.70)	1.05 (0.59-1.60)	1.04 (0.50-1.70)	1.04 (0.62-2.00)	0.84 (0.49-1.30)	0.68 (0.37-1.10)	0.53 (0.33-0.92)
4/45RA/62L	694	2.25 (1.20-3.60)	2.23 (1.30-3.60)	2.10 (1.10-3.60)	1.64 (0.95-2.80)	0.96 (0.42-1.50)	0.56 (0.31-1.00)	0.39 (0.21-0.75)
8/45RA/62L	696	0.73 (0.38-1.30)	0.74 (0.45-1.20)	0.70 (0.33-1.20)	0.76 (0.40-1.40)	0.54 (0.26-0.85)	0.41 (0.20-0.65)	0.30 (0.17-0.56)
4/45RA	694	2.27 (1.20-3.70)	2.32 (1.30-3.70)	2.21 (1.10-3.70)	1.65 (1.00-2.90)	0.98 (0.43-1.50)	0.57 (0.32-1.00)	0.40 (0.23-0.77)
8/45RA	696	0.87 (0.45-1.50)	0.91 (0.55-1.40)	0.87 (0.48-1.50)	0.94 (0.49-1.70)	0.67 (0.38-1.10)	0.54 (0.31-0.90)	0.40 (0.24-0.71)
4/DR/38	694	0.08 (0.03-0.18)	0.11 (0.05-0.26)	0.10 (0.04-0.22)	0.10 (0.05-0.25)	0.06 (0.03-0.14)	0.04 (0.02-0.08)	0.03 (0.01-0.06)
8/DR/38	697	0.05 (0.02-0.16)	0.07 (0.03-0.17)	0.09 (0.04-0.27)	0.15 (0.05-0.54)	0.11 (0.05-0.34)	0.06 (0.03-0.18)	0.04 (0.02-0.13)
4/DR	694	0.10 (0.04-0.18)	0.15 (0.06-0.28)	0.12 (0.05-0.26)	0.13 (0.07-0.28)	0.09 (0.05-0.18)	0.07 (0.04-0.12)	0.06 (0.03-0.10)
8/DR	697	0.05 (0.02-0.16)	0.08 (0.03-0.17)	0.09 (0.04-0.29)	0.18 (0.06-0.60)	0.14 (0.07-0.42)	0.09 (0.04-0.27)	0.07 (0.03-0.18)
4/38	694	2.54 (0.16-3.90)	2.77 (1.60-4.00)	2.55 (1.20-4.10)	2.02 (1.20-3.30)	1.21 (0.59-2.00)	0.75 (0.48-1.20)	0.57 (0.33-1.00)
8/38	697	0.93 (0.55-1.60)	0.94 (0.53-1.50)	0.93 (0.45-1.60)	0.95 (0.57-1.90)	0.67 (0.39-1.10)	0.48 (0.24-0.74)	0.31 (0.16-0.70)
4/28	695	2.56 (1.60-3.80)	2.65 (1.60-4.00)	2.58 (1.20-4.20)	2.12 (1.30-3.40)	1.33 (0.69-2.00)	0.94 (0.63-1.50)	0.79 (0.49-1.20)
8/28	696	0.71 (0.35-1.30)	0.73 (0.35-1.20)	0.67 (0.28-1.10)	0.72 (0.40-1.30)	0.50 (0.28-0.87)	0.40 (0.21-0.70)	0.29 (0.16-0.52)
4/95	695	0.29 (0.16-0.58)	0.41 (0.23-0.62)	0.51 (0.29-0.82)	0.50 (0.27-0.91)	0.42 (0.27-0.65)	0.36 (0.25-0.62)	0.40 (0.25-0.66)
8/95	696	0.12 (0.05-0.31)	0.16 (0.06-0.39)	0.22 (0.08-0.66)	0.34 (0.10-0.85)	0.30 (0.11-0.58)	0.25 (0.08-0.53)	0.21 (0.08-0.45)
3/4/45RO	644	0.32 (0.06-0.90)	0.33 (0.12-0.63)	0.34 (0.16-0.80)	0.40 (0.21-0.85)	0.36 (0.22-0.66)	0.35 (0.23-0.63)	0.38 (0.24-0.70)
3/4/45RO	644	0.10 (0.03-0.33)	0.12 (0.03-0.29)	0.12 (0.04-0.33)	0.23 (0.06-0.57)	0.19 (0.09-0.44)	0.21 (0.07-0.39)	0.16 (0.06-0.31)
3/45RO	644	0.48 (0.09-1.20)	0.46 (0.15-0.86)	0.47 (0.22-1.10)	0.65 (0.30-1.30)	0.57 (0.33-1.00)	0.59 (0.32-0.95)	0.56 (0.34-0.97)
3-/19/38	655	0.60 (0.12-2.00)	1.20 (0.00-2.80)	1.29 (0.02-2.20)	1.04 (0.00-2.20)	0.56 (0.01-1.20)	0.28 (0.00-0.67)	0.03 (0.00-0.35)
3-/19	655	0.62 (0.12-2.10)	1.26 (0.00-2.80)	1.33 (0.02-2.30)	1.10 (0.00-2.30)	0.67 (0.02-1.40)	0.34 (0.00-0.74)	0.04 (0.00-0.39)

Values are presented as medians (10th and 90th percentiles). Subset counts (number of cells per microliter $\times 10^9$) were obtained by multiplying subset percentages times anchor marker percentages (ie, CD3CD4 or CD3CD8) of total CD45 lymphocyte population times the absolute lymphocyte count (WBC times lymphocyte percentage). Also, see legends to Tables I and II.

Annexe 6 : Poster montrant les résultats préliminaires de l'étude DEPISTREC, présenté à l'ESID (European Society for Immunodeficiencies) du 21 au 24 septembre 2016 à Barcelone.

DEPISTREC STUDY : PRELIMINARY RESULTS
C. Thomas², M. Fournier¹, S. Mirallie³, J. Durand-Zaleski⁴, V. Sebillé⁵, N. Mahlaoui⁷, A. Fischer⁷, M. Audrain¹
 Immunology Lab¹, Neonatal Screening Lab², Direction of clinical Research³, Biometry Platform⁴, Paediatric Immunology⁵, CHU Nantes, France.
 Email : caroline.thomas@chu-nantes.fr
 Immunology Lab¹, Paediatric Immunology², Neonatal Screening Lab³, CHU Nantes, URC-Eco⁴, APHP Paris, Biometry Platform⁵, CHU Nantes, CEREDIH (French National Reference Centre for Primary Immune Deficiencies) and Paediatric Haematology-Immunology and Rheumatology Unit, Necker, APHP, Paris Descartes, Fondation Imagine, Paris⁷

Introduction : Severe Combined Immunodeficiencies (SCID) represent a set of serious and asymptomatic diseases at birth. The SCID meet the general criteria for neonatal screening. The Routine screening allows early diagnosis of all affected infants, thus allowing for the establishment of an early curative treatment significantly improving survival rates of these children. TREC assay is used for this screening. **Objective :** To present the results of screening mid-study (102000 children), especially the clinical data of positive children.

Material and Methods : One group of 200 000 newborns will benefit from the screening for SCID, all over France for 2 years. The method used for quantification of TRECs on the Guthrie card is the Enlite™ TREC kit. The reports of the children who tested positive and received a consultation were analyzed, to determine and classify the etiologies of children affected by T-cell lymphopenia (<2500 CD3⁺/mm³).

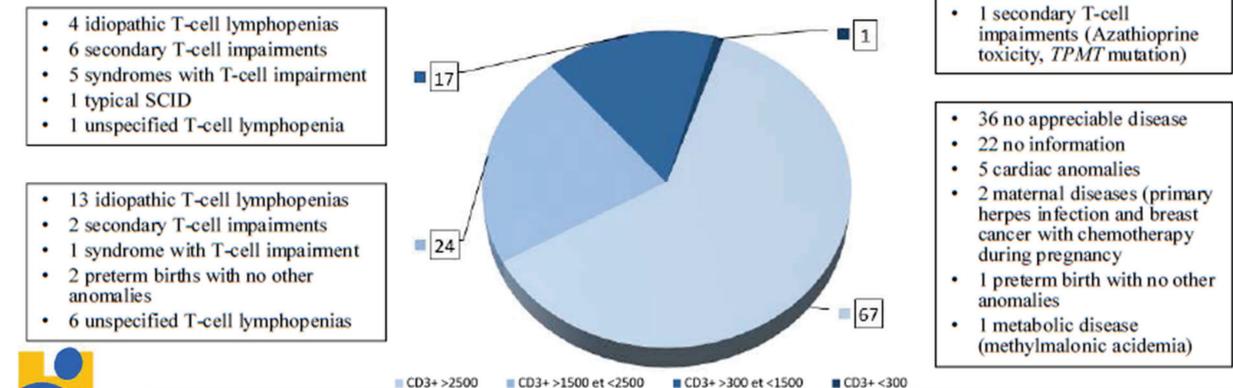
Results : In the period from January 2015 to March 2016, 102,000 children were screened. 129 children who tested positive in the screening had a specialized consultation and a study of lymphocyte subpopulations by flow cytometry. From the data received (about 85 %), 1 typical SCID and 41 T-cell lymphopenias were detected. The etiologies of non-SCID T-cell lymphopenias can be grouped into 4 main groups : syndromes with T-cell impairment (n=6), secondary T-cell impairments (n=9), idiopathic T-cell lymphopenias (n=17) and preterm births with no other anomalies (n=2).

Table 1 : Diagnoses of 42 infants with SCID and Non-SCID T-Cell Lymphopenia identified by Newborn Screening.

Diagnoses	TREC (>20 Copies/μL) ^a	CD3 ⁺ (2500-5500/μL) ^a
Typical SCID		
1. XSCID (n=1)	2,67	1153
Syndromes with T-cell impairment		
1. DiGeorge syndrome (n=3)	14,3-14,7-16 ^c	1206(959-1488) ^b
2. Trisomy 21 (n=2)	16,3-19,7	1179(627-1730)
3. Multiple bowel atresias syndrome (n=1)	18,7	693
Secondary T-cell impairments		
1. Gastrointestinal anomalies (n=2)	7,3-17,3	1478(645-2310)
2. Multiple congenital anomalies (n=1)	13	1243
3. Loss into third space (n=4)	1,7-9,7-10-11,3	802(444-990)
4. Pulmonary anomalies (n=1)	5,7	2339
5. Drug toxicity (n=1)	1,7	108
Preterm births alone^c (n=2)	0,7-1,3	1807(1505-2109)
Idiopathic T-cell lymphopenias (n=17)	18,8 ^f	1744(828-2365)
Unspecified T-cell lymphopenias^d (n=7)	18,6	2139(1349-2409)

^anormal ranges for T-cells and TREC shown in parentheses ^bmean numbers of T-cells (extreme values)
^ctwo very large prematurities ^dno information was not available for these infants
^emeans for each patient ^fthe mean of the group

Figure 1 : Distribution of various etiologies according to the absolute values of CD3⁺



Conclusion: The conditions which can lead to a positive screening are similar to those met in the literature^{1,2}. The TREC assay allows for the detection of children affected by SCID but also other cases of profound T-cell lymphopenias. In almost half the cases, an etiology explaining the T-cell lymphopenia is found. Among the non-SCID T-cell lymphopenias, the screening has been useful for 3 children : discovery of a DiGeorge syndrome without heart defect or other stigmata, discovery of a homozygous mutation of *TPMT* of a baby whose mother was treated by Imurel® and leading to a profound lymphopenia requiring prophylactic measures, and discovery of a heterozygous mutation of *ADA* of a child still very lymphopenic having had several infections during the winter period and requiring regular medical follow-ups.
 Ref : ¹Kwan, 2014 (JAMA) ; ²Ding, 2016 (The Journal of Pediatrics).
 This study is supported by a grant from the French Ministry of Health.
 N° IDRCB : 2014-A00224-43
 Clinical Trials : NCT02244450



Vu, le Président du jury,

Jean-Marie BARD

Vu, les Co-directeurs de thèse,

Marie AUDRAIN

Caroline THOMAS

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénoms : FOURNIER Maxime

Titre de la thèse :

Analyse des lymphopénies T sévères dans une cohorte de patients ayant eu un dépistage néonatal des déficits immunitaires combinés sévères.

Résumé de la thèse :

Les déficits immunitaires combinés sévères (DICS) représentent un ensemble de maladies très lourdes et asymptomatiques à la naissance. Ils remplissent les critères généraux pour le dépistage néonatal. Le dépistage généralisé permet un diagnostic rapide de tous les bébés malades, et donc la mise en place d'un traitement curatif précoce améliorant nettement la survie de ces enfants. La quantification des TRECs est utilisée pour ce dépistage.

Sur la période de janvier 2015 à mars 2016, 102000 enfants ont été dépistés. 129 enfants positifs au dépistage ont bénéficié d'une consultation spécialisée et d'une étude des sous-populations lymphocytaires par cytométrie en flux. Parmi les informations récupérées, 1 DICS typique et 41 lymphopénies T ont été détectés.

Les conditions pouvant mener à un dépistage positif sont similaires à celles rencontrées dans la littérature. L'analyse des TRECs permet de détecter les enfants atteints de DICS mais aussi d'autres cas de lymphopénies T profondes.

MOTS CLÉS : déficits combinés sévères – DICS – dépistage néonatal – TREC – lymphopénies T

JURY

PRÉSIDENT : Mr Jean-Marie BARD, PUPH - Université de Nantes

**ASSESEURS : Mme Marie-Christine BENE, PUPH - Université de Nantes
Mme Marie AUDRAIN, PH - CHU de Nantes
Mme Caroline THOMAS, PH – CHU de Nantes**

Adresse de l'auteur :

**Maxime FOURNIER
10 rue Rabelais
85150 LA MOTHE-ACHARD**