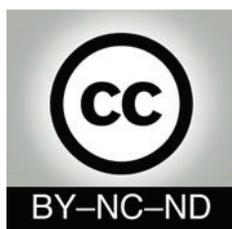




<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

THESE n°9

T H E S E

Pour le **DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le 13 février 2023 par

Mme. ZAKARYA Elissa

Née le 25/10/1995 à LATTAQUIE SYRIE

**ETAT DES LIEUX DU TEST DE PROLIFERATION
LYMPHOCYTAIRE T AU LABORATOIRE
D'IMMUNOLOGIE DE L'HOPITAL EDOUARD
HERRIOT ET AMELIORATION DES PRATIQUES**

JURY

Président du jury :	Mr. MONNERET Guillaume, PU-PH
Directrice de thèse et tutrice pédagogique :	Mme GOSSEZ-COULAUD Morgane, MCU-PH
Membres du jury :	Mme POITEVIN-LATER Françoise, PH
	Mme SENTIS Stéphanie, MCU

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

- Président
- Président du Conseil Académique
- Vice-Président du Conseil d'Administration
- Vice-Président de la Commission Recherche
- Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire

Frédéric FLEURY
Hamda BEN HADID
Didier REVEL
Petru MIRONESCU
Céline BROCHIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Claude DUSSART
UFR d'Odontologie	Directrice : Dominique SEUX
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : Xavier PERROT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

UFR Faculté des Sciences (Chimie, Mathématique, Physique)	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR Biosciences (Biologie, Biochimie)	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département composante Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département composante Génie Electrique et des procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département composante Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle. DANIEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon

LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET PHARMACIE
GALENIQUE**

- **CHIMIE GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (PR)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)

- **CHIMIE ANALYTIQUE**
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Waël ZEINYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Madame Stéphanie BRIANCON (PR)
Monsieur Fabrice PIROT (PU-PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Danielle CAMPIOL ARRUDA (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)
Madame Eloïse THOMAS (MCU)

- **BIOPHYSIQUE**
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (PR)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU-PH)
Madame Elise LEVIGOUREUX (MCU-PH)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**
Madame Valérie SIRANYAN (PR)
Madame Maud CINTRAT (MCU)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU-HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU-HDR)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU-HDR)

- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
Monsieur Xavier ARMOIRY (PU-PH)
Madame Claire GAILLARD (MCU)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
 Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU-HDR)
 Monsieur Vincent GROS (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
 Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH -HDR)
 Madame Pascale PREYNAT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
 Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
 Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU-HDR)

- **SANTE PUBLIQUE**
 Monsieur Claude DUSSART (PU-PH)
 Madame Chloë HERLEDAN (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
 Monsieur Pascal NEBOIS (PR)
 Madame Nadia WALCHSHOFER (PR)
 Madame Amanda GARRIDO (MCU)
 Madame Christelle MARMINON (MCU)
 Madame Sylvie RADIX (MCU-HDR)
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU-HDR)

- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
 Monsieur Marc LEBORGNE (PR)
 Monsieur Thierry LOMBERGET (PR)
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU-HDR)
 Monsieur François HALLE (MCU)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
 Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (PR)
 Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)
 Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**
 Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (PU-PH)
 Madame Catherine RIOUFOL (PU-PH)
 Madame Magali BOLON-LARGER (MCU-PH)
 Monsieur Teddy NOVAIS (MCU-PH)
 Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)
 Madame Florence RANCHON (MCU-PH)
 Madame Delphine HOEGY (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
 Monsieur Jérôme GUITTON (PU-PH)
 Madame Léa PAYEN (PU-PH)
 Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (PR)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU-HDR)
 - **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Sylvain GOUTELLE (PU-PH)
Monsieur Michel TOD (PU-PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU-PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
 - **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)
 - **ENSEIGNANTS CONTRACTUELS TEMPS PARTIEL**
Madame Aline INIGO PILLET (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Pauline LOUBERT (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
- Madame Ievgeniia CHICHEROVA (ATER)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (MCU-PH)
Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
Monsieur David GONCALVES (AHU)
- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU-PH)
Madame Sarah HUET (MCU-PH)
Monsieur Yohann JOURDY (MCU-PH)
Madame Amy DERICQUEBOURG (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH)
Madame Florence MORFIN (PU-PH)
Madame Veronica RODRIGUEZ-NAVA (PR)
Monsieur Didier BLAHA (MCU-HDR)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH-HDR)
Madame Emilie FROBERT (MCU-PH)
Monsieur Jérôme JOSSE (MCU)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU-HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (PR)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (PR)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU-PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU-PH-HDR)
Monsieur Anthony FOURIER (MCU-PH)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Alexandre JANIN (MCU-PH)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU-HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Jordan TEOLI (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU-HDR)

INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (PR)
Monsieur Philippe LAWTON (PR)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-enseignant contractuel temps partiel)
Madame Valérie VOIRON (MCU-enseignant contractuel temps partiel)

PR : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
MCU : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier
HDR : Habilitation à Diriger des Recherches
AHU : Assistant Hospitalier Universitaire
ATER : Attaché temporaire d'enseignement et de recherche

**Serment des Pharmaciens
Au moment d'être reçu
Docteur en Pharmacie,**

*En présence des Maîtres de la Faculté, je fais
le serment :*



- *D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession*
- *De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens*
- *De coopérer avec les autres professionnels de santé.*

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

*Date :
Signatures de l'étudiant et du Président du jury*

REMERCIEMENTS

Ce travail marque la fin de mes études, mais c'est aussi une étape symbolique, pleine d'espoir, de résilience et de souvenirs. J'ai beaucoup appréhendé ce moment et me suis demandé à plusieurs reprises si j'allais y arriver. Sans les personnes citées ci-dessous, rien de tout cela n'aurait été possible.

A la directrice de thèse

Madame Gossez, ma tutrice et ma professeure d'immunologie.

Merci Morgane, d'avoir été très patiente à mon égard avec beaucoup d'empathie et de compréhension. Merci de m'avoir donné la chance de faire une thèse sur mes deux sujets préférés, l'immunologie et les mathématiques. Merci pour tout ce que vous m'avez appris.

Sans vous, ce travail n'aurait pas abouti. Merci pour votre présence, pour votre disponibilité, pour les longues journées passées devant R pour décider du meilleur test statistique, pour toutes les annotations et les corrections, et surtout pour votre bienveillance.

Au président du jury,

Professeur Monneret, mon professeur d'immunologie.

Merci de m'avoir donné la chance de réaliser un travail sur un sujet qui me passionne. Merci de tout ce que vous m'avez appris. Merci d'avoir pris le temps d'évaluer cette thèse.

Au membre du jury,

Madame Poitevin-Later, Pharmacien Biologiste à l'hôpital Edouard Herriot, et ma maître de stage 5AHU.

Merci beaucoup d'avoir accepté de faire partie du jury. Grâce à vous, j'ai pu réaliser un stage très riche, au laboratoire et en service. J'ai été accompagnée avec beaucoup de bienveillance et d'empathie. Merci.

Au membre du jury,

Madame Sentis, Responsable pédagogique de la 3ème année.

Merci d'avoir été à mon écoute, d'avoir été là pour moi quand j'en avais le plus besoin. Cette aide si précieuse m'a permis de maintenir la continuité de ma scolarité, et d'avoir autant d'espoir pour la suite. Merci d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail.

A l'équipe du laboratoire d'immunologie HEH,

Merci d'avoir été tous très bienveillant.

Merci Cathy d'avoir été toujours présente, souriante et empathique.

A l'équipe pédagogique de l'ISPB, qui m'a transmis une quantité impressionnante d'informations depuis le début du cursus. Ces connaissances me servent tous les jours et m'aident à devenir un professionnel de santé compétent.

A Mme Chanut,

Merci de m'avoir aidé tout au long de ce parcours. Merci d'avoir pris de votre temps pour penser à moi. Merci de m'avoir toujours dit que tout irait mieux, et de m'avoir rappelé ce que j'ai pu réaliser malgré toutes les difficultés.

À l'équipe pédagogique de l'IPIL, merci.

M LAWTON, Professeur et responsable pédagogique du master Bioproduction et Contrôles Microbiologiques.

Merci de m'avoir donné la chance de faire partie de ce master. Cette année a sans doute été la meilleure année de tout mon parcours d'études.

Je tiens également à remercier les secrétaires de scolarité, Mme BELLOT, Mme DARAI, Mme GARDERE et Mme CHARLES, d'avoir été toujours à l'écoute et dans la bienveillance.

A mes maîtres de stage,

Mme SEON, ma première maître de stage. Merci de m'avoir présenté l'officine et qui a été très patiente, formatrice et empathique envers moi.

M COMBY, merci de m'avoir fait découvrir l'industrie pharmaceutique et qui m'a transmis les clés de la réussite en tant que manager avec beaucoup de grâce, de bienveillance et toujours avec le sourire.

Je suis chanceuse et très reconnaissante de vous avoir rencontré si tôt dans mon parcours.

A mes médecins,

Dr Faya, Pr Boschetti, Pr Cotte, Dr Tingry, Dr Massy, Mme UCLA, Mme Roggerone, Mme Dos Santos et toute l'équipe médicale sans qui je n'aurais jamais pu poursuivre ma scolarité.

Merci de m'avoir sauvé la vie, de m'avoir pris en charge du mieux que vous pouviez, de m'avoir écouté, accompagné et encouragé.

A l'amitié,

Irène, Sabine, Mireille, Aurélie, Romain, Pierre bis et Nico,

Merci pour votre accueil. Merci d'avoir été là pour traduire mes mots. Merci pour votre aide précieuse tout au long de mon parcours. Merci d'avoir donné de votre temps pour m'aider à m'intégrer dans un nouveau pays complètement inconnu.

Zina, ma première professeure de français,

Merci pour tout ce que tu m'as appris. C'est grâce à toi que j'ai pu progresser, comprendre et parler le français en quelques mois.

Mes amis de faculté, Cassandre, Elo, Eve, JB, Juliane, Léa, Wendy et Yasmine. Merci d'avoir été compréhensifs. Merci d'avoir fait partie de ce parcours de folie. Je suis très contente et chanceuse que nos chemins se soient croisés.

Chloé,

Merci d'avoir été à mes côtés durant toutes ces années. Merci de m'avoir toujours incluse, d'avoir récupéré mes ronéos pendant deux ans, de m'avoir filé des cours, des corrections. Merci d'être une vraie amie sans conditions. Je t'aime fort.

Mes amis syriens, Nina, Salam, Hala, Rory, Salah, Ebaa.

Durant toutes ces années, je ne vous ai pas oublié, et je ne vous oublierai jamais. Merci de m'avoir donné la force de continuer et merci d'avoir toujours été là même après des longues années sans se voir.

Alice, Alexia et Yaya, Merci de m'avoir intégré dans votre si belle famille. Merci pour le soutien. et surtout Merci pour tous les cadeaux de Noël !

Zavine, Merci d'avoir été l'amie parfaite pendant toutes ces années. Je t'aime très fort. Merci d'être toujours là pour moi, de m'aider à surmonter toutes les difficultés, et surtout de me donner de l'espoir et de la motivation, toujours.

Ma famille,

Maman, Papa, Ziad (Alex) et Noura, Merci de croire en moi, toujours, d'avoir été là pour moi pendant les moments les plus difficiles, les plus sombres. Je suis très heureuse, pleine de gratitude et de joie de pouvoir partager (ENFIN) un moment joyeux tant attendu avec vous. Vous m'avez soutenue et poussée pour faire de mon mieux. Vous m'avez relevée à chaque fois que j'étais à terre.

La réussite d'aujourd'hui est pour vous, et grâce à vous.

Mon chaton, Chewie,

Merci d'avoir rempli ma vie de beaucoup de poils mais aussi de beaucoup de joie et de rires. Merci de m'avoir accompagné pour la finale de cette course.

My Bobster, Mathias,

A toute la joie, le bonheur et l'amour que tu m'as apporté. A nos prochains voyages hors période de vacances scolaires. A nos prochaines soirées et week-end où je ne râlerai plus au sujet de la thèse.

Merci d'avoir été là avec tes rires drôles et ton sourire apaisant. Merci d'avoir été là pendant les moments difficiles. Merci d'être toujours gracieux, gentil et simplement parfait.

Nous avons traversé cette étape si difficile ensemble, maintenant, vivons cette nouvelle vie.

Table des matières

REMERCIEMENTS	11
Table des Figures	17
Tables des Tableaux	19
Liste des abréviations	21
1. INTRODUCTION	23
1.1. Rappels physiologiques sur le système immunitaire	23
1.2. Test de prolifération lymphocytaire	27
1.2.1. Définition	27
1.2.2. Indications	27
1.2.2.1. Diagnostic de déficits immunitaires	28
1.2.2.2. Suivi de la greffe de la moelle osseuse	29
1.2.2.3. Hypersensibilité de type IV	30
1.2.3. Principes du test de prolifération lymphocytaire	31
1.2.3.1. Rappels sur le cycle cellulaire	31
1.2.3.2. Mise en culture des lymphocytes	33
1.2.3.3. Révélation de la prolifération des lymphocytes T	37
1.2.3.3.1. La méthode de thymidine tritiée	37
1.2.3.3.2. Méthodes alternatives à la méthode radioactive	37
1.2.3.3.2.1. La méthode de l'EdU	38
1.2.3.3.2.2. La méthode du CFSE	39
1.2.3.3.3. Avantages et inconvénients des trois méthodes	41
2. OBJECTIF DE LA THÈSE	43
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
3.1. Etude de cohorte	45
3.2. Test de prolifération lymphocytaire	45
3.3. Poches des cellules mononuclées du sang périphérique congelées	48
3.4. Tests statistiques utilisés	48
4. RÉSULTATS	51
4.1. Description de la cohorte	51
4.2. Comparaison de la réponse lymphoproliférative en fonction des conditions de stimulation	54
4.2.1. Comparaison des différents mitogènes	54
4.2.1.1. Phytohémagglutinine et Concanavaleine A	54
4.2.1.2. Phytohémagglutinine et Pokeweed Mitogène	55

4.2.1.3.	Phytohémagglutinine et anticorps anti CD3 (OKT3)	56
4.2.1.4.	Comparaison des différentes concentrations d'OKT3	57
4.2.2.	Comparaison des différentes concentrations d'antigènes	58
4.2.2.1.	Tuberculine	58
4.2.2.2.	Anatoxine tétanique	59
4.2.2.3.	Candidine	60
4.3.	Evaluation de l'utilisation de PBMC congelés pour la mise en place d'un CIQ du TTL	61
4.3.1.	Viabilité et phénotypage des lymphocytes T	61
4.3.2.	Test de prolifération lymphoblastique	62
4.3.2.1.	Mitogènes : PHA, ConA, PWM et OKT 3	62
4.3.2.2.	Antigènes : Tuberculine, Candidine et Anatoxine tétanique	64
5.	SYNTHESE ET PERSPECTIVES	67
	Bibliographie	73

Table des Figures

Figure 1 : Les cellules l'immunité innée.....	24
Figure 2 : Différenciation des lymphocytes T.....	25
Figure 3 : L'évolution des lymphocytes suite à une infection	26
Figure 4 : Vue globale de la réponse immunitaire	27
Figure 5 : Stratégie diagnostique d'un déficit immunitaire héréditaire	29
Figure 6 : Les voies d'activation des lymphocytes T lors d'une réaction d'hypersensibilité retardée	31
Figure 7 : Les quatre phases du cycle cellulaire et la phase G0	32
Figure 8 : Les bases puriques et pyrimidiques	33
Figure 9 : La séparation après centrifugation par gradient de densité des composants sanguins	33
Figure 10 : Le calendrier vaccinal post greffe de moelle osseuse	35
Figure 11 : Mécanisme d'action des mitogènes/antigènes au niveau cellulaire.	37
Figure 12 : Principe de la cytométrie en flux	38
Figure 13 : La réaction Click entre l'azide et le groupement alkyle	39
Figure 14 : Exemple de résultat cytométrique de TTL par la méthode EdU.....	39
Figure 15 : La réaction de CFSE une fois rentrée dans la cellule	40
Figure 16 : Représentation des résultats de stimulation des LT par méthode CFSE	40
Figure 17 : Résultats d'un TTL	47
Figure 18 : Nombre de tests TTL réalisés par an	51
Figure 19 : Démographie des patients.....	52
Figure 20 : Evolution des indications du TTL.	53
Figure 21 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la PHA et la conA	54
Figure 22 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la PHA et la PWM. Résultats bruts des lymphocytes T EdU+	55
Figure 23 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la PHA et l'OKT3 50.....	56
Figure 24 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par l'OKT3 à des concentrations différentes	57
Figure 25 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la Tuberculine à des concentrations différentes	58
Figure 26 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par l'Anatoxine à des concentrations différentes	59
Figure 27 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la candidine à des concentrations différentes.....	60

Figure 28 : Impact de la congélation sur la viabilité des Lymphocytes dans les PBMC au cours du temps	61
Figure 29 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par la PHA et par la ConA	62
Figure 30 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par la PWM	63
Figure 31 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par l'OKT3 50	63
Figure 32 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par antigène	64

Tables des Tableaux

Tableau 1 : Les avantages et inconvénients des différentes méthodes de TTL.....	41
Tableau 2 : Niveaux de prolifération des lymphocytes T après stimulation	47

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF488 : Alexa-fluor 488

AT : Anatoxine tétanique

BCG : *Bacillus* Calmette-Guérin

CAND : Candidine

CEREDIH : Centre de référence des déficits immunitaires héréditaires

CFSE : Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

COFRAC : Comité français d'accréditation

ConA : Concanavaline A

CPA/APC : Cellules présentatrices d'Antigène

CIQ : Contrôle Interne de Qualité

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTP : Diphtérie Tétanos et Polio

EdU : 5-éthynyl-2'deoxyuridine

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EN : European Norme

FASCIA: flow-cytometrique assay for specific cell-mediated immune-response in activated whole blood

GVH : Greffon Versus Hôte

HEH : Hôpital Edouard Herriot

HS : Hypersensibilité

HLA : l'Antigène leucocytaire humain

ICC : Index de concordance

ISO : International Organization for Standardization

IUIS : International Union of Immunological Societies

NF : Norme Française

NFAT : facteur nucléaire des Lymphocytes T activés

NK: Natural Killer

OKT 3 : Anticorps monoclonal anti-CD3

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique
PPR: Récepteurs de reconnaissance des agents pathogènes
PWM : Mitogène Pokeweed
PHA : phytohémagglutinine
PMA : Phorbol myristate acétate
ROR : Rubéole, Oreillons, Rougeole
SARS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
Th1 : Lymphocyte T helper 1
Th2 : Lymphocyte T helper 2
Th17 : Lymphocyte T helper 17
TCR : T-Cell Récepteur
TTL : Test de transformation Lymphocytaire
TUB : Tuberculine

1. INTRODUCTION

1.1. Rappels physiologiques sur le système immunitaire

La fonction primordiale du système immunitaire est de lutter contre les pathogènes, en se basant sur trois propriétés : la veille permanente dans tout l'organisme, la reconnaissance et distinction des entités du soi et du non-soi, et l'activation rapide d'effecteurs qui permettront à terme de construire une mémoire immunitaire spécifique du pathogène en cause.

Deux types de réponses immunitaires existent. La première est l'immunité innée, qui met en jeu des barrières physiques (la peau et les muqueuses) et chimiques (le mucus, la salive, le suc gastrique, etc.), ainsi que la réponse inflammatoire (Figure 1). Ce type d'immunité est active rapidement en cas d'agression, notamment car elle n'est pas spécifique du pathogène.

Le pathogène est détecté par les cellules immunitaires innées et les épithéliums par l'intermédiaire des récepteurs PRR (Pathogen Recognition Receptors), conduisant à la synthèse de cytokines, des médiateurs inflammatoires, et le recrutement de cellules immunitaires effectrices. Ces dernières ont pour rôle de détruire le pathogène (Par exemple, la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles et la cytotoxicité par les cellules NK) mais également de présenter les antigènes issus du pathogène aux lymphocytes T (c'est-à-dire, monocytes-macrophages et cellules dendritiques). Cette étape permettra de débiter la seconde réponse immunitaire, dite « adaptative ». (1) (2)

L'immunité adaptative apparaît donc plus tardivement, car elle nécessite une activation des lymphocytes T par les cellules de l'immunité innée dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate). Elle engendre une réponse spécifique et durable. (3)

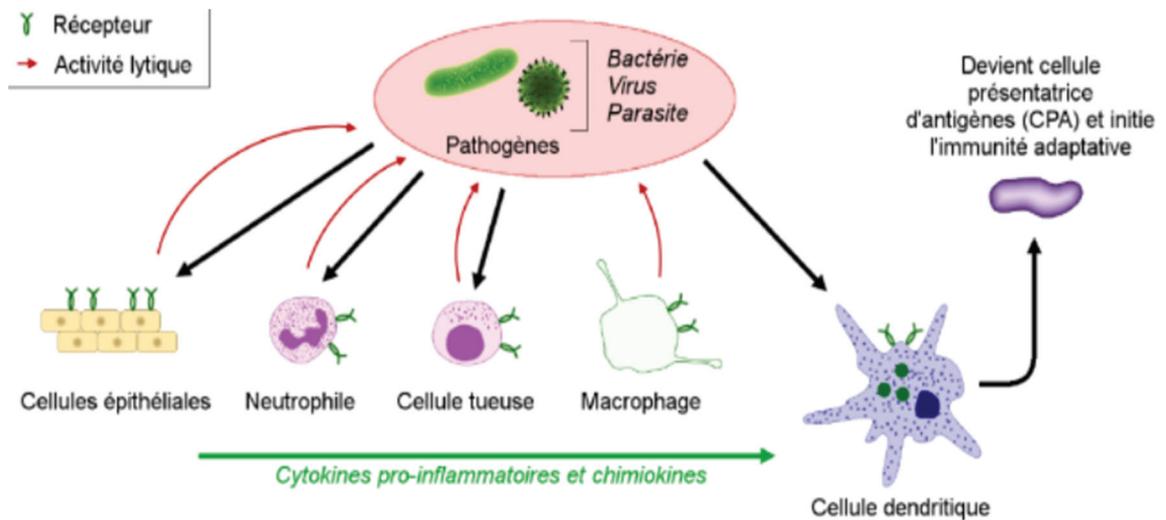
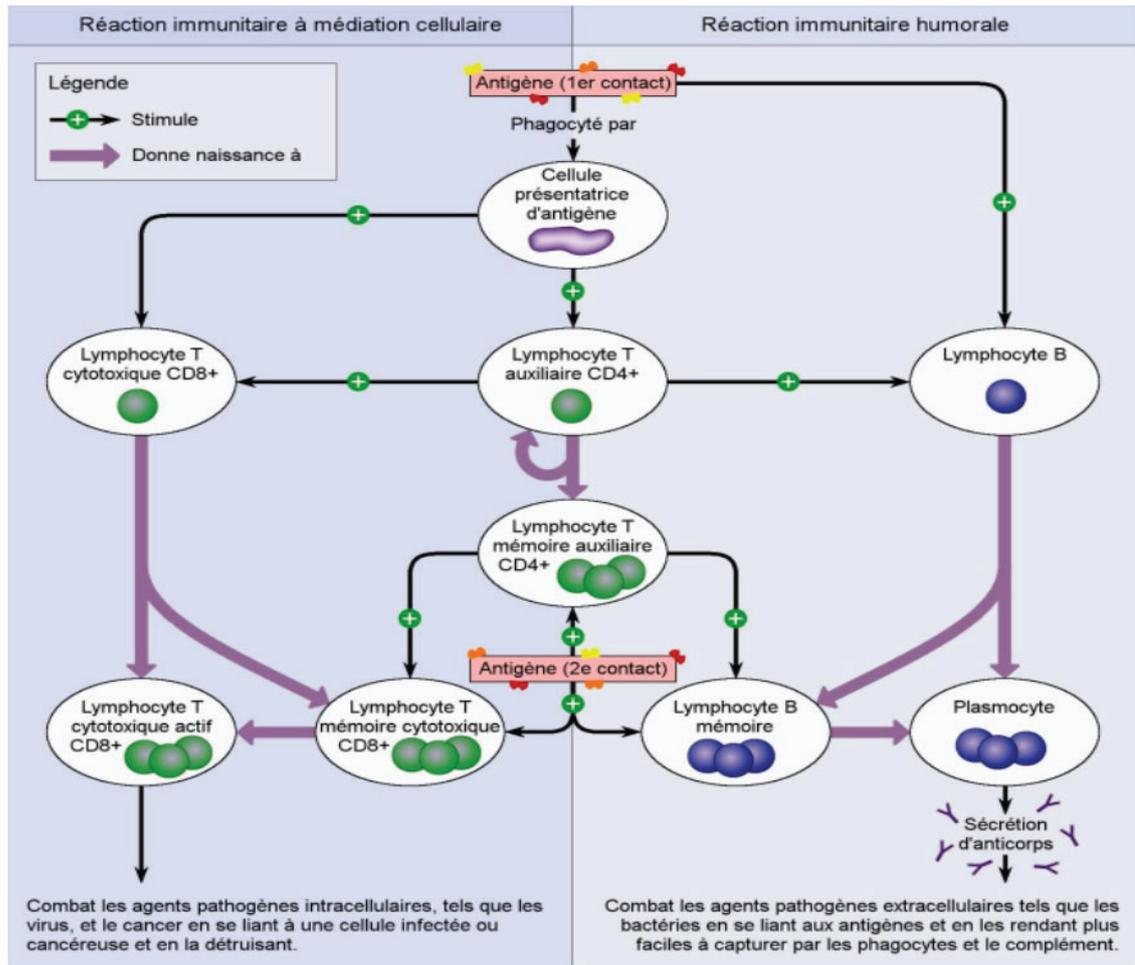


Figure 1 : Les cellules l'immunité innée (4)

Les effecteurs principaux de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T et B. Ils sont produits dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Les lymphocytes T poursuivent leur maturation dans le thymus, sous l'influence de différents facteurs de l'environnement thymique (thymosine, thymopoïétine, interleukine 7). Environ 10^8 lymphocytes T matures sont produits par jour. Cette maturation est conditionnée par les processus de sélection positive et négative permettant de tester la fonctionnalité des récepteurs spécifiques de l'antigène (TCR). Les TCR permettent la reconnaissance des peptides antigéniques présentés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigène thymiques. C'est notamment au cours de ces processus de sélection que les clones lymphocytaires T auto-réactifs sont éliminés et que les lymphocytes T se différencient en lymphocytes T $CD4^+$ ou $CD8^+$. (5)



Adapté de Jane B. REECE et autres, *Campbell Biology*.

Figure 2 : Différenciation des lymphocytes T (4)

Les lymphocytes T matures circulent ensuite entre les organes lymphoïdes secondaires afin de rencontrer l'antigène spécifique de leur TCR, présenté par les cellules dendritiques ou monocytes sur les molécules de CMH. (6)

Une fois activés, les lymphocytes T $CD4^+$ se différencient en cellules auxiliaires (Th1 ou Th2 par exemple), produisant des cytokines qui stimulent d'autres types de cellules immunitaires effectrices (macrophages, lymphocytes B produisant des anticorps), alors que les lymphocytes T $CD8^+$ deviennent cytotoxiques via la production de cytotoxines (perforine, granzyme) ou l'expression de récepteurs de mort cellulaire (cf. Figure 2). Finalement, des lymphocytes T mémoires apparaissent, et sont responsables de la réponse spécifique à long terme (cf. Figure 3).

La mémoire immunologique permet au système immunitaire de répondre de façon plus rapide et plus efficace aux pathogènes déjà rencontrés.

Les lymphocytes T mémoires sont majoritaires par rapport aux lymphocytes naïfs afin de construire une immunité protectrice. En effet, lorsqu'ils reconnaissent un pathogène déjà rencontré, ils déclenchent une réponse immunitaire en activant les mêmes acteurs que lors de la première rencontre, mais de façon beaucoup plus rapide, intense et efficace. (7)

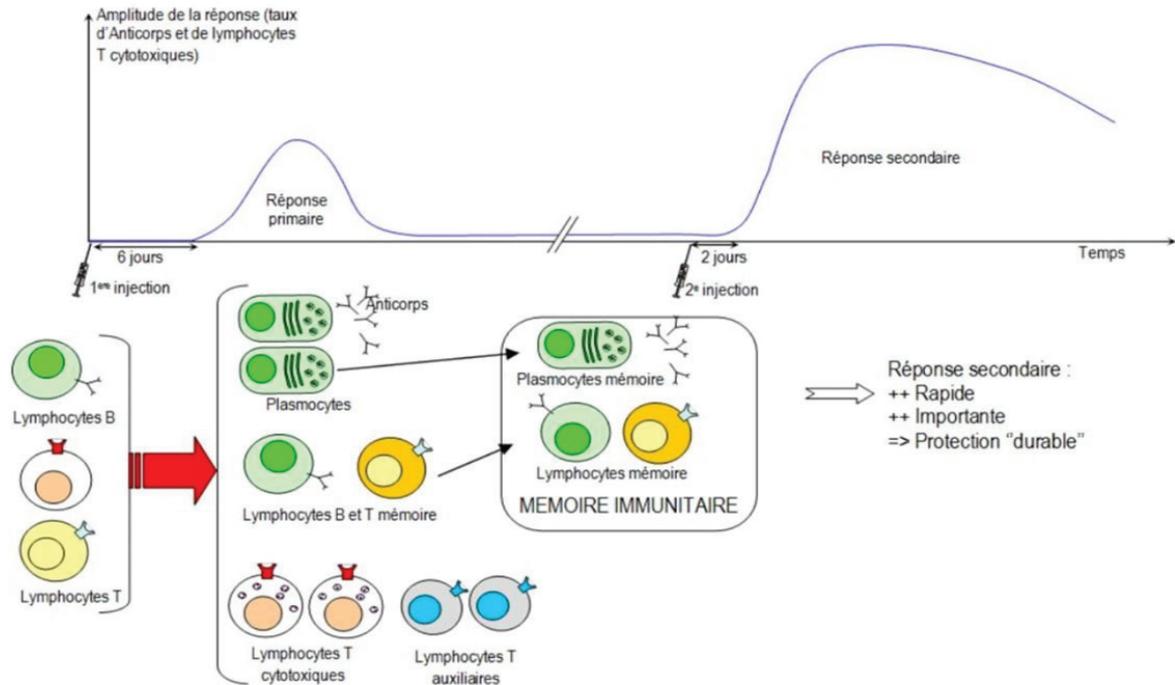


Figure 3 : L'évolution des lymphocytes suite à une infection (8)

Ces cellules mémoires résident dans les organes lymphoïdes secondaires, ainsi que dans le sang et peuvent éventuellement se déplacer et donner naissance aux cellules effectrices en cas d'infection dans les tissus entourant (notamment l'épiderme, les poumons et la muqueuse intestinale) via la sécrétion de plusieurs médiateurs. (cf. Figure 4). (9)

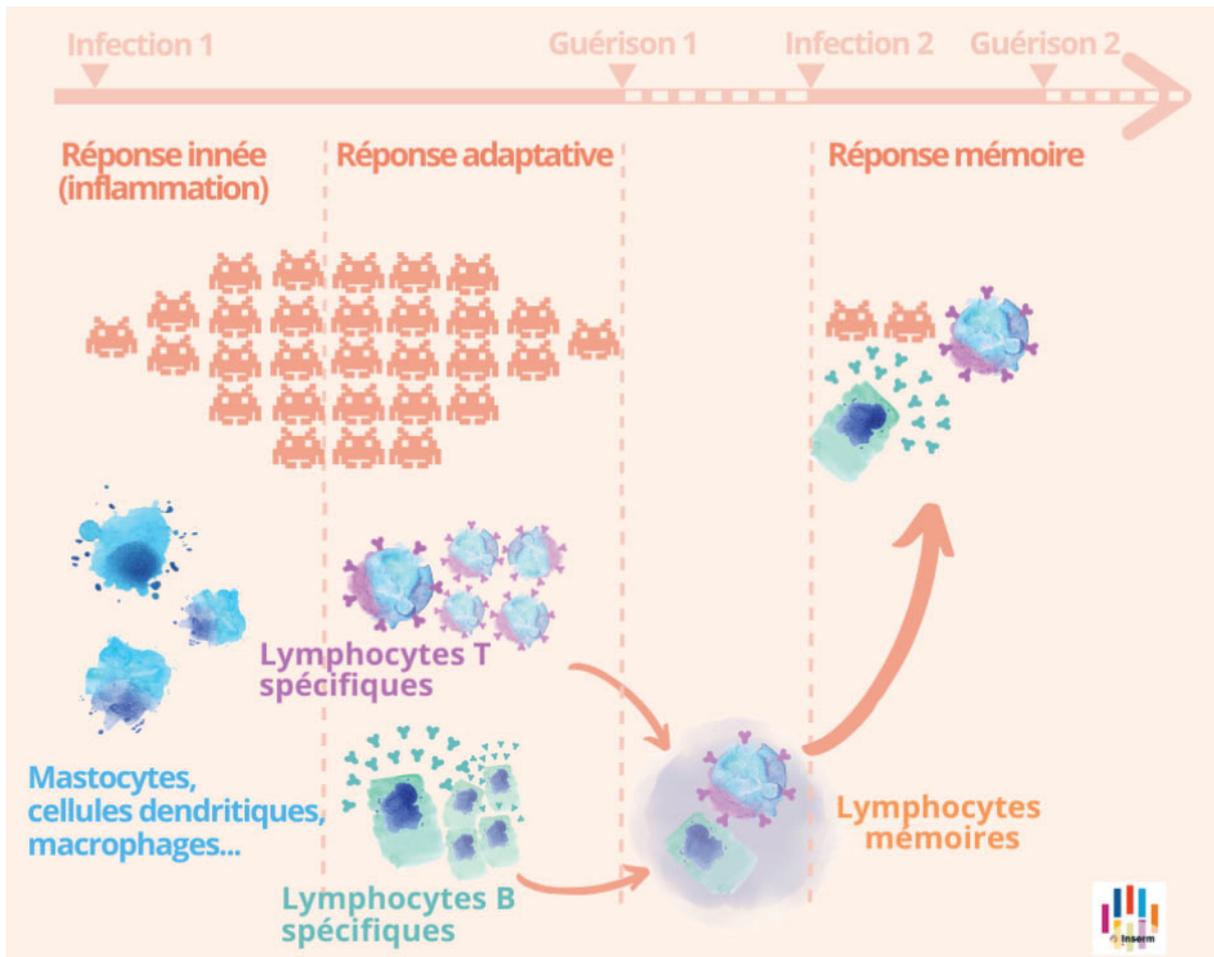


Figure 4 : Vue globale de la réponse immunitaire (10)

1.2. Test de prolifération lymphocytaire

1.2.1. Définition

Le test de prolifération lymphocytaire est un test biologique qui permet d'évaluer *in vitro* la capacité de réponse des lymphocytes T à une stimulation :

- ❖ Non spécifique (sans immunisation préalable) par des mitogènes induisant la division cellulaire (Phytohémagglutinine (PHA), anticorps monoclonal anti-CD3 (OKT3), Phorbol Myristate Acétate (PMA)) ;
- ❖ Spécifique, impliquant la réponse mémoire T vis-à-vis d'un antigène contre lequel le patient a été exposé au préalable par vaccination ou infection. (11)

1.2.2. Indications

Le test de prolifération lymphocytaire est utilisé pour évaluer la fonctionnalité des lymphocytes T dans certains contextes cliniques perturbant la physiologie de ces lymphocytes. (12) (13). Les trois indications principales sont décrites ci-dessous :

1.2.2.1. Diagnostic de déficits immunitaires

L'immunodéficience caractérise les défenses immunitaires affaiblies. Les maladies d'immunodéficience composent un groupe hétérogène de maladies du système immunitaire. (14)

L'immunodéficience dite « innée » ou « primaire » peut exister dès la naissance. Souvent d'origine génétique et parfois héréditaire, elle se traduit par un mauvais fonctionnement de la moelle osseuse ou des cellules de l'immunité. Les symptômes sont hétérogènes mais se composent généralement d'une sensibilité accrue aux infections (Par exemple : pneumonie, otites, sinusites, bronchites, diarrhées). Le type d'infection et les bactéries concernées peuvent orienter le diagnostic du déficit immunitaire primaire. D'autres manifestations peuvent alerter à un problème du système immunitaire (primaire) comme les allergies, l'inflammation exacerbée, la lymphoprolifération, des problèmes d'auto-immunité ainsi qu'un risque accru de développer des cancers. (15)

Le diagnostic biologique se base sur la numération des principales populations lymphocytaires dans le sang (c'est-à-dire, l'immunophénotypage des lymphocytes T, B et NK), et l'étude du fonctionnement des cellules immunitaires via différents marqueurs tels que le dosage des immunoglobulines, le dosage des sérologies post-vaccinales et le test de prolifération lymphocytaire T (cf. Figure 5). (16)

Parmi les différents types d'immunodéficience innée on cite : l'immunodéficience commune variable, l'agammaglobulinémie liée à l'X, l'immunodéficience combinée sévère, le syndrome de Wiskott-Aldrich, le syndrome de DiGeorge, le déficit en IgA, etc.

Les traitements peuvent être des antibiotiques pour combattre les infections, l'administration d'immunoglobulines polyvalentes pour pallier les déficits humoraux ou, dans les cas les plus graves, une greffe de la moelle osseuse. C'est le seul traitement curatif de certains déficits immunitaires. Le nombre de diagnostics de l'immunodéficience primaire ne cesse d'augmenter selon la classification du comité des Erreurs d'immunité innée IUIS. (14)

Évoquer et diagnostiquer un déficit immunitaire héréditaire - C. Picard ^{a,*}, I. Pellier ^b

^a Centre d'étude des déficits immunitaires, hôpital Necker - Enfants-Malades, 149 rue de Sévres, 75015 Paris, France ^b Service d'immuno-onco-hématologie pédiatrique, CHU d'Angers, 4, rue Larrey, 49000 Angers, France

Mots clés : Déficit immunitaires héréditaires, explorations, infections

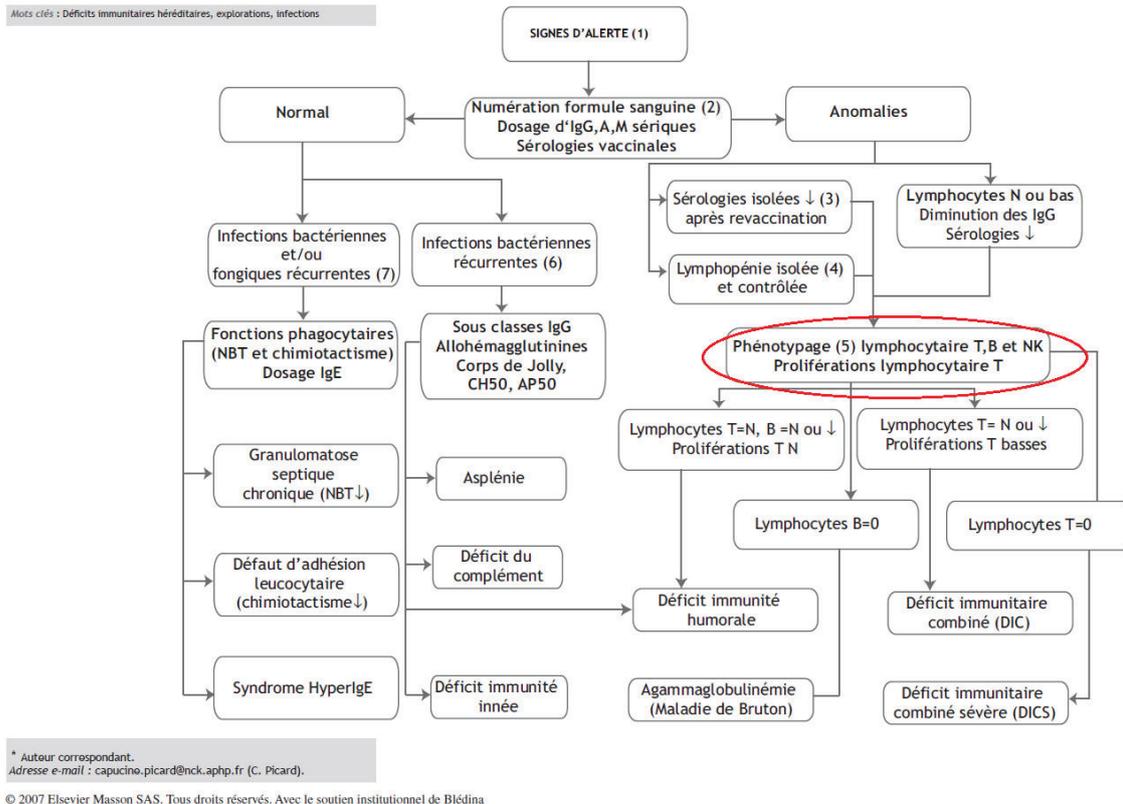


Figure 5 : Stratégie diagnostique d'un déficit immunitaire héréditaire (17)

L'immunodéficience dite « acquise » ou « secondaire » se développe généralement plus tardivement au cours de la vie et peut être causée par certains traitements (chimiothérapies ou immunosuppresseurs), maladies (infections virales ou bactériennes) et traumatismes graves (brûlures). Ainsi, le test de prolifération lymphocytaire n'est pas utilisé dans le diagnostic de ces déficits immunitaires secondaires, mais dans des explorations biologiques et cliniques spécifiques permettront d'en déterminer la cause. Les symptômes sont variés : Fièvre, infections auriculaires et des sinus, diarrhées, ainsi que de l'inflammation dans certains organes. (18)

Le traitement de ce type d'immunodéficience dépend de la cause et varie selon le niveau d'immunité impacté. (19) (20)

1.2.2.2. Suivi de la greffe de la moelle osseuse

L'allogreffe des cellules souches est un des traitements les plus utilisés en cas de néoplasies hématologiques. Les patients sont à haut risque infectieux du fait de l'immaturité du « nouveau » système immunitaire et de la toxicité des chimiothérapies notamment.

Dans ce contexte, la société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire, recommande de débiter une vaccination entre 3 et 6 mois post-greffe sauf en cas de GVH aiguë. La vaccination anti-DTP (Diphtérie, Tétanos, Polio) et *Haemophilus influenzae* sont réalisés systématiquement. Le vaccin anti-ROR (Rougeole, Oreillons, Rubéole) est essentiellement réalisé pour les greffes pédiatriques. Les vaccinations contre l'hépatite B, le méningocoque B, le pneumocoque et la coqueluche sont également réalisées depuis l'extension de la loi du 30 décembre 2017. (21)

En pratique, chez les enfants ayant reçu une greffe de moelle osseuse, l'étude de la reconstitution immunitaire après l'allogreffe est réalisée pour guider la vaccination mais aussi pour vérifier la fonctionnalité du nouveau système immunitaire. Au niveau de l'immunité cellulaire, le phénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux permet d'évaluer la proportion et la quantité des différentes sous populations lymphocytaires circulantes dans le sang. La reconstitution des lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK, varie selon le type de greffe, l'âge du receveur, et la présence de GVH. D'autre part, la réalisation du test de prolifération lymphocytaire T permet de compléter la numération lymphocytaire en évaluant la fonctionnalité des lymphocytes T produits depuis la greffe.(22) (23)

1.2.2.3. Hypersensibilité de type IV

Les hypersensibilités (HS) de type IV sont aussi appelées « retardées » car elles surviennent plusieurs heures après l'introduction de l'allergène. Parmi ces HS, on peut citer les réactions aux médicaments, aux métaux lourds (nickel).

La physiopathologie des HS de type IV implique l'immunité à médiation cellulaire. Selon le type de l'allergène, plusieurs voies de stimulation des cellules immunitaires sont possibles (cf. Figure 5). Deux phases constituent ces réactions d'HS. La première appelée « sensibilisation » consiste en la présentation, pour la première fois, de l'allergène aux cellules de l'immunité adaptative, qui vont se transformer en lymphocytes T mémoires (cf. Figure 6). La deuxième rencontre est constituée de deux phases : la phase amplificatrice, où les lymphocytes T mémoires spécifiques de l'antigène produisent des cytokines permettant d'activer des lymphocytes T mémoires ainsi que des lymphocytes T effecteurs. La deuxième étape est la phase effectrice qui permet le recrutement de plusieurs cellules immunitaires (polynucléaires, macrophages et lymphocytes B) à la suite du relargage des différentes cytokines résultantes de la réaction inflammatoire. (24)

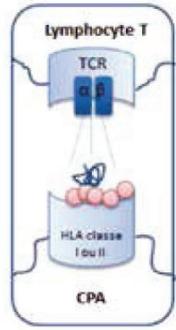
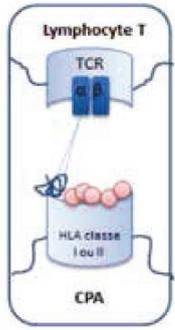
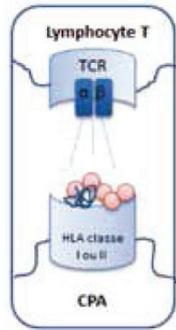
	Modèle haptène/prohaptène	Concept p-i Interaction pharmacologique	Modèle de répertoire du soi modifié
Mécanisme	Liaison covalente à un peptide du soi = néo-antigène	Liaison non covalente directement au HLA ou au TCR. Cette réaction peut survenir lors de la première exposition	Liaison non covalente au sein du sillon de liaison au peptide
Schéma			
Exemples	β-lactamines (liaison à l'albumine), AINS, sels de platine, anticorps monoclonaux, myorelaxants, métaux	β-lactamines, quinolones, AINS, produits de contraste, carbamazépine, allopurinol, abacavir	

Figure 6 : Les voies d'activation des lymphocytes T lors d'une réaction d'hypersensibilité retardée (24)

Le diagnostic de l'agent causal repose sur plusieurs techniques :

- ❖ Des tests *in vivo* comme les tests cutanés à lecture retardée (48 à 72h après l'introduction de l'antigène en question) ;
- ❖ Des tests de provocation qui consistent en l'introduction de l'allergène en contact directe avec la peau (par exemple, pour le diagnostic de l'eczéma de contact, nous disposons l'élément allergène directement sur la peau) ;
- ❖ Des tests *in vitro* pour apprécier la production des cytokines. (25)

Faisant partie des tests *in vitro*, le test de prolifération lymphoblastique peut être utilisé pour étudier la réponse cellulaire des lymphocytes T mémoires sensibilisés à l'agent en cause. (24)

1.2.3. Principes du test de prolifération lymphocytaire

1.2.3.1. Rappels sur le cycle cellulaire

La mesure de la prolifération des lymphocytes T est basée sur des mécanismes mis en jeu lors de la division cellulaire.

Avant d'entrer dans le cycle cellulaire, les cellules sont en phase G₀, c'est-à-dire quiescentes et ne prolifèrent pas. Les cellules quittent la phase G₀ en présence d'une stimulation mitogène. Le cycle cellulaire est ensuite divisé en deux phases : l'interphase et la mitose. L'interphase comprend la phase G₁, pendant laquelle les cellules se développent en gardant leur activité métabolique prête à initier la mitose, la phase S, pendant laquelle les cellules synthétisent l'ADN pour doubler leur génome, et la phase G₂ qui est une phase de préparation des cellules avant la mitose. La phase de mitose (M) est constituée de 4 étapes : prophase,

métaphase, anaphase et télophase. La chromatine se condense puis le nucléole perd son enveloppe pour permettre au fuseau mitotique de se développer. L'ADN se sépare en chromatides qui migrent de chaque côté du fuseau. Ensuite, deux nucléoles se forment contenant les chromatides sœurs qui vont se condenser par la suite et la cellule se divise en deux. (13) (26)

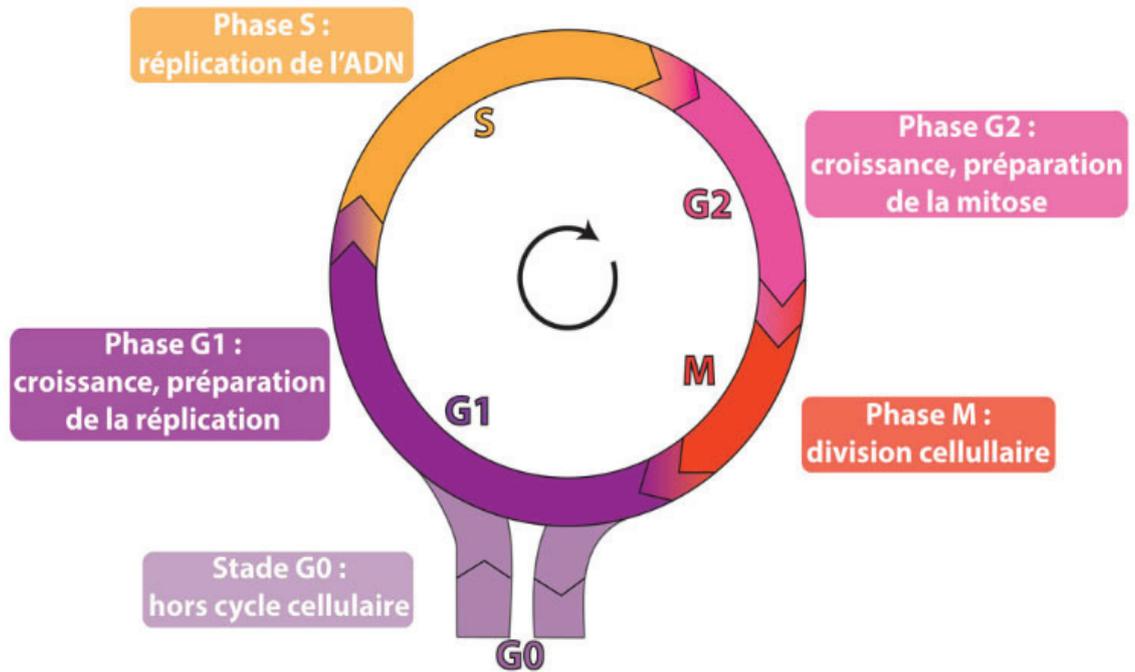


Figure 7 : Les quatre phases du cycle cellulaire et la phase G0 (26)

Pendant la phase S, l'ADN est synthétisé. Il s'agit d'une molécule de double hélice, composée de deux brins de bases nucléiques composées de sucre et de phosphate. Le sucre de l'ADN est le désoxyribose. Il existe quatre bases nucléiques : l'adénine et la guanine (bases puriques), complémentaires respectivement de la thymidine et la cytosine (bases pyrimidiques). La thymidine est spécifique de l'ADN, puisque dans l'ARN elle est remplacée par l'uracile (cf. Figure 8). (27)

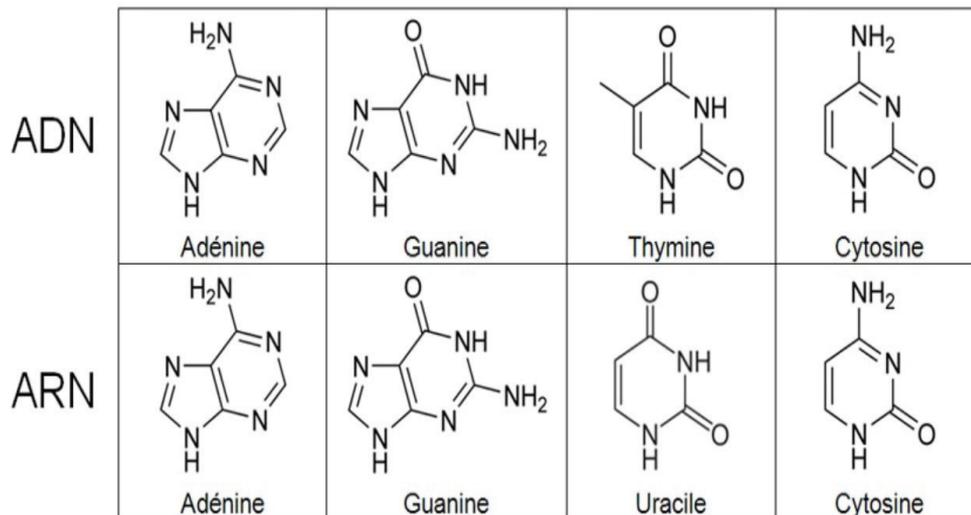


Figure 8 : Les bases puriques et pyrimidiques (28)

1.2.3.2. Mise en culture des lymphocytes

Les différentes méthodes décrites pour le test de prolifération lymphocytaire T partagent le même protocole de culture cellulaire mais se différencient par le marquage et la lecture des résultats.

Les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont isolées du sang selon un gradient de densité (1,077 g/ml) qui sépare le sang en deux fractions : les PBMC de faible densité en haut et le reste des cellules du sang (érythrocytes, polynucléaires) de haute densité en bas (cf. Figure 9). (29)

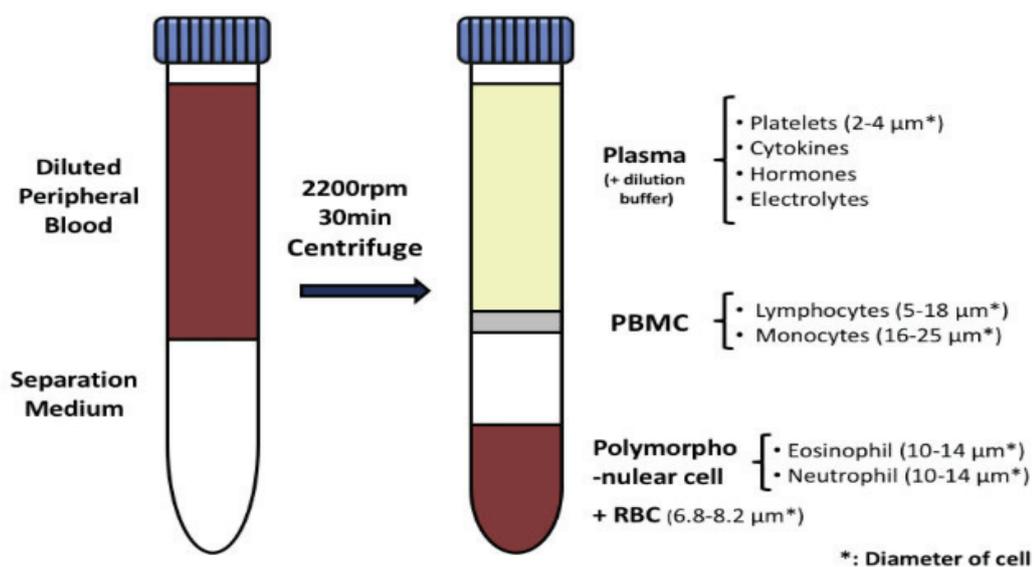


Figure 9 : La séparation après centrifugation par gradient de densité des composants sanguins

(30)

Les PBMC sont ensuite mises en culture de 72h à 7 jours dans différentes conditions de stimulation. On peut utiliser des **agents mitogènes** stimulant l'ensemble des cellules de façon non spécifique. Plusieurs mitogènes sont classiquement utilisés : des lectines, le pokeweed mitogène, les anticorps anti-CD3 et la Phorbol Myristate Acétate (PMA). Ceux utilisés au laboratoire d'immunologie d'HEH sont :

- ❖ Les lectines (phytohémagglutinine et Concanavaline A) sont des carbohydrates liés aux protéines qui peuvent stimuler la prolifération cellulaire. Elles sont capables d'activer les cellules immunitaires en se liant aux peptides des TCR qui miment la reconnaissance des ligands de surface CPA. La liaison provoque la phosphorylation des domaines tyrosines kinases et active la cascade de signal qui par la suite active la voie des MAP kinases qui active le facteur nucléaire des Lymphocytes T actives (NFAT). Ce dernier est responsable de l'activation des gènes de l'interleukine 2 indispensable à la prolifération des cellules ; (31)
- ❖ La Phytohémagglutinine est un mitogène extrait de *Phaseolus vulgaris* (haricots rouges). C'était le premier mitogène polyclonal découvert dans le but de stimuler et activer les lymphocytes. Il s'agit d'un mix de glycoprotéines tétramériques. La réponse induite par la phytohémagglutinine est dépendante de la présence des cellules présentatrices d'antigène. La PHA se lie aux glycoprotéines sur la surface des lymphocytes T, ce qui déclenche l'activation cellulaire. Elle se lie également au complexe CD3, ce qui permet le cross-link et l'activation des lymphocytes. Il s'agit d'un déclencheur qui stimule les cellules et favorise leur croissance à long terme. (32)
- ❖ Le pokeweed est un extrait de la plante *Phytolacca americana*. Il est démontré que le pokeweed mitogène provoque la production des immunoglobulines et stimule les lymphocytes T et B ; (33)
- ❖ Les anticorps anti-CD3 : le récepteur CD3 a été identifié d'abord en 1979 comme un des premiers groupes de récepteurs de surface des lymphocytes T humains. C'est un hétérodimère formé des chaînes epsilon/béta ou epsilon/gamma. Il est lié de façon covalente aux hétérodimères du TCR des lymphocytes T. Les anticorps monoclonaux anti-CD3 sont capables de reconnaître la chaîne epsilon et donc activer les lymphocytes quiescents sans la présence des cellules présentatrices d'antigène (CPA). (34)

On peut également tester la fonctionnalité des lymphocytes en réponse à des **antigènes**, permettant d'évaluer la réponse immunitaire spécifique. De nombreux antigènes peuvent être utilisés, ceux testés au laboratoire d'immunologie d'HEH sont la tuberculine, l'anatoxine tétanique et la candidine. La tuberculine et le tétanos font partie des vaccins fortement recommandés et systématiquement conseillés en post allogreffe de moelle osseuse. (23)

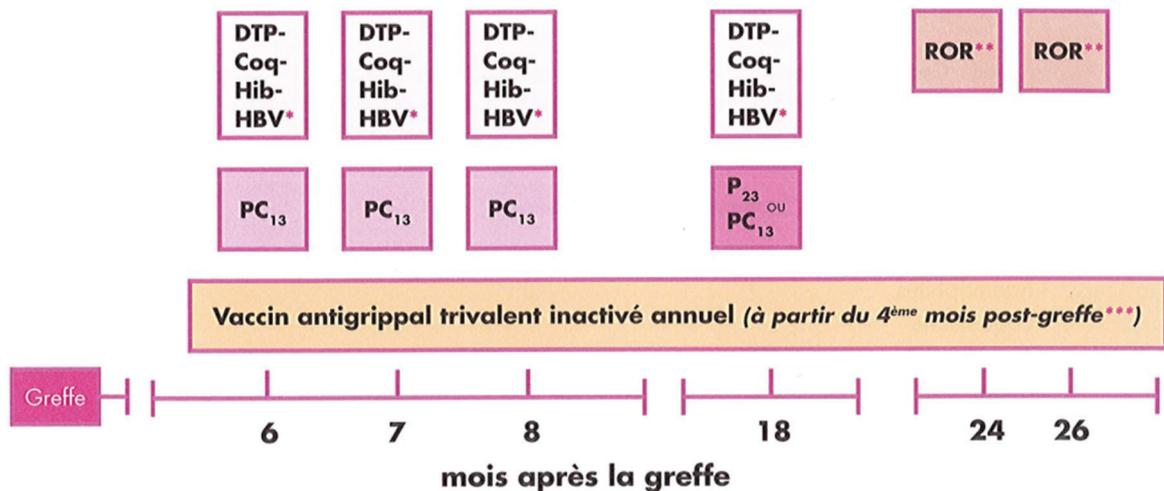


Figure 10 : Le calendrier vaccinal post greffe de moelle osseuse (35)

- ❖ La candidine : La candidine est un antigène d'une levure commensale *Candida albicans*. Elle provoque une réponse immunitaire en se liant aux récepteurs de lectines présentes sur les cellules immunitaires. Ces récepteurs ne sont pas spécifiques. En revanche, une réponse rapide est déclenchée par la suite et une prolifération des lymphocytes est observée, comme dans une réponse adaptative. (36)

La réponse immunitaire des lymphocytes T à *Candida albicans* est plus marquée que pour les restes des levures commensales. Normalement, les levures induisent une réponse immunitaire innée par suite à la rencontre avec les cellules du système immunitaire (cellules dendritiques). Or, la réponse à la candidine est une réponse adaptative incluant la mémoire T et les lymphocytes mémoires, produisant notamment la réponse Th17. Ces cellules résident dans les tissus concernés, surtout dans la muqueuse intestinale où la levure *Candida albicans* est le plus présente. Les patients ayant un déficit génétique du Th17 souffrent donc des mycoses à *Candida albicans*. La réponse Th17 n'est pas pathogène, mais aide à la régulation de la réponse immunitaire. La colonisation exacerbée par *Candida albicans* peut suggérer un défaut de

reconstitution du système immunitaire chez les patients ayant une greffe de moelle osseuse et est corrélée au GVH et des candidoses invasives. (37)

- ❖ La tuberculine : Il s'agit d'un antigène issu d'une mycobactérie intracellulaire persistante (*Mycobacterium tuberculosis*). La vaccination permet une prévention partielle de la maladie puisque le mécanisme immunitaire reste flou. L'immunisation contre la bactérie engendre la multiplication des cellules T mémoires (CD4⁺).

A l'heure actuelle, le vaccin utilisé est un vaccin vivant atténué : BCG (*M. bovis bacillus Calmette-Guérin*). Dans le cadre du test de prolifération lymphocytaire, cet antigène est utilisé à la suite de la vaccination et le rappel des patients ayant subi une greffe de la moelle osseuse. (38) Le vaccin étant vivant atténué, il n'est fait que deux ans après l'acquisition du nouveau système immunitaire ;

- ❖ L'anatoxine : L'anatoxine tétanique ou diphtérique est systématiquement utilisée avec les vaccins. Elle est adsorbée sur des sels d'aluminium afin d'augmenter la réponse immunitaire. Elle est généralement obtenue par l'inactivation de la toxine en utilisant le formol. (39) L'intérêt de son utilisation dans le test de prolifération lymphoblastique est de savoir si le système immunitaire est correctement fonctionnel à la suite de la vaccination. La vaccination contre le tétanos, la diphtérie et la coqueluche est devenue obligatoire en France depuis janvier 2018. De ce fait, les patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse sont systématiquement vaccinés à partir du troisième mois post greffe dans l'absence des complications. L'utilisation de cet antigène dans le contexte du test de prolifération lymphocytaire permet de s'assurer que les patients vaccinés ont développé la réponse immunitaire adéquate ;

La cytométrie en flux est une technique mesurant le nombre de cellules sanguines et leurs caractéristiques en termes de taille, granularité et protéines exprimées (c'est-à-dire le phénotype). Cette méthode est à la fois qualitative et quantitative. Les cellules sont incubées soit avec des colorants fluorescents qui pénètrent passivement dans le cytoplasme, ou avec des anticorps monoclonaux spécifiques des protéines à étudier couplés à des fluorochromes. Les cellules marquées sont introduites dans le cytomètre et guidées par un liquide de gaine sous pression, qui va aligner et espacer les cellules en leur permettant d'être illuminées par les lasers une par une. La lumière des lasers excite les fluorochromes, dont la fluorescence émise est détectée. La fluorescence est convertie en signal électronique analysable informatiquement (cf. Figure 12). Plus la fluorescence est forte, plus le paramètre correspondant est présent dans la cellule. (40)



Figure 12 : Principe de la cytométrie en flux (41)

1.2.3.3.2.1. La méthode de l'EdU

L'EdU est un nucléotide qui s'incorpore à l'ADN lorsque les cellules prolifèrent. Il possède un groupement alkyle terminal en position 5 du cycle pyrimidique à la place du groupement méthyl. Les cellules sont incubées pendant 2 heures en présence de l'EdU. L'incorporation d'EdU est révélée par un marquage intracellulaire basé sur la *Click-It reaction* : cycloaddition sur la fonction éthynyl de l'EdU d'un azide lié au fluorochrome AF488 (Alexa-

fluor 488) (cf. Figure 13). C'est une réaction chimique rapide, qui se produit à température ambiante et est catalysée par le cuivre. (42)

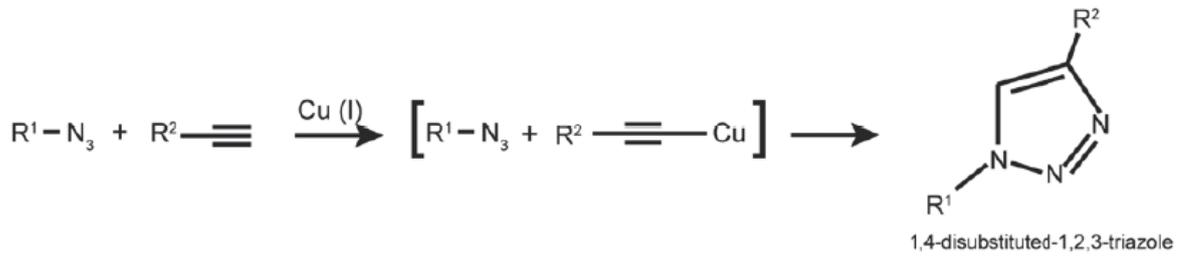


Figure 13 : La réaction Click entre l'azide et le groupement alkyle (42)

Un anticorps anti-CD3-APC est également utilisé, afin d'identifier spécifiquement les lymphocytes T. La lecture se fait par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques d'où sont tirés les pourcentages de lymphocytes T exprimant l'EdU, c'est-à-dire en prolifération (cf. Figure 14).

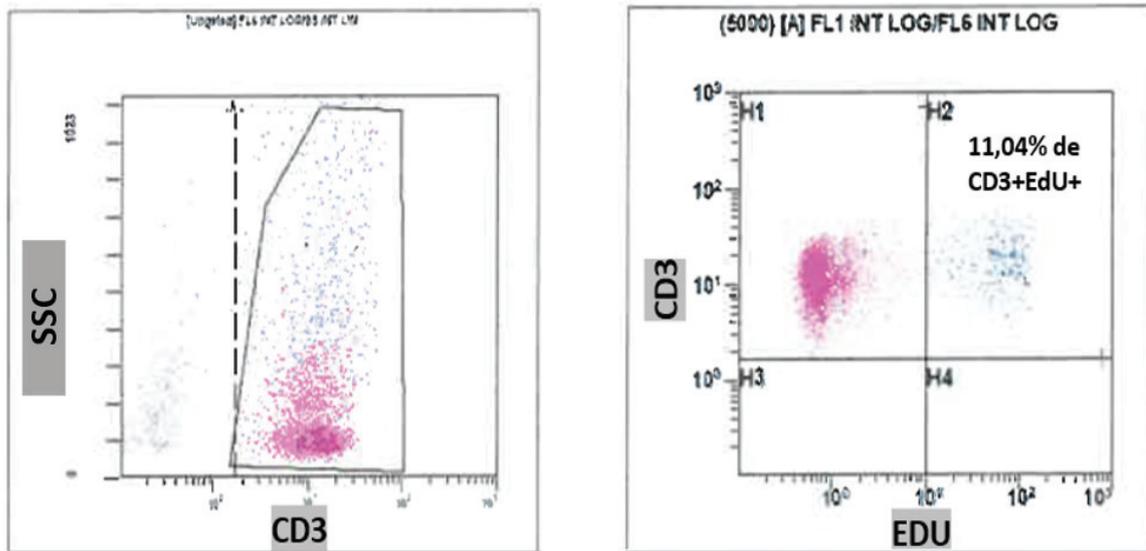


Figure 14 : Exemple de résultat cytométrique de TTL par la méthode EdU réalisé au laboratoire d'immunologie – Hôpital Edouard Herriot

1.2.3.3.2.2. La méthode du CFSE

Le marquage par CFSE se fait lors de la mise en plaque des PBMC. On mesure le pourcentage de lymphocytes T CFSE négatifs pour apprécier la prolifération lymphocytaire en utilisant la CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester).

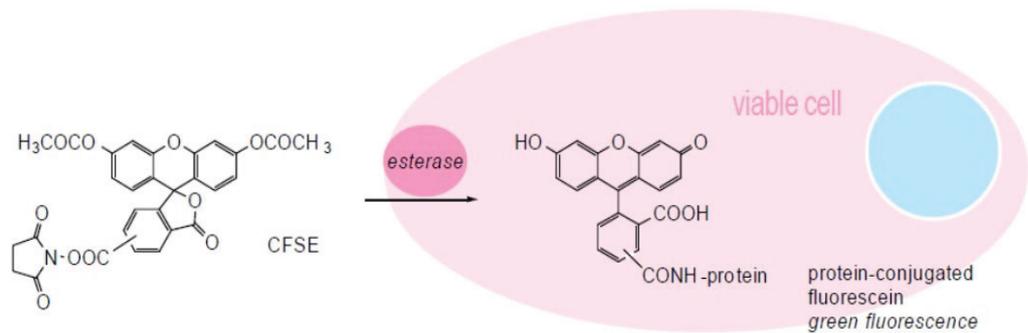


Figure 15 : La réaction de CFSE une fois rentrée dans la cellule (43)

Cette molécule devient fluorescente après pénétration dans les cellules vivantes. La CFSE est alors hydrolysée par les estérases cellulaires et forme ensuite des conjugués avec des groupes aminés (cf. Figure 15).

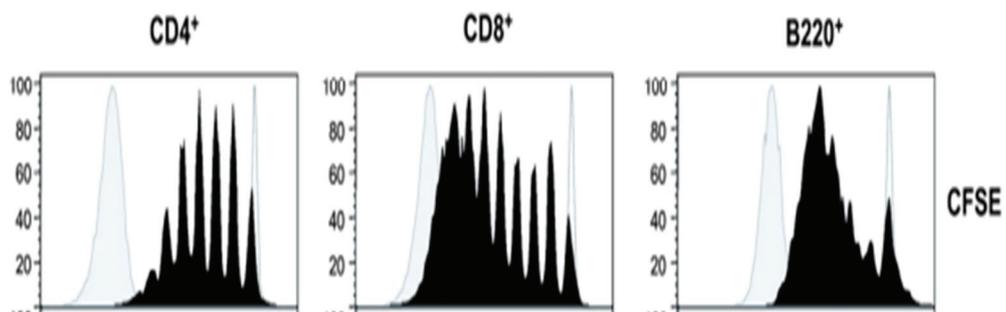


Figure 16 : Représentation des résultats de stimulation des LT par méthode CFSE (44)

Le complexe reste à l'intérieur des cellules marquées. De ce fait, la quantité de CFSE (ainsi que le signal) est divisée par deux à chaque prolifération (division) cellulaire, d'où l'intérêt de son utilisation pour quantifier la prolifération lymphocytaire (cf. Figure 16). (43) (44)

1.2.3.3.3. Avantages et inconvénients des trois méthodes

Tableau 1 : Les avantages et inconvénients des différentes méthodes de TTL

	3 [H] Thymidine	EdU	CFSE
Marquage	ADN	ADN	MEMBRANE
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Méthode Sensible - Gold standard 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible nombre de cellules nécessaires - Plus simple que 3[H] thymidine (14) - Identification spécifique des lymphocytes 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible nombre de cellules nécessaire - Plus simple que la thymidine tritiée - Identification spécifique des lymphocytes - Mesure du nombre de cycle cellulaire (19),(15)
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Gestion de la radioactivité (toxicité, déchets) - Technique longue - Pas de marquage de sous-populations simultanés - Peut induire l'apoptose (13) - Il ne s'agit pas d'un test spécifique aux lymphocytes T 	<ul style="list-style-type: none"> - Le coût - L'EdU modifie la structure tridimensionnelle de l'ADN et peut donc empêcher les protéines de se fixer sur l'ADN - On ne peut pas apprécier le nombre de cycle de division cellulaire avec cette méthode (45) 	<ul style="list-style-type: none"> - C'est une méthode moins sensible car mesure une diminution de fluorescence - Une méthode toxique pour les cellules car elle modifie les protéines cellulaires de façon permanente - Nécessite la dénaturation des brins d'ADN et donc demande des conditions de tampon très spécifiques (45)

Il est à noter qu'il existe d'autres méthodes de révélation TTL comme la méthode **FASCIA** qui comporte une réaction enzymatique d'une enzyme mitochondriale (succinate déshydrogénase) qui va transformer les sels de tetrazolium en formazan (composant bleu détectable par ELISA colorimétrique). Cette méthode est simple, rapide, et nécessite une petite quantité d'échantillons. Néanmoins, le signal est indirectement proportionnel au nombre de cellules vivantes et non pas des cellules en division ce qui peut diminuer la sensibilité. (46)

2. OBJECTIF DE LA THÈSE

Le nombre d'analyses biologiques d'immunologie cellulaire réalisées est en constante augmentation au laboratoire, et la présence de techniciens moins expérimentés du fait d'un renouvellement régulier des postes motivent une simplification des procédures analytiques du laboratoire. Dans ce contexte, le test de prolifération lymphoblastique étant une technique manuelle très longue, ayant besoin de personnel formé et expérimenté, il est logique d'envisager une possible simplification de ce procédé.

Par ailleurs, une demande d'accréditation a été faite pour le test de prolifération lymphoblastique au laboratoire d'immunologie d'HEH. En effet, les laboratoires de biologie médicale doivent se conformer aux exigences de la norme NF EN ISO 15189:2012. Dans ce contexte, l'existence d'un contrôle de qualité interne (CIQ) permettant de vérifier la qualité des résultats obtenus fait partie des exigences techniques de l'accréditation. A ce jour, il n'existe pas de CIQ commercialisé pour le test de prolifération lymphoblastique. Ainsi, le laboratoire d'analyse médicale doit envisager des solutions alternatives comme système de contrôle interne de qualité. (47)

Deux objectifs de la thèse découlent de ces observations. Le premier objectif est de faire un état des lieux de l'activité du test de prolifération lymphoblastique réalisé au laboratoire d'immunologie de l'hôpital Edouard Herriot (Hospices Civils de Lyon), dans le but d'améliorer ou simplifier les pratiques de cette analyse biologique. Le second objectif est de participer à l'élaboration d'un contrôle interne de qualité pour le test de prolifération lymphoblastique.

Pour cela, j'ai réalisé :

- Un bilan des prescriptions du test de prolifération lymphocytaire pratiqué au laboratoire depuis la mise en place de la technique par cytométrie de flux en 2015
- Une comparaison des résultats obtenus dans les différentes conditions de stimulation des lymphocytes T.
- Une évaluation de la possibilité d'utiliser des PBMC congelées issues du sang d'un même donneur sain comme contrôle interne de qualité.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. Etude de cohorte

Une étude de cohorte rétrospective a été réalisée sur une période de 5 ans. Les résultats de TTL ont été extraits du logiciel GLIMS à partir du 1^{er} janvier 2015, correspondant à la mise en place du nouveau protocole du TTL par cytométrie en flux au sein du laboratoire d'immunologie à l'hôpital Edouard Herriot. Pour chaque condition de stimulation, les résultats de prolifération, en proportion de lymphocytes T marqués à l'EdU et en niveau de réponse correspondant ont été colligés. En parallèle, les informations cliniques des patients ont été extraites du logiciel EASILY. Les informations cliniques sont : la date de naissance, le sexe, le service hospitalier de prescription du test de prolifération lymphocytaire, la date de la réalisation du test, l'indication, le jour de la réalisation du test, l'heure et la durée de la culture du TTL.

3.2. Test de prolifération lymphocytaire

1^{ère} étape : mise en culture

Les PBMC fraîches ou décongelées sont mises en culture en duplicat (10^6 cellules/mL) dans un milieu RPMI en présence ou non (condition témoin) de différents agents stimulants, à 37°C sous CO₂, à la concentration finale de :

- PHA pendant 72h : 36 µg/ml
- ConA pendant 72h : 65 µg/ml
- PWM pendant 72h : 1 µg/ml
- OKT3 pendant 72h : 50, 25 et 10 ng/ml
- TUB pendant 7 jours : 10 et 5 µg/ml
- AT pendant 7 jours : 10, 5 et 1 µg/ml
- CAND pendant 7 jours : 25 et 10 µg/ml

2^{ème} étape : mise en évidence de la prolifération des lymphocytes T

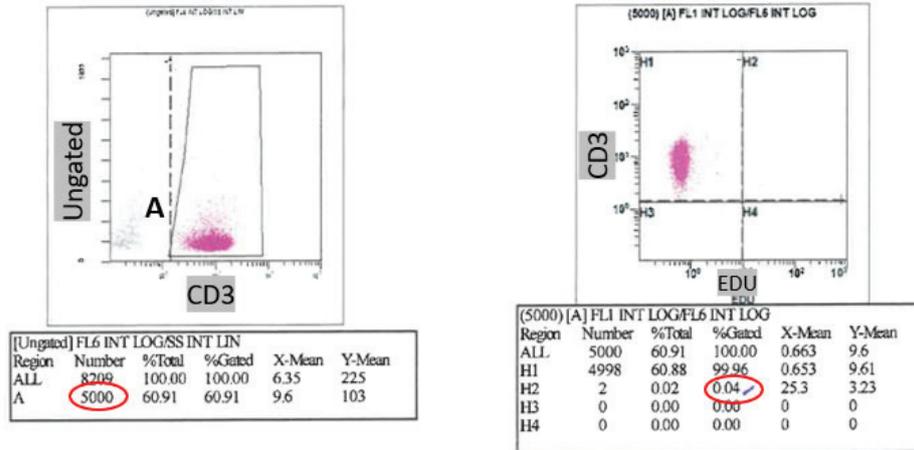
Après l'étape de culture, la solution d'EdU est distribuée dans chacun des puits (concentration finale = 10 µM). Les cellules sont mises en incubation pendant 2 h à 37 °C, sous 5 % de CO₂. Après l'incorporation d'EdU, les puits sont homogénéisés et transférés dans des tubes de cytométrie, dans lesquels un lavage des cellules est réalisé par du tampon PBS+BSA 1%.

L'anticorps anti-CD3-APC est distribué dans chaque tube et laissé incuber 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Un lavage est ensuite réalisé avant de fixer les cellules avec une solution de fixation pendant 15 min à température ambiante. Un lavage est réalisé puis le tampon Click-It est ajouté et la solution de perméabilisation qui permet au fluorochrome de pénétrer la cellule tout en respectant la morphologie de la cellule. Cette solution doit être utilisée dans les 15 minutes suivant sa préparation.

3^{ème} étape : analyse des données sur le cytomètre

La lecture sur le cytomètre Navios (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) doit être réalisée dans les 7 jours suivants. La figure 16 illustre les graphiques de résultats issus du cytomètre. Un minimum de 5 000 cellules CD3⁺ (cf. Figure 16A et B, Région A) doit être analysé. Le CD3 permettant de sélectionner spécifiquement les lymphocytes T, il faut donc vérifier la bonne séparation des populations CD3⁺ et CD3⁻. La prolifération des lymphocytes T est ensuite estimée par la proportion de cellules CD3⁺ ayant incorporé l'EdU-AF488 (cf. Figure 16B, Région H2) dans les conditions stimulées. La proportion de LT en prolifération doit être strictement inférieure 0,5% dans la condition contrôle, non stimulée (cf. Figure 16A, Région H2).

A. Sans stimulation



B. Après stimulation par mitogène ou antigène

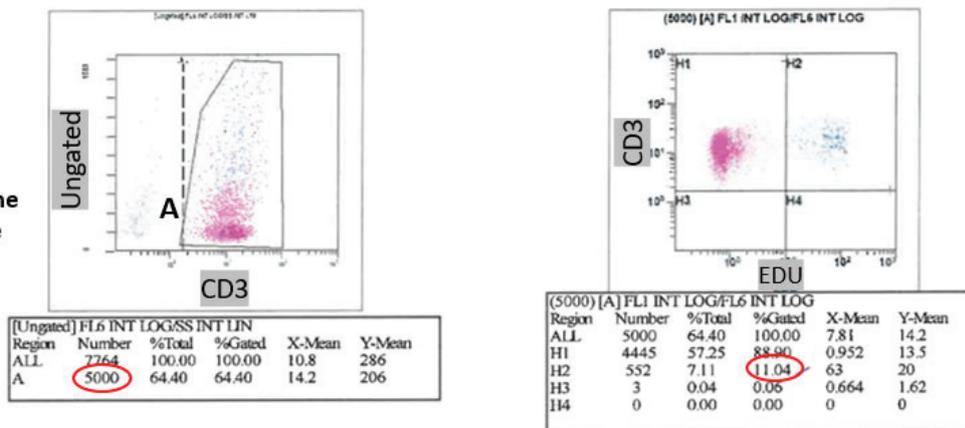


Figure 17 : Résultats d'un TTL. A) Condition non stimulées. B) Après stimulation des lymphocytes.

Les résultats apparaissent sur le compte-rendu à la fois sous forme brute (Pourcentage de lymphocytes T EdU⁺) et interprétés selon quatre niveaux de prolifération (Tableau 2).

Tableau 2 : Niveaux de prolifération des lymphocytes T après stimulation

Réponse	Absence	Faible	Modérée	Bonne
Mitogènes après 72H				
Con A (%CD3 ⁺)	<0.5	0.5-15	15-35	> 35
PHA (%CD3 ⁺)	<0.5	0.5-15	15-35	> 35
PWM (%CD3 ⁺)	<0.5	0.5-3	3-5	>5
OKT3 (%CD3 ⁺)	<0.5	0.5-10	10-25	> 25
Antigènes après 7 jours				
Tous antigènes (% CD3 ⁺)	<0.5	0.5-2.5	2.5-5	>5

3.3. Poches des cellules mononuclées du sang périphérique congelées

Les PBMC issus d'une poche de sang provenant de donneur de l'EFS ont été mises en culture afin de réaliser un test de prolifération lymphoblastique à T0, et ont ensuite été congelées à -80°C dans une solution composée de RPMI (50%), sérum AB humain (40%) et DMSO (diméthylsulfoxyde) (10%). Des aliquots de ces PBMC ont ensuite été décongelés régulièrement (tous les 3 à 4 jours) pendant 300 jours.

A chaque fois, la viabilité des cellules (mesure de l'incorporation d'iodure de propidium par cytométrie en flux), un phénotypage lymphocytaire T CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ et un test de prolifération lymphocytaire T ont été réalisés afin d'évaluer l'impact de la congélation sur les cellules.

3.4. Tests statistiques utilisés

Afin de comparer les différentes concentrations de mitogènes ou antigènes testés, plusieurs tests ont été utilisés :

- ❖ Le test de corrélation de Spearman : test non paramétrique utilisé pour apprécier la corrélation entre deux composantes liées par une relation proportionnelle. Il permet de mesurer le lien entre les variables étudiées ;
- ❖ Test non paramétrique de rangs signés de Wilcoxon : comparaison des différences de réponses prolifératives entre deux groupes d'échantillons appariés. Il s'agit d'un test qui aide à savoir s'il y a un changement sur la médiane entre les données ;
- ❖ Test de Mann Whitney : comparaison des différences de réponses prolifératives entre deux groupes d'échantillons non appariés. C'est un test non paramétrique qui étudie la distribution des données d'une seule variable dans chaque groupe d'échantillon ;
- ❖ Test de corrélation intraclass : utilisé afin d'établir le degré de fiabilité des résultats obtenus, c'est-à-dire, le diagnostic posé. Ce test permet de vérifier la corrélation mais aussi le degré de l'accord entre les paramètres testés. Ce test est utilisé afin de comparer les variations entre deux paramètres dans un seul groupe de patients. Le coefficient varie entre 0 et 1. Plus la valeur est proche de 1, plus la corrélation et la concordance sont fortes. Ce test permet d'apprécier l'accord entre les paramètres appartenant aux mêmes classes d'échantillon ; (48)

- ❖ Test du Khi-deux : test statistique d'indépendance, pour déterminer l'association entre deux variables. L'hypothèse nulle étant de ne pas avoir une association significative entre les variables. Les variables étant les réponses aux différents stimulants. Les réponses du test pour chaque mitogène ont des plages qui permettent de diviser la réponse en quatre catégories : « Bonne réponses », « Réponse modéré », « Réponse faible » et « Pas de réponse ». Ces catégories permettent de comparer les réponses qui ne sont pas du même ordre de mesure (par exemple, la phytohémagglutinine et le pokeweed) ;
- ❖ Concernant les cellules congelées destinées au contrôle interne de qualité, la comparaison de changement des catégories de réponses prolifératives a permis de définir un seuil d'acceptabilité en termes de nombre de jours de congélation et de pourcentage des lymphocytes présents.

4. RÉSULTATS

4.1. Description de la cohorte

Il y a eu 726 TTL réalisés du 1^{er} janvier 2015 au 31 décembre 2020, correspondant à 336 patients au total. Le nombre de tests réalisés varie entre 80 et 140 tests par an. Une augmentation constante du nombre de tests est visible depuis 2016, avec une régression en 2020 (cf. Figure 18). Cette régression est probablement liée à la pandémie de SARS-CoV-2, cette activité a été notamment interrompue pendant plusieurs semaines afin de pouvoir gérer les analyses d'autres secteurs du laboratoire dans ce contexte.

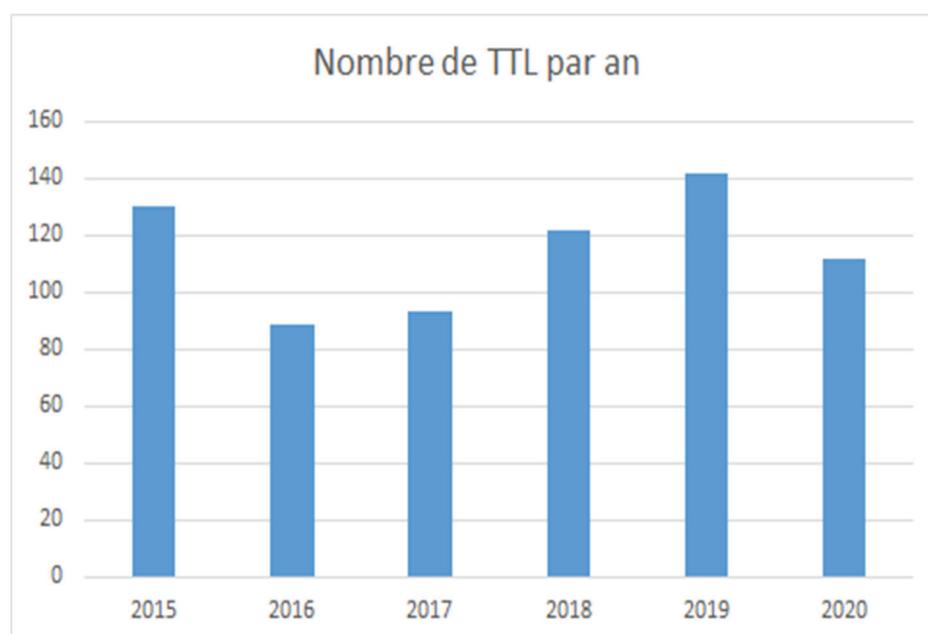
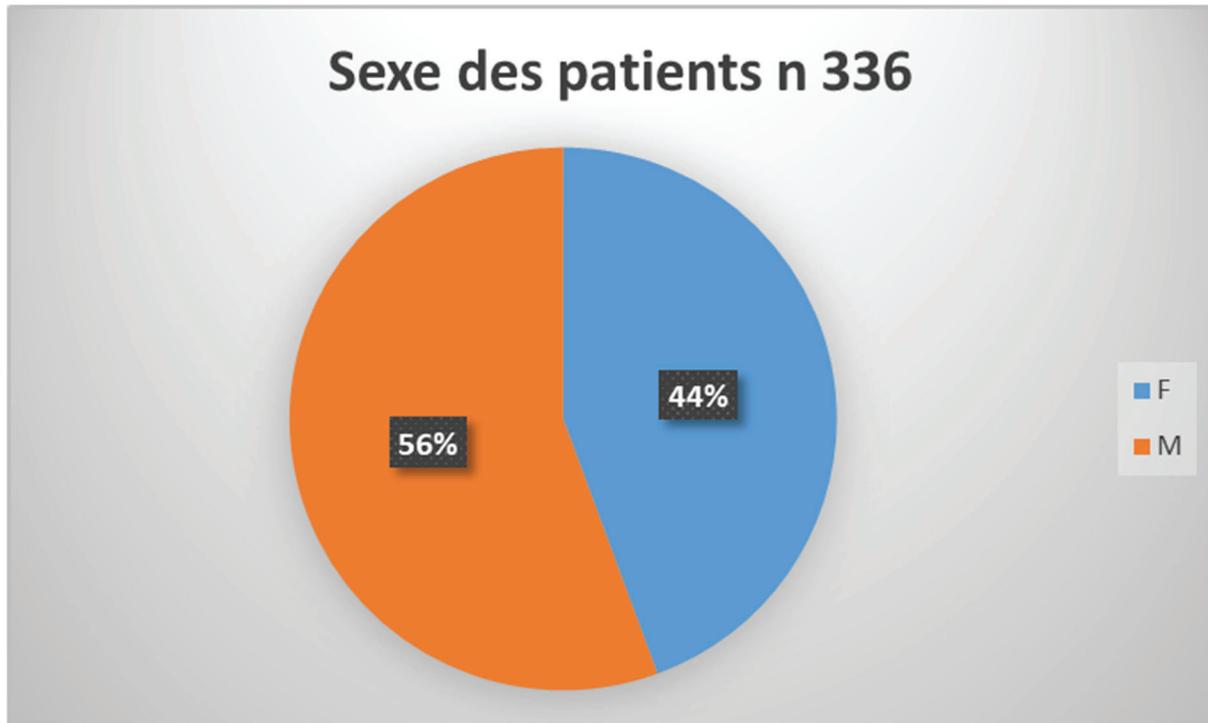


Figure 18 : Nombre de tests TTL réalisés par an

Parmi les 336 patients, plus de la moitié sont des enfants jusqu'à 10 ans, les patients adultes représentant seulement 11%. 56% des patients sont du sexe masculin (cf. Figure 19).

A



B

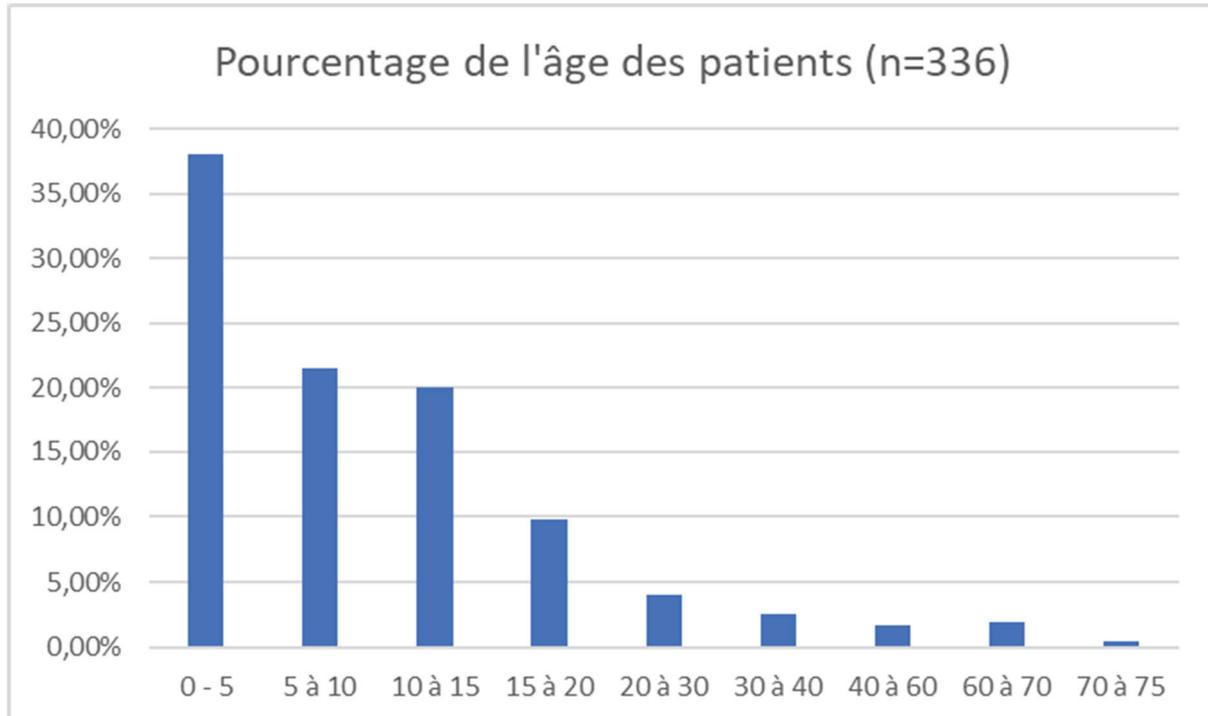


Figure 19 : Démographie des patients A) Répartition des patients en fonction du sexe. B) Répartition des patients selon l'âge

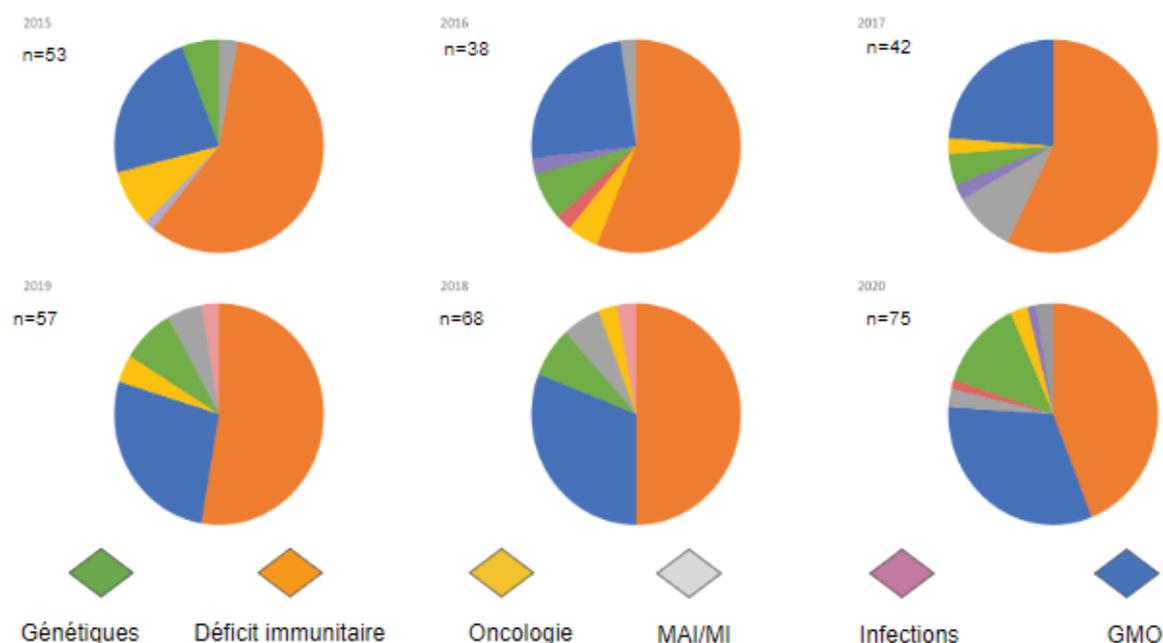


Figure 20 : Evolution des indications du TIL. N = 336 patients analysés

Les indications sont homogènes au fil des années. La catégorie la plus marquée étant la recherche de déficits immunitaires, puis le suivi de la reconstitution immunitaire après greffe de moelle osseuse (cf. Figure 20). Chez l'adulte, les indications sont plus hétérogènes : médecine interne, rhumatologie, hématologie ou encore pneumologie (notamment pour la recherche des réponses de type allergies de type IV, ainsi que dans le suivi de la réponse immunitaire post-infection).

4.2. Comparaison de la réponse lymphoproliférative en fonction des conditions de stimulation

4.2.1. Comparaison des différents mitogènes

4.2.1.1. Phytohémagglutinine et Concanavaleine A

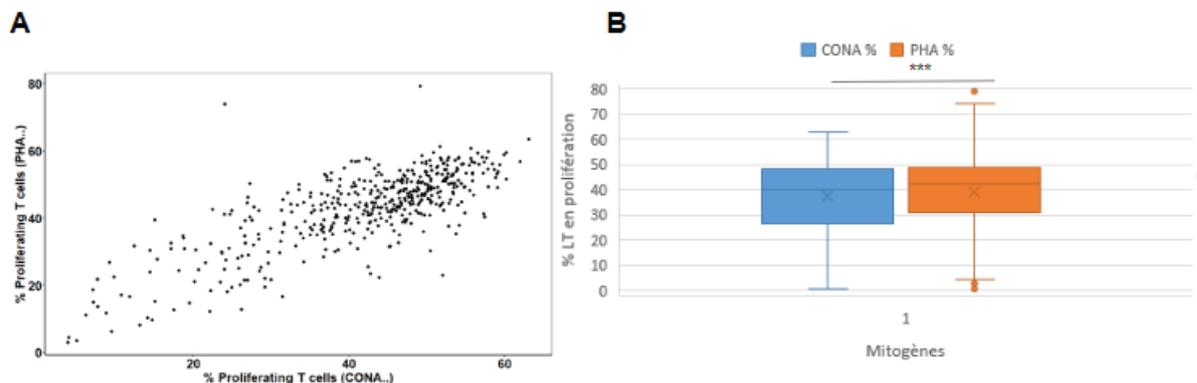


Figure 21 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la PHA et la conA. A) Résultats bruts des lymphocytes T EdU+. B) Box-plots pour comparer les médianes de prolifération

Les réponses prolifératives des lymphocytes T à la stimulation par ConA et PHA sont corrélées ($R = 0,706$). Les médianes de prolifération des lymphocytes T stimulés par la ConA et la PHA sont significativement différentes (39,98% et 42,27% % respectivement ; p wilcoxon = 0,005). Néanmoins, la corrélation intraclass présente un index de 0,72, montrant que les valeurs pour chaque patient sont concordantes. Ainsi, les réponses prolifératives T jugées similaires après stimulation par PHA et ConA, rendent redondante l'utilisation de ces deux mitogènes.

4.2.1.2. Phytohémagglutinine et Pokeweed Mitogène

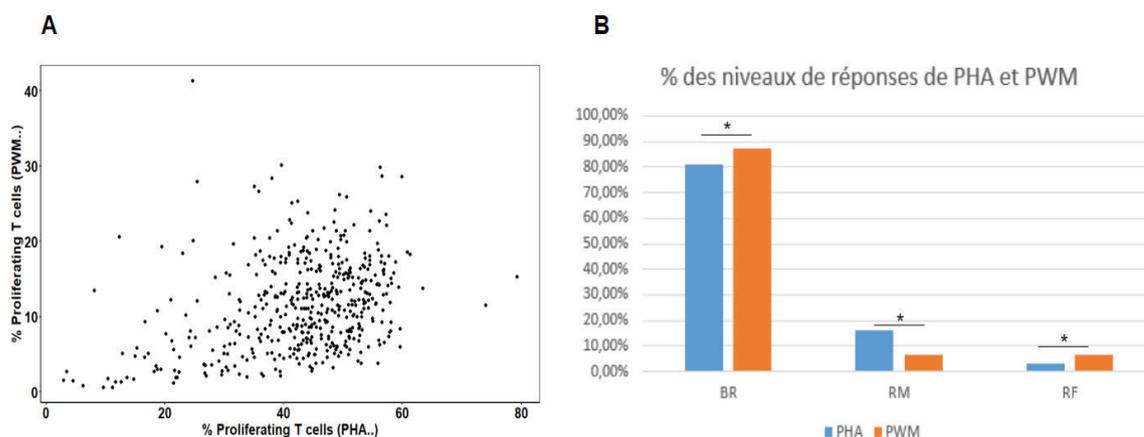


Figure 22 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la PHA et la PWM. A) Résultats bruts des lymphocytes T EdU+. B) Histogramme pour comparer les pourcentages de chaque niveau de réponse. BR = Bonne réponse, RM = Réponse modérée, RF = Réponse faible.

Les réponses prolifératives des lymphocytes T à la stimulation par PHA et PWM sont peu corrélées ($R = 0,310$, cf. figure 22A), sûrement du fait de la magnitude de prolifération très différente entre les deux mitogènes (médianes 42,27% et 9,175% respectivement ; $p < 0,001$; Wilcoxon). En revanche, le nombre de TTL dans chaque catégorie de réponse proliférative sont similaire (cf. figure 22B ; $p = 0,012$, Khi-deux), montrant que les deux stimulations donnent des résultats redondants. La corrélation intraclasse présentent un index de 0,42, mais en réalité seulement 16 bilans sur 726 (soit 2,2% des bilans) présentent des réponses de catégories différentes entre les deux mitogènes.

4.2.1.3. Phytohémagglutinine et anticorps anti CD3 (OKT3)

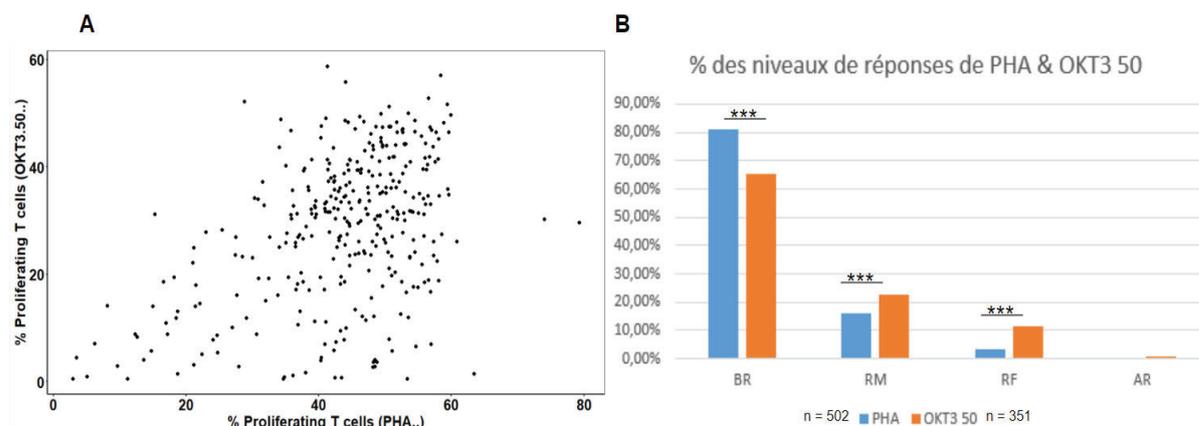


Figure 23 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la PHA et l'OKT3 50. A) Résultats bruts des lymphocytes T EdU+. B) Histogramme des niveaux de réponses à la PHA et à l'OKT3 50. BR = Bonne réponse, RM = Réponse modérée, RF = Réponse faible.

Les réponses prolifératives des lymphocytes T à la stimulation par OKT3 50 et PHA sont peu corrélées ($R = 0,379$, cf. figure 23A). Les médianes sont significativement différentes (25,33% et 42,27% respectivement, $p < 0,001$, Wilcoxon). Enfin, le nombre de résultats dans chaque catégorie de réponse proliférative est significativement différent ($p < 0,001$, Khi-deux, cf. figure 23B).

L'ensemble de ces données montrent que les réponses prolifératives à la PHA et l'OKT3 sont différentes.

4.2.1.4. Comparaison des différentes concentrations d'OKT3

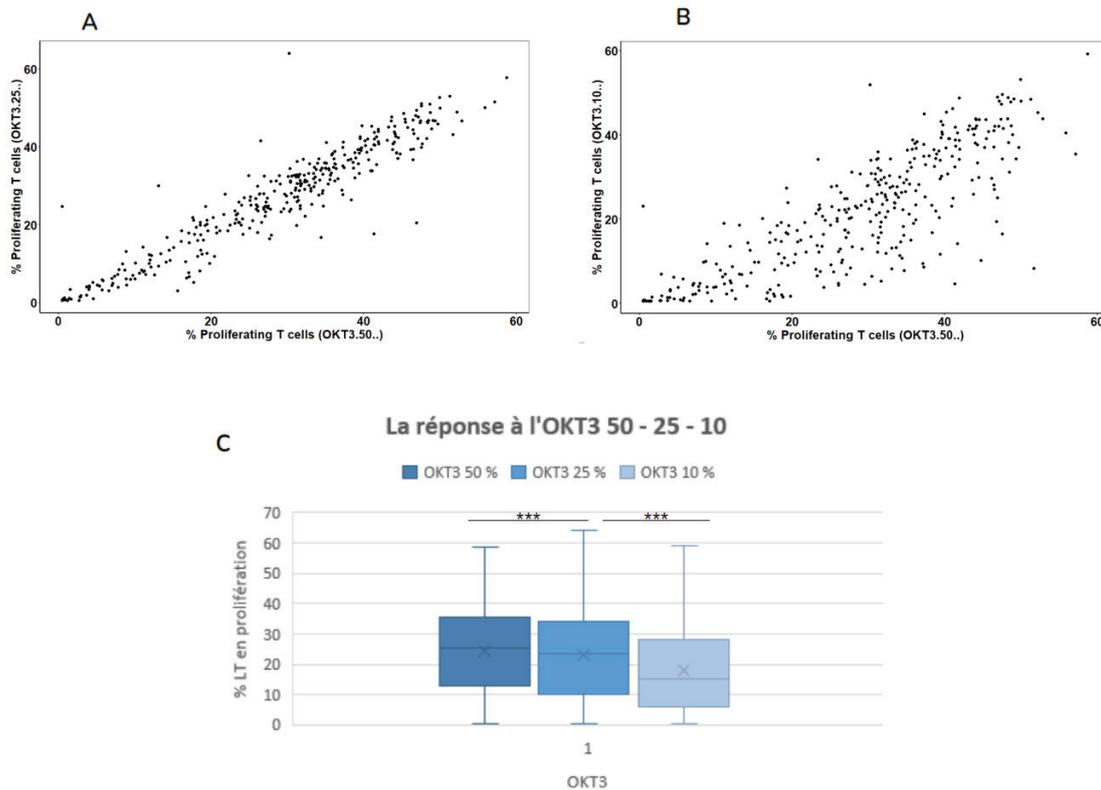


Figure 24 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par l'OKT3 à des concentrations différentes. A) Représentation graphique de la relation entre les réponses à l'OKT3 50 et l'OKT3 25. B) Représentation graphique de la relation. C) Box plot des médianes des réponses à l'OKT3

Les réponses prolifératives des lymphocytes T à la stimulation par OKT3 50 et 25 et OKT3 50 et 10 sont très bien corrélées (respectivement $R = 0,933$ et $0,818$) (cf. Figure 24A, 24B). En revanche, les médianes de prolifération des lymphocytes T stimulés par OKT3 50, 25 et 10 sont significativement différentes (30,9%, 28,8% et 21,8% respectivement ; $p < 0,001$ pour les trois concentrations), la meilleure réponse étant obtenue en utilisant l'OKT3 à la concentration 50. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse aux résultats par catégorie de réponse proliférative, l'index ICC est excellent (0,88), montrant que les patients répondent de la même manière aux trois concentrations.

Ainsi, les réponses prolifératives T sont similaires après stimulation par OKT3 50, 25 et 10, rendant redondante l'utilisation de ces trois conditions.

4.2.2. Comparaison des différentes concentrations d'antigènes

4.2.2.1. Tuberculine

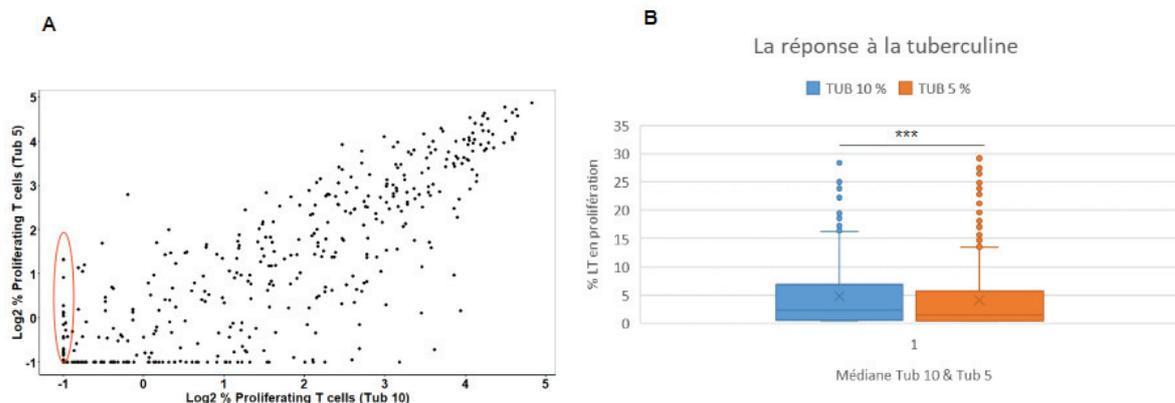


Figure 25 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la Tuberculine à des concentrations différentes. A) Représentation graphique de la relation entre les réponses à la TUB5 et la TUB10. B) Représentation graphique de la différence des médianes des réponses à la TUB5 et la TUB10.

Les réponses prolifératives des lymphocytes T à la stimulation par la tuberculine 10 et 5 sont bien corrélées ($R = 0,76$). Seuls 19 bilans sur 489 ne répondaient pas avec la concentration de 10 alors qu'ils répondaient avec celle de 5, soit moins de 0,5% des bilans (cf. ellipse rouge figure 25A). Les médianes de prolifération étaient significativement différentes ($p < 0.001$, Wilcoxon, cf. figure 25B), la meilleure réponse étant obtenue en utilisant la concentration 10. Néanmoins, les réponses obtenues pour chaque patient étaient concordantes, comme illustré par un index ICC de 0,88.

Ainsi, les réponses prolifératives T sont similaires après stimulation par la tuberculine 10 et 5, rendant redondante l'utilisation de ces deux conditions.

4.2.2.2. Anatoxine tétanique

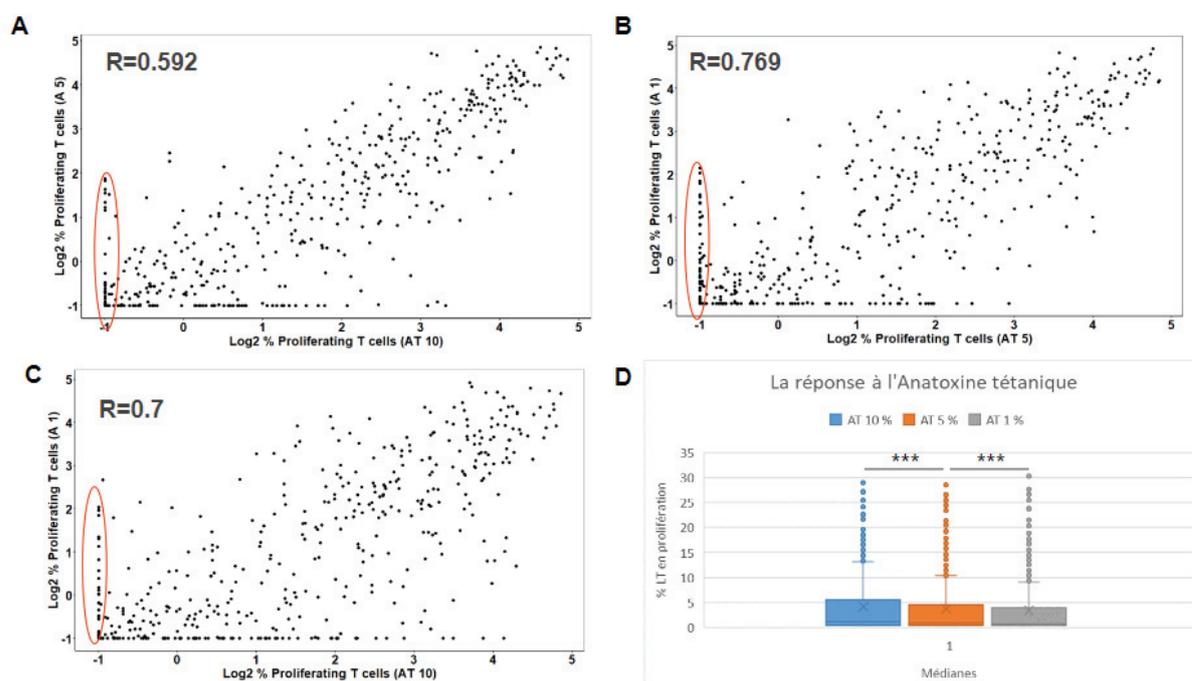


Figure 26 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par l'Anatoxine à des concentrations différentes. A) Représentation graphique de la relation entre les réponses à l'AT5 et l'AT10. B) Représentation graphique de la relation des réponses entre l'AT1 et l'AT5. C) Représentation graphique de la relation entre les réponses à l'AT1 et l'AT10. D) La distribution des réponses aux trois concentrations de l'Anatoxine.

Les réponses prolifératives aux trois concentrations d'AT 10, 5 et 1, sont corrélées ($R = 0,592$, $0,769$ et $0,701$ respectivement). Les médianes étaient significativement différentes (1,17, 0,83 et 0,71 respectivement : $p < 0,001$: Wilcoxon), la meilleure réponse étant obtenue en utilisant la concentration 10. Néanmoins, seuls 26 bilans sur 648 ne répondaient pas avec la concentration de 10 alors qu'ils répondaient avec celle de 5, soit moins de 0,5% des bilans (cf. ellipse rouge figure 26A). De même, 45 bilans sur 648 ne répondaient pas avec la concentration de 10 alors qu'ils répondaient avec celle de 1, soit moins de 0,5% des bilans (cf. ellipse rouge figure 26C). Enfin, les résultats par catégorie de réponse à la stimulation par chaque concentration d'AT étaient concordantes pour chaque patient, l'index ICC étant de 0,83. Ainsi, les réponses prolifératives T sont similaires après stimulation par l'anatoxine 10, 5 et 1, rendant redondante l'utilisation de ces trois conditions.

4.2.2.3. Candidine

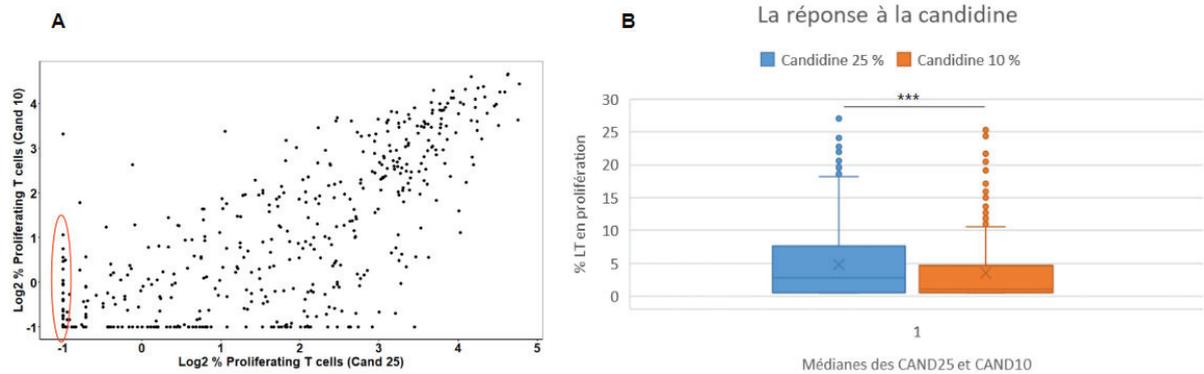


Figure 27 : Comparaison des réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la candidine à des concentrations différentes. A) Représentation graphique de la corrélation entre les réponses à la CAND10 et la CAND25. B) Représentation de la distribution des données en Médiane et Moyenne des réponses aux deux concentrations utilisées de la candidine.

Les réponses prolifératives des lymphocytes T après stimulation par la candidine à la concentration 25 et 10 sont corrélées ($R = 0,868$, cf. figure 27A). Seulement 17 bilans sur 566 ne répondent pas avec la concentration de 25 alors qu'ils répondent avec celle de 10, soit $< 0,5\%$ des bilans (cf. ellipse rouge figure 27A). Les médianes sont significativement plus importantes avec la concentration 25 ($p < 0,001$; Wilcoxon). Néanmoins, les résultats par catégorie de réponse à la stimulation sont concordants pour chaque patient, l'index ICC étant de 0,82. Ainsi, les réponses prolifératives T sont similaires après stimulation par la candidine 25 et 10, rendant redondante l'utilisation de ces deux conditions.

4.3. Evaluation de l'utilisation de PBMC congelés pour la mise en place d'un CIQ du TTL

4.3.1. Viabilité et phénotypage des lymphocytes T

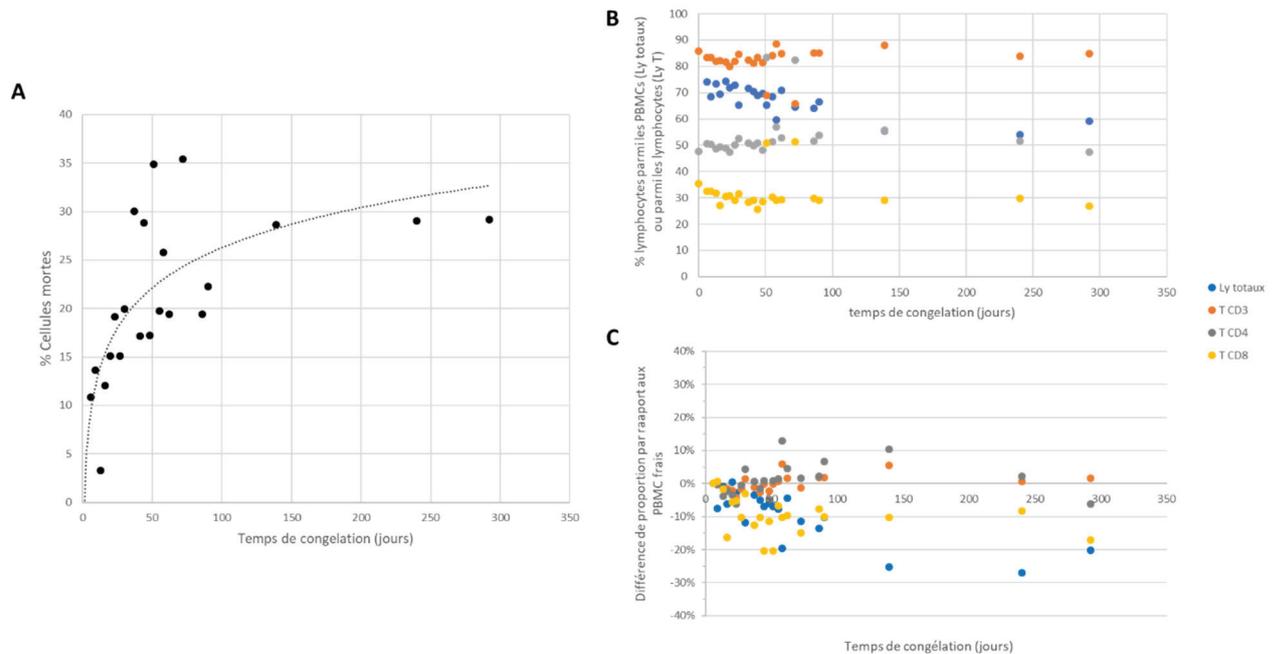


Figure 28 : Impact de la congélation sur la viabilité des Lymphocytes dans les PBMC au cours du temps

Le pourcentage de PBMCs mortes augmente avec le temps de congélation (cf. Figure 28 A). Au bout de 50 jours, la mortalité atteint 20%. Cette mortalité semble avoir un impact sur la composition des PBMCs (cf. Figure 28 B et C). En effet, la proportion des lymphocytes totaux diminue au cours du temps, avec une différence maximum observée d'environ 30% par rapport aux cellules fraîches. En revanche, les lymphocytes T semblent assez résistants à la congélation puisque la proportion de lymphocytes T au sein des lymphocytes paraît stable jusqu'à 1 an après congélation. Sur cette période, les moyennes des différences de proportions pour les lymphocytes T CD3, CD4 et CD8 sont respectivement 1,8%, 3,5% et 9,7%, avec un maximum de 10% environ pour les T CD3 et T CD4, et 20% pour les T CD8.

4.3.2. Test de prolifération lymphoblastique

4.3.2.1. Mitogènes : PHA, ConA, PWM et OKT 3

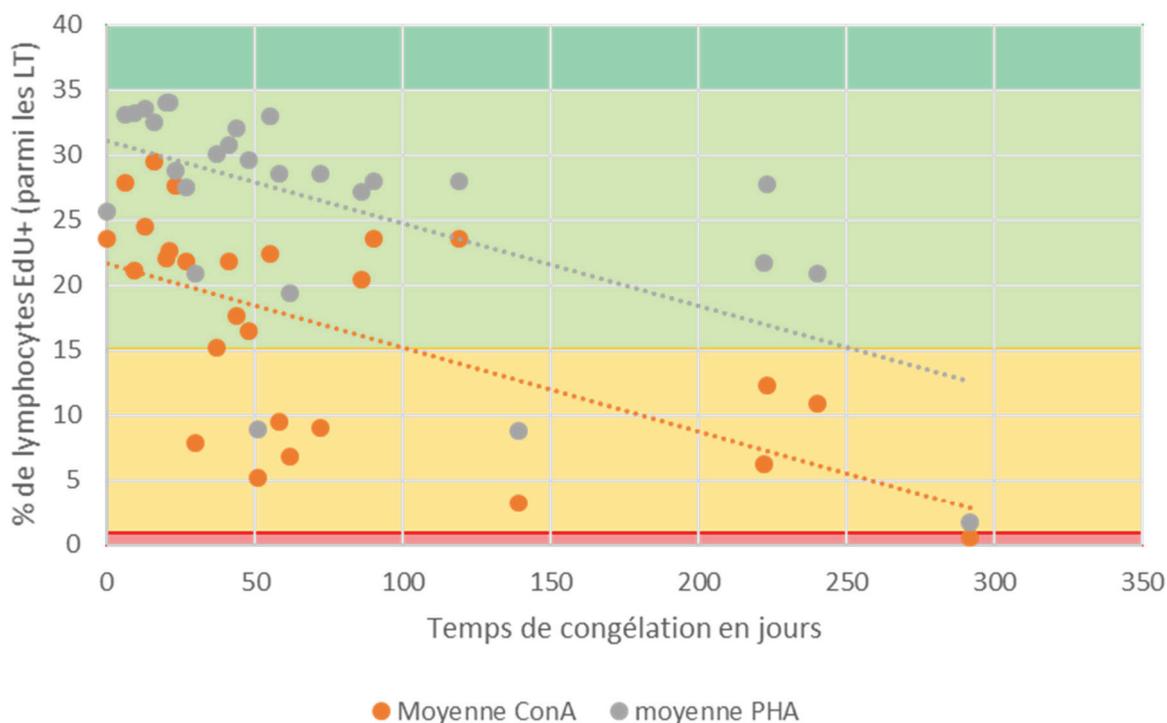


Figure 29 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par la PHA et par la ConA. Les couleurs de l'arrière-plan correspondent aux catégories de réponse proliférative : vert foncé = bonne réponse, vert clair = réponse modérée, orange = réponse faible, rouge = absence de réponse

La prolifération des lymphocytes T à la suite de la stimulation par la conA ou la PHA diminue nettement en fonction de nombre de jours de congélation des PBMC (cf. Figure 29). La réponse proliférative change de catégorie à partir du 50^{ème} jour pour la PHA et du 30^{ème} jour pour la ConA.

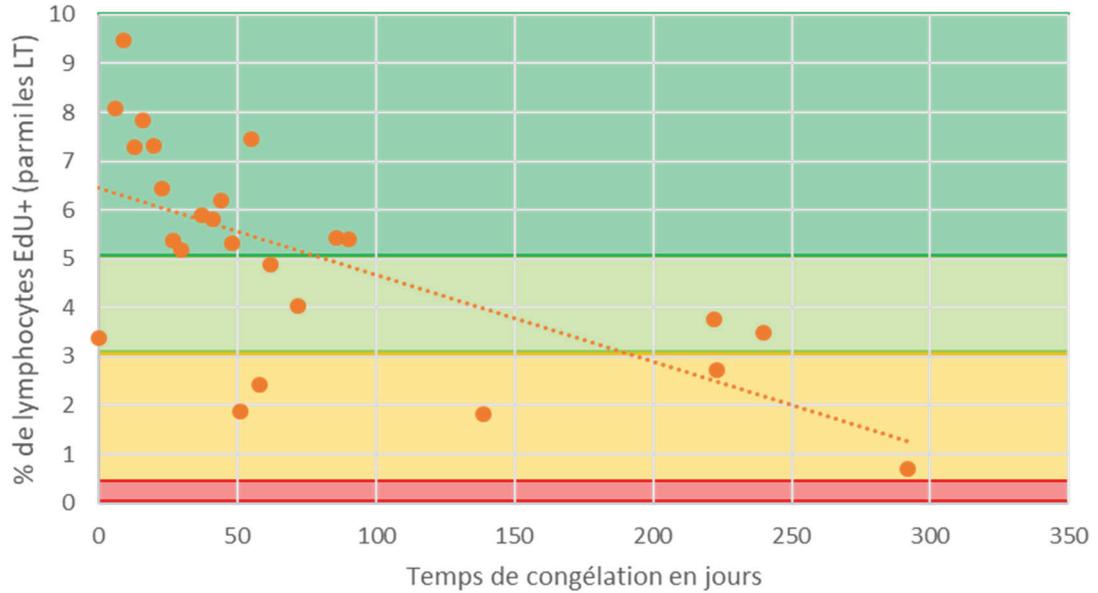


Figure 30 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par la PWM. Les couleurs de l'arrière-plan correspondent aux catégories de réponse proliférative : vert foncé = bonne réponse, vert clair = réponse modérée, orange = réponse faible, rouge = absence de réponse

De la même façon, la prolifération des lymphocytes T à la suite de la stimulation par le pokeweed diminue nettement en fonction de nombre de jours de congélation des PBMC (cf. Figure 30). La réponse proliférative change de catégorie à partir du 50^{ème} jour de congélation.

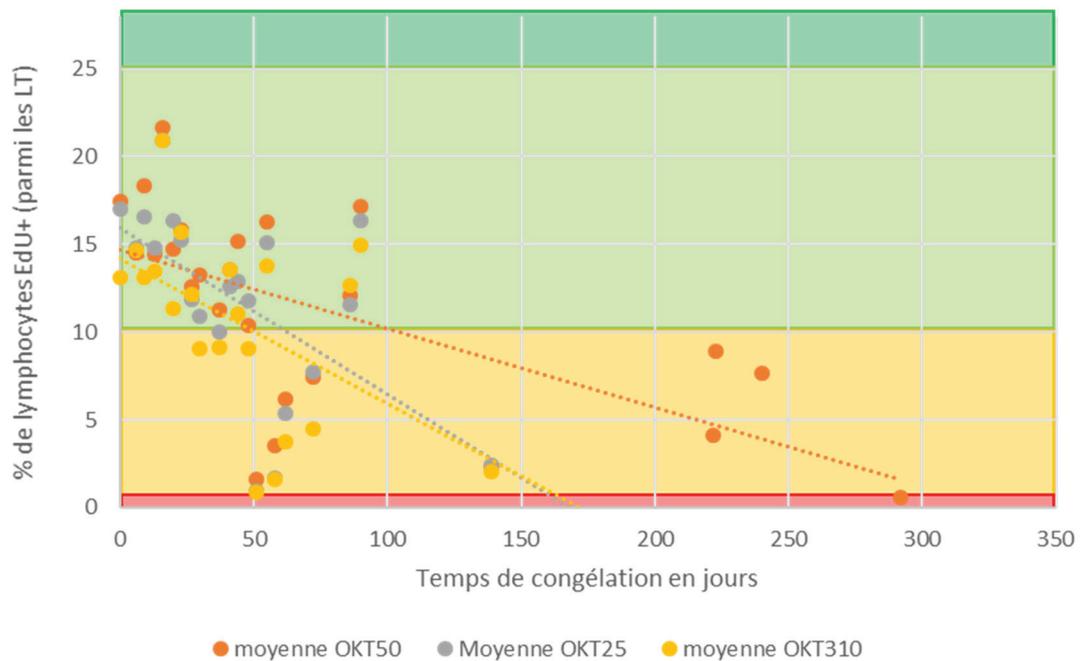


Figure 31 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par l'OKT3 50. Les couleurs de l'arrière-plan correspondent aux catégories de réponse proliférative : vert foncé = bonne réponse, vert clair = réponse modérée, orange = réponse faible, rouge = absence de réponse

La prolifération des lymphocytes T à la suite de la stimulation par l'OKT3 diminue nettement en fonction de nombre de jours de congélation des PBMC et ce pour les trois concentrations utilisées (50, 25 et 10) (cf. Figure 31). La réponse proliférative change de catégorie à partir du 50^{ème} jour de congélation pour l'OKT3 50, à partir du 60^{ème} jour pour l'OKT3 25 et du 30^{ème} jour pour l'OKT3 10.

4.3.2.2. Antigènes : Tuberculine, Candidine et Anatoxine tétanique

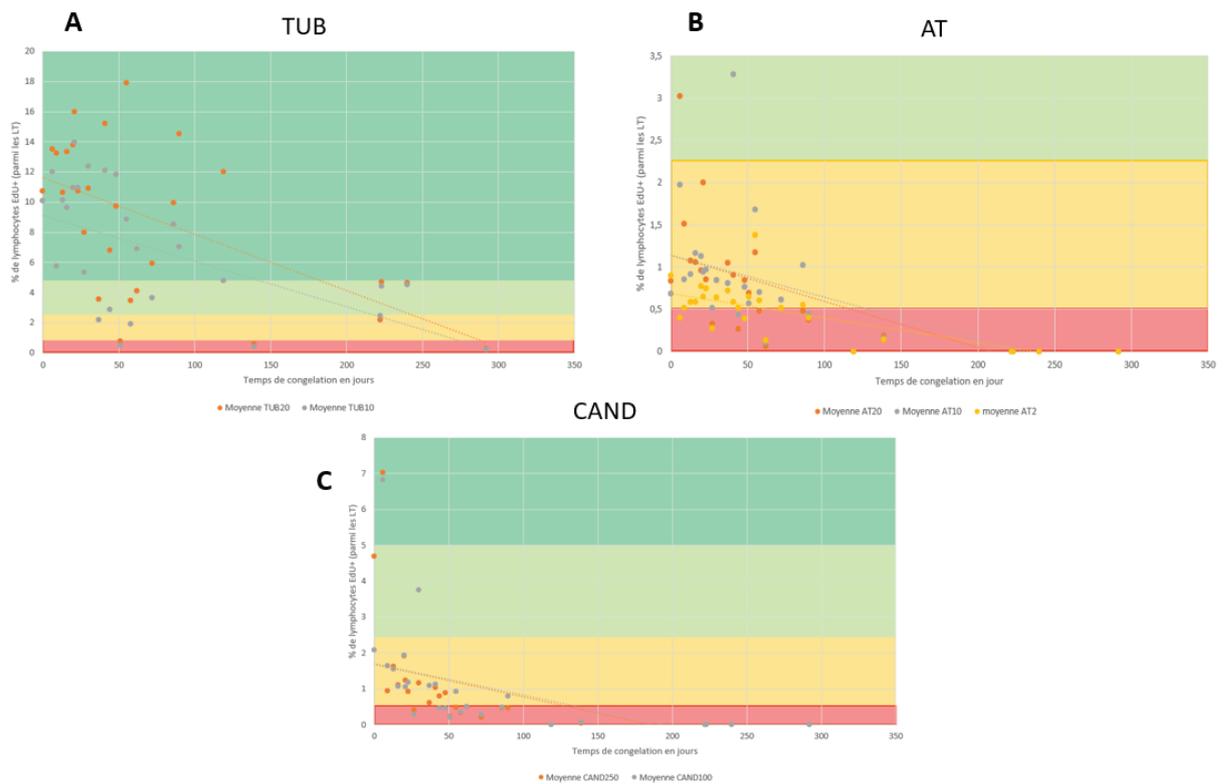


Figure 32 : Impact de la congélation au cours du temps sur la prolifération T en réponse à la stimulation par antigène. A) La réponse au Tuberculine. B) La réponse à l'Anatoxine tétanique. C) La réponses à la Candidine..
 Les couleurs de l'arrière-plan correspondent aux catégories de réponse proliférative : vert foncé = bonne réponse, vert clair = réponse modérée, orange = réponse faible, rouge = absence de réponse

La prolifération des lymphocytes T à la suite de la stimulation par les différents antigènes diminue nettement en fonction de nombre de jours de congélation des PBMC et ce pour les différentes concentrations utilisées (cf. Figure 32).

La réponse proliférative change de catégorie à partir du 37^{ème} jour de congélation pour la tuberculine (concentration 20), à partir du 27^{ème} jour pour l'AT et du 50^{ème} jour pour la candidine (concentration 250).

En conclusion, la culture cellulaire est possible à partir de PBMC décongelés mais seulement pendant 50 jours suivant la congélation, et par stimulation avec des mitogènes. Pour les antigènes, la réponse proliférative déjà faible sur cellules fraîches, est très rapidement altérée après congélation. Au-delà du 50^{ème} jour, une diminution significative de la prolifération des lymphocytes T est observée quelle que soit la condition de stimulation.

5. SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

Cette thèse a pour objectif de faire un état des lieux de l'activité du laboratoire concernant le test de prolifération lymphocytaire dans le but d'améliorer le protocole et d'élaborer une méthode de contrôle qualité interne, en vue de l'augmentation du nombre d'analyses biologiques prescrites.

Le bilan de l'activité de 2015 à 2020, montre que le nombre de TTL réalisés est en constante augmentation chaque année. Pourtant, les indications de cette analyse sont similaires depuis 5 ans, les services d'hématologie pédiatrique étant les prescripteurs les plus importants, dans le cadre de la recherche de déficits immunitaires primitifs et du suivi de patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse. Les méthodes de diagnostic périnatal se sont améliorées durant ces dernières années, d'où l'augmentation des cas de déficit immunitaire primitif mais aussi secondaire. La greffe de la moelle osseuse permet de traiter la plupart de ces maladies (notamment chez l'enfant), d'où le suivi régulier de la reconstitution immunitaire via le test de prolifération lymphocytaire. (49)

Dans ce contexte, la réévaluation du protocole technique de l'analyse, long, coûteux et nécessitant du personnel expérimenté, prend toute son importance afin d'optimiser les ressources du laboratoire.

Ce travail a permis de montrer que la stimulation par phytohématagglutinine et concanavaleine A donnent des résultats concordants. De plus, ces deux mitogènes sont des lectines, et ont donc des mécanismes d'action semblables sur les différentes voies de signalisation des lymphocytes T. Leur utilisation paraît donc redondante et il semble pertinent de n'utiliser que l'un des deux mitogènes à l'avenir. En se basant sur les recommandations du CEREDIH qui ne conseille que l'utilisation de la PHA dans le TTL pour les dépistages de déficits immunitaires (11), nous avons décidé de ne conserver que la stimulation par PHA à l'avenir.

Le Pokeweed montre une différence importante de réponse proliférative par rapport à la PHA, la stimulation par cette dernière étant plus sensible au dépistage d'un déficit de prolifération lymphocytaire T. Par ailleurs, il n'existe aucune recommandation des sociétés savantes quant à l'utilisation de ce mitogène dans le dépistage de déficits immunitaires ou le suivi de la

reconstitution médullaire après greffe de moelle. Ainsi, nous en avons conclu que le Pokeweed n'est pas un mitogène indispensable dans l'étude de la prolifération lymphocytaire T.

Concernant l'OKT3, les patients répondent différemment à cette stimulation par rapport à celle de la PHA. Ceci paraît logique puisque les deux mitogènes ont des mécanismes d'action différents. Ainsi il paraît pertinent d'utiliser les deux mitogènes lors du TTL, puisqu'ils fournissent des informations complémentaires concernant la fonctionnalité des voies de signalisation. En revanche, les différentes concentrations d'OKT3 utilisées donnent des réponses similaires, d'où la décision de n'utiliser à l'avenir qu'une seule concentration d'OKT3, à savoir la concentration la plus importante à 50 ng/ml.

Quant aux trois antigènes testés au laboratoire (tuberculine, anatoxine tétanique et candidine), ce travail a permis de montrer que l'utilisation des différentes concentrations pour chaque antigène est redondante et non nécessaire à l'interprétation des résultats de prolifération lymphocytaire T.

Ainsi, à la suite de ce travail, le protocole de TTL a été simplifié en passant de 13 conditions de stimulation différentes à seulement 5. Cet allègement de la procédure technique a permis d'augmenter le nombre de réplicats techniques, en remplaçant les duplicats de chaque condition de stimulation par des triplicats, représentant un second point d'amélioration du protocole. Ces modifications ont conduit à diminuer les coûts-réactifs, à simplifier la mise en plaque de culture cellulaire et la reconstitution des réactifs, diminuant ainsi les risques d'erreurs technique, et enfin à améliorer la standardisation du test en diminuant la variabilité des résultats.

Poursuivant notre démarche d'amélioration de la robustesse des résultats de TTL, nous avons évalué la possibilité d'utiliser des PBMCs congelées comme contrôle interne de qualité de l'analyse. Bien que les proportions de lymphocytes et des sous-populations lymphocytaires T CD3+, CD4+ et CD8+ soient stables au cours du temps, la viabilité des lymphocytes diminue progressivement et ce dès 50 jours après la congélation. En parallèle, la réponse proliférative des lymphocytes T est significativement diminuée dès 50 jours et quelle que soit la condition de stimulation, rendant impossible l'utilisation de PBMCs congelées comme CIQ.

Pourtant, plusieurs études montrent que la congélation des PBMC est possible pour l'évaluation de la réponse proliférative des lymphocytes. (50)(51). Une des hypothèses expliquant nos difficultés pourrait être la méthode de congélation utilisée. En effet, il est couramment décrit que les conditions de congélation (composition du milieu de congélation,

source des protéines, température de congélation) peuvent jouer sur la viabilité, la numération et la fonctionnalité des PBMCs. (52) Notamment, une limitation principale au laboratoire est l'impossibilité de congeler les cellules en azote liquide, seul un congélateur - 80°C étant disponible.

Une demande d'accréditation de l'analyse du TTL a été déposée auprès du COFRAC. Dans ce contexte, l'emploi d'un contrôle interne de qualité est fondamental. Les pistes pour pallier ce manque de CIQ et s'assurer des résultats de TTL sont les suivantes : améliorer les méthodes de congélation, conservation et décongélation des PBMC ou bien utiliser cette méthode pendant les 50 premiers jours de congélation pour que la différence des moyennes des réponses ne soient pas significativement différentes.

Une des retombées importantes de ce travail de thèse est que la simplification du protocole de TTL ouvre une possibilité de développer la technique pour de nouvelles indications. En effet, l'évaluation de la réponse immunitaire sur le versant cellulaire peut être utile dans le cadre d'infection ou de réponse vaccinale. Par exemple, dans le cadre de la COVID-19, le TTL a été modifié pour tester la réponse cellulaire T spécifique du SARS-CoV-2 chez des patients recevant des thérapeutiques déplaçant les lymphocytes B et chez qui la vaccination n'entraîne pas de séroconversion (traitement par cellules CAR-T ou Rituximab). De façon intéressante, la réponse cellulaire est un facteur important dans la prédiction de la sévérité du COVID-19 chez les patients vaccinés. (52) (53) (54) (55)

Une autre indication du TTL qui pourrait être développée au laboratoire est l'hypersensibilité de type IV (cf. I.B.2.c)) aux métaux (comme le mercure ou le zinc) (56) ou aux médicaments (buféxamac, glafénine, propacétamol, tétrazépam). (57) Cette réponse d'hypersensibilité implique l'activation des lymphocytes T et la prolifération des lymphocytes T mémoires. Elle peut être détectée par des tests *in vitro* (comme le TTL) ou des tests *in vivo* basés sur l'évaluation d'une réaction cutanée retardée (exemple : test de Montoux, patch test). (58) La plupart des diagnostics reposent sur l'historique des patients et la réalisation des tests cutanés, les tests *in vitro* (TTL) sont encore peu utilisés.

CONCLUSIONS GENERALES

THESE SOUTENUE PAR Mme ZAKARYA Elissa

Le test de prolifération lymphocytaire T (TTL) est une méthode d'étude *in vitro* de la fonctionnalité des lymphocytes T. Elle est utilisée en soins courants pour le diagnostic des déficits immunitaires héréditaires et le suivi des greffes de moelle osseuse. C'est une technique manuelle longue (résultat disponible après plusieurs jours de culture cellulaire), chronophage en temps technique et nécessitant du personnel très expérimenté. L'objectif principal de cette thèse était d'établir un état des lieux de cette analyse de biologie médicale au laboratoire d'immunologie cellulaire de l'hôpital Edouard Herriot (Hospices Civils de Lyon), en terme de nombre de tests réalisés, de ses indications cliniques et de ses performances techniques. A terme, l'objectif secondaire était d'optimiser sa réalisation dans le cadre du soin courant.

De 2015 à 2020, 726 TTL ont été réalisées. La prescription était en constante augmentation chaque année. La majorité des demandes provenaient des services de pédiatrie (diagnostic de déficit immunitaire, greffe de moelle osseuse). Les performances des différents stimulants et mitogènes (induisant la prolifération lymphocytaire) ont été étudiées. Il s'agissait de quatre mitogènes : phytohémagglutinine (PHA), concanavaline A, pokeweed ; un anticorps anti-CD3 monoclonal (OKT3) et trois antigènes : anatoxine tétanique, candidine, tuberculine. Concernant les mitogènes, la stimulation par la PHA et la concanavaline A donnaient des résultats redondants, ces mitogènes présentant des mécanismes d'action semblables sur les différentes voies de signalisation des lymphocytes T. Le pokeweed montrait une réponse proliférative de moindre intensité que celle de la PHA, entraînant une moindre sensibilité au dépistage d'un déficit de prolifération lymphocytaire T. Enfin, les lymphocytes T répondaient différemment à la PHA et l'OKT3, les deux mitogènes ayant des mécanismes d'action différents et fournissant donc des informations complémentaires sur la fonctionnalité des voies de signalisation. Concernant les stimulations antigéniques, l'utilisation systématique de différentes concentrations pour chaque antigène était redondante et n'apportait pas de plus-value à l'interprétation des résultats. En parallèle, la possibilité d'utiliser des cellules congelées de donneur sain comme contrôle interne de qualité (CIQ) a également été évalué pour cette analyse. Une diminution significative des réponses prolifératives des lymphocytes T était observée après

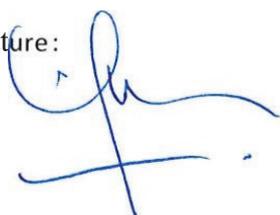
50 jours de congélation, rendant peu pertinente cette possibilité de CIQ dans le cadre d'une activité de routine hospitalière.

Suite à ce travail, le protocole de TTL a été simplifié au laboratoire : les stimulations par concanavaline et pokeweed ont été abandonnées, et seule la concentration la plus élevée de chaque antigène a été conservée. Ceci a permis de (i) diminuer les coûts réactifs, (ii) gagner du temps technique lors de la reconstitution des réactifs et de la mise en plaque de culture cellulaire et, (iii) augmenter le nombre de répliquats techniques pour chaque condition de stimulation retenue dans la nouvelle procédure (améliorant la standardisation du test).

En conclusion, ce travail de thèse a permis sur l'optimisation du protocole du test de prolifération lymphocytaire T utilisé en routine au laboratoire d'immunologie : simplification de la technique, diminution de la variabilité des résultats et diminution des coûts. Cette démarche est fondamentale pour toute analyse de biologie médicale soumise au processus d'accréditation guidé par la norme NF ISO 15189:2012. De plus elle permettra d'envisager le développement du TTL pour d'autres indications telles que l'exploration des hypersensibilités aux médicaments ou l'évaluation de la réponse immunitaire cellulaire post-infectieuse ou vaccinale.

Le Président de la thèse,
Nom : MONNERET

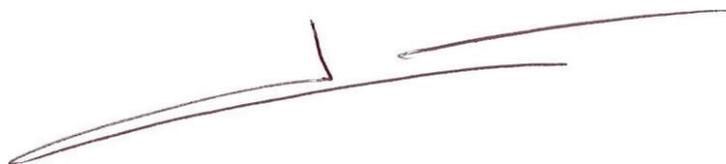
Signature:



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le
Vu, le Directeur de l'Institut des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de
Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard Lyon 1,

Professeur C. DUSSART



Bibliographie

1. Jouan Y, Si-Tahar M, Guillon A. Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation. *Médecine Intensive Réanimation* [En ligne]. 17 nov 2016. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s13546-016-1245-9>
2. Segura É, Amigorena S. Les cellules dendritiques inflammatoires. *Médecine/sciences* [En ligne]. Jan 2014;30(1):64-8. Disponible : <https://doi.org/10.1051/medsci/20143001015>
3. Jurgens AP, Popović B, Wolkers MC. T cells at work : How post-transcriptional mechanisms control T cell homeostasis and activation. *European Journal of Immunology* [En ligne]. 14 juil 2021;51(9):2178-87. Disponible : <https://doi.org/10.1002/eji.202049055>
4. Ministère de la Santé et des Services sociaux [En ligne]. Fonctionnement du système immunitaire - Immunologie de la vaccination - Professionnels de la santé - MSSS ; 2018. Disponible : <https://www.msss.gouv.qc.ca/professionnels/vaccination/piq-immunologie-de-la-vaccination/fonctionnement-du-systeme-immunitaire/>.
5. Kruisbeek AK. *Encyclopedia of Immunology* [En ligne]. 2e éd. Amsterdam : Division of Immunology, The Netherlands Cancer Institute ; 1998. T Lymphocytes ; p. 2334-41. Disponible : <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.0587>
6. Serrier J. Exploration in vitro de la réponse proliférative des lymphocytes T : mise en place de méthode et analyse de la réponse antigène spécifique [thèse de doctorat en ligne]. Caen : Université de Caen Normandie - Faculté de Pharmacie ; 2020. 113 p. Disponible : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03100136/document>
7. Lin K, Chen S, Chen G. Role of Memory T Cells and Perspectives for Intervention in Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology* [En ligne]. 14 sep 2015;6. Disponible : <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00473>.
8. Gallien A. Mémoire immunitaire- immunité adaptative : réponse primaire, réponse secondaire - Banque de Schémas - SVT - Académie de Dijon [En ligne] ; 19 fév 2013. Disponible : <http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/spip.php?article3082>
9. Jameson SC, Masopust D. Understanding Subset Diversity in T Cell Memory. *Immunity* [En ligne]. Fév 2018;48(2):214-26. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.02.010>
10. Inserm [En ligne]. De mémoire de lymphocyte... C'est quoi être immunisé ? · Inserm, La science pour la santé ; 19 juin 2020. Disponible : <https://www.inserm.fr/c-est-quoi/memoire-lymphocyte-c-est-quoi-etre-immunise/#:~:text=Être%20immunisé%20contre%20une%20maladie,tout%20ennemi%20posiblement%20en%20présence.>

11. Aguilar C. Prophylaxies anti-infectieuses au cours des Déficits Immunitaires Héréditaires : Recommandations CEREDIH. Dans : 14es Journées Nationales d'Infectiologie [En ligne] ; 12 juin 2013 ; Clermont-Ferrand, France. Disponible : <https://docplayer.fr/65132014-Prophylaxies-anti-infectieuses-au-cours-des-deficits-immunitaires-hereditaires-recommandations-ceredih.html>
12. Duche J, Barre J. Le test de transformation lymphocytaire (TTL) ou test de prolifération lymphocytaire (TPL) [En ligne]. Sep 2005. Conservé à : Documents pour le médecin du travail n°103. Disponible : <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=TC%20104>
13. Bading JR, Shields AF. Imaging of Cell Proliferation : Status and Prospects. Journal of Nuclear Medicine [En ligne]. 1 juin 2008;49(Suppl_2):64S—80S. Disponible : <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.046391>.
14. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, Okada S, Yamashita M, Yeh TW, Nishikomori R, Takagi M, Imai K, Ochs HD, Morio T. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. Allergology International [En ligne]. Jan 2018;67(1):43-54. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.06.003>
15. Goudouris ES. Immunodeficiencies : non-infectious manifestations. Jornal de Pediatria [En ligne]. Nov 2020. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.jped.2020.10.004>
16. Picard C. Comment explorer un déficit immunitaire héréditaire ? La revue du praticien [En ligne]. 15 oct 2007;57:1671-76. Disponible : <https://docplayer.fr/39185536-Comment-explorer-un-deficit-immunitaire-hereditaire.html>
17. Picard C, Pellier I. Pas A Pas Pédiatrie - Arbres décisionnels commentés des sociétés de pédiatrie [En ligne]. Évoquer et diagnostiquer un déficit immunitaire héréditaire ; 2017. Disponible : <https://pap-pediatrie.fr/hematologie/evoquer-et-diagnostiquer-un-deficit-immunitairehereditaire#:~:text=La%20NFS%20permet%20d'apprécier,des%20lignées%20érythrocytaires%20et%20plaquettaires>.
18. Weishaupt J. WebMD [En ligne]. What to Know About Secondary Immunodeficiency Disorders ? . Disponible : <https://www.webmd.com/hiv-aids/what-to-know-secondary-immunodeficiency-disorders>
19. CHUV - Service d'immunologie et d'allergie [En ligne]. Maladies immunodéficientes. Disponible : <https://www.chuv.ch/fr/ial/ial-home/patients-et-familles/immunodeficiences-primaires/maladies-immunodeficientes>
20. Ezzaitouni F, Thiyfa Y, Tahiri M, Haddad F, Hliwa W, Bellabah A, Badre W. Le déficit immunitaire commun variable à révélation tardive par des manifestations digestives : à propos

d'un cas. Pan African Medical Journal [En ligne]. 2017;28. Disponible : <https://doi.org/10.11604/pamj.2017.28.48.12049>.

21. Ministère de la Santé et de la Prévention [En ligne]. 11 vaccins obligatoires depuis 2018 – Ministère de la Santé et de la Prévention ; 7 nov 2017. Disponible : <https://sante.gouv.fr/prevention-en-sante/preserver-sa-sante/vaccination/vaccins-obligatoires/article/11-vaccins-obligatoires-depuis-2018#:~:text=L'extension%20à%2011%20vaccins,des%203%20vaccins%20actuellement%20obligatoires>

22. Castermans E, Hannon M, Drion P, Geenen V. Reconstitution du système immunitaire après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Revue Médicale de Liège [En ligne]. 2009;64:2-8. Disponible : <https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/33855/1/257.pdf>

23. Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire [En ligne]. 2012 Vaccinations post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques : Lesquels ? Quand ? Comment ?. Disponible : <https://www.sfgm-tc.com/harmonisation-des-pratiques/56-suivi-post-greffe/148-vaccinations-post-allogreffe-de-cellules-souches-hematopoiétiques-lesquels-quand-comment>

24. Serrier J, Charpy J, Cravat M, Le Mauff B, Leon A, Goret J, AllergoBioNet. Diagnostic de l'hypersensibilité retardée : des mécanismes immunologiques aux tests de diagnostic in vivo et in vitro. Revue Francophone des Laboratoires [En ligne]. Avril 2020 ;2020(521):52-62. Disponible : [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(20\)30128-3](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(20)30128-3)

25. Weill B. Introduction aux états d'hypersensibilité. Dans : Laboratoire d'immunologie - Faculté de médecine Cochin-Port Royal [En ligne] ; Paris, France. Disponible : https://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre16.htm

26. Ressources Numériques en Biologie [En ligne]. La régulation du cycle cellulaire : introduction générale. Disponible : https://rnbio.upmc.fr/bio-cell_cycle-cellulaire_introduction

27. Le Manuel MSD [En ligne]. STRUCTURE DE L'ADN. Disponible : <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/multimedia/figure/structure-de-ladn#:~:text=La%20molécule%20d'ADN%20est,les%20marches%20de%20l'escalier>

[ladn#:~:text=La%20mol%3%A9cule%20d'ADN%20est,les%20marches%20de%20l'escalier](https://www.msmanuals.com/fr/accueil/multimedia/figure/structure-de-ladn#:~:text=La%20mol%3%A9cule%20d'ADN%20est,les%20marches%20de%20l'escalier)

28. Cotten A. SVT Blaye [En ligne]. cides nucléiques & ; nucléotides. Disponible : <https://sites.google.com/site/svtblaye/cotten/ac2-0/chapitre-2---pour-en-savoir-plus>

29. Kleiveland C. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In : The Impact of Food Bioactives on Health : in vitro and ex vivo models. Springer, Cham (CH) [En ligne]. 2015. Disponible : <https://europepmc.org/article/NBK/nbk500157>

30. Flow Contract Site Laboratory [En ligne]. Peripheral Blood Mononuclear Cells. Disponible : <https://fcslaboratory.com/peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmc/>.
31. Carvalho EV, Oliveira WF, Coelho LC, Correia MT. Lectins as mitosis stimulating factors : Briefly reviewed. Life Sciences [En ligne]. Août 2018;207:152-7. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.06.003>
32. Geppert T. Phytohemagglutinin (PHA). Encyclopedia of Immunology [En ligne]. 2e éd ; 1952. Phytohemagglutinine (PHA) ; p. 1952-53.
33. Horii Y, Hhirano T. Encyclopedia of Immunology [En ligne]. 2e éd. Osaka University ; 1998. Pokeweed Mitogen (PWM) ; p. 1978-9. Disponible : <https://doi.org/10.1006/rwei.1999.049>
34. Tunnacliffe A. CD3. Dans: Encyclopedia of Immunology. Elsevier; 1998. p. 465-8.
35. Centre de Référence des Maladies auto-systémiques rares de l'île-de-France, filière FAI2R. MATHEC [En ligne]. Vaccinations et autogreffe ; jan 2019. Disponible : https://www.mathec.com/wp-content/uploads/2019/01/Vaccinations-et-autogreffe_MATHECSFGMTC.pdf
36. Damiens S. Les médiateurs de l'immunité anti-Candida : outils d'analyse physiopathologique et intérêt diagnostique [thèse de doctorat en ligne]. Lille : L'UNIVERSITE DE LILLE 2 ; 2012. 119 p. Disponible : <https://theses.hal.science/tel-01060934/file/2012LIL2S028.pdf>
37. Scheffold A, Bacher P, LeibundGut-Landmann S. T cell immunity to commensal fungi. Current Opinion in Microbiology [En ligne]. Déc 2020;58:116-23. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.09.008>
38. Poujol F, Monneret G, Friggeri A, Rimmelé T, Malcus C, Poitevin-Later F, Pachot A, Lepape A, Textoris J, Venet F. Flow cytometric evaluation of lymphocyte transformation test based on 5-ethynyl-2'deoxyuridine incorporation as a clinical alternative to tritiated thymidine uptake measurement. Journal of Immunological Methods [En ligne]. Déc 2014;415:71-9. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.10.006>
39. Galazka AM. Les bases immunologiques de la vaccination I Module 3 : Le tétanos [En ligne]. Genève : Programme élargi de vaccination - Organisation Mondiale de la Santé ; 1993. 29 p. Disponible : <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/60537/WHO-EPI-GEN-93.13-mod3-fre.pdf>
40. Zafrani L, Monneret G. Comprendre la cytométrie en flux. Médecine Intensive Réanimation [En ligne]. 2017;26:517-22. Disponible : <https://rea.revuesonline.com/articles/lvrea/pdf/2017/07/lvrea266p517.pdf>

41. BICeL - BICEL de l'Université de Lille [En ligne]. Cytométrie en Flux - BICEL de l'Université de Lille. Disponible : <https://bicel.univ-lille.fr/cytometrie-en-flux>
42. Cavanagh BL, Walker T, Norazit A, Meedeniya AC. Thymidine Analogues for Tracking DNA Synthesis. *Molecules* [En ligne]. 15 sep 2011;16(9):7980-93. Disponible : <https://doi.org/10.3390/molecules16097980>
43. Biotech Company with Research & ; Histology Services | Creative Bioarray [En ligne]. CFSE Cell Proliferation Assay - Creative Bioarray | Creative Bioarray. Disponible : <https://www.creative-bioarray.com/cfse-cell-proliferation-assay.htm>
44. Quah BJ, Parish CR. New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *Journal of Immunological Methods* [En ligne]. Mai 2012;379(1-2):1-14. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.jim.2012.02.012>
45. Stempels FC, de Wit AS, Swierstra MS, Maassen S, Bianchi F, van den Bogaart G, Baranov MV. A sensitive and less cytotoxic assay for identification of proliferating T cells based on bioorthogonally-functionalized uridine analogue. *Journal of Immunological Methods* [En ligne]. Mars 2022;502:113228. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113228>
46. Marits P, Wikström AC, Popadic D, Winqvist O, Thunberg S. Evaluation of T and B lymphocyte function in clinical practice using a flow cytometry based proliferation assay. *Clinical Immunology* [En ligne]. Août 2014;153(2):332-42. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.05.010>
47. Giroud C, Arnaud J, Adjidé V, Vassault A, les membres du sous-groupe 2 analytique. Contrôle interne de qualité. *Annales de Biologie Clinique*. 2010;68(1):203. Disponible : http://qualite.labomaisonblanche.fr/base%20doc/docexternes/sfbc/SG2-03.Controle_interne_qualite.pdf
48. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine* [En ligne]. Juin 2016;15(2):155-63. Disponible : <https://doi.org/10.1016/j.jcm.2016.02.012>
49. Mahlaoui N. Filière de santé Maladies Rares Immuno-Hématologiques. Dans : Centre de Référence Déficits Immunitaires Héritaires Hôpital Universitaire Necker-Enfants malades ; Paris, France, 2018.
50. Barcelo H, Faul J, Crimmins E, Thyagarajan B. A Practical Cryopreservation and Staining Protocol for Immunophenotyping in Population Studies. *Current Protocols in Cytometry* [En ligne]. Avril 2018;84(1). Disponible : <https://doi.org/10.1002/cpcy.35>

- 51.** Lauer FT, Denson JL, Burchiel SW. Isolation, Cryopreservation, and Immunophenotyping of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Current Protocols in Toxicology* [En ligne]. Nov 2017;74(1). Disponible : <https://doi.org/10.1002/cptx.31>
- 52.** Nazarpour R, Zabihi E, Alijanpour E, Abedian Z, Mehdizadeh H, Rahimi F. Optimization of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Cryopreservation. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine* [En ligne]. 1 avril 2012;1(2):88. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920500/>.
- 53.** Monneret G, Benlyamani I, Gossez M, Bermejo-Martin JF, Martín-Fernandez M, Sesques P, Wallet F, Venet F. COVID-19 : What type of cytokine storm are we dealing with ? *Journal of Medical Virology* [En ligne]. 27 juil 2020 ;93(1):197-8. Disponible : <https://doi.org/10.1002/jmv.26317>
- 54.** Levavi H, Lancman G, Gabrilove J. Impact of rituximab on COVID-19 outcomes. *Annals of Hematology* [En ligne]. 22 sep 2021. Disponible : <https://doi.org/10.1007/s00277-021-04662-1>
- 55.** Bidar F, Monneret G, Berthier F, et al. Lack of SARS-CoV-2-specific cellular response in critically ill COVID-19 patients despite apparent effective vaccination. *Crit Care* [En ligne]. 8 juin 2022;26(170). Disponible : <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-022-04038-5>
- 56.** Fortier M. Réponse immunitaire des lymphocytes murins exposés à des métaux lourds [Mémoire accepté en ligne]. [lieu inconnu : maison d'édition inconnue] ; 2006. Disponible : <http://www.archipel.uqam.ca/1732/1/M9254.pdf>
- 57.** Jean François N. Actualités en allergologie – Hypersensibilité aux médicaments. *Revue du praticien* [En ligne]. Sep 2015;65(3):176-7. Disponible : https://allergolyon.fr/wp-content/uploads/2020/04/Hypersensibilitee_Medicaments-Nicolas-2015-Revue_Pratt.pdf.
- 58.** Sabbah A, Menard E, Pineau J. Test de transformation lymphoblastique appliqué au diagnostic de l'hypersensibilité médicamenteuse et bactérienne. Interprétation isotopique et morphologique. *Revue Française d'Allergologie* [En ligne]. Juil 1972;12(3):251-67. Disponible : [https://doi.org/10.1016/s0035-2845\(72\)80005-2](https://doi.org/10.1016/s0035-2845(72)80005-2)

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

ZAKARYA Elissa

ETAT DES LIEUX DU TEST DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE T AU LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE DE L'HOPITAL EDOUARD HERRIOT ET AMELIORATION DES PRATIQUES

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2023, 80 p.

RESUME

Contexte. Le test de prolifération lymphocytaire T (TTL) est une méthode d'étude des fonctions des lymphocytes T mesurant leur prolifération après stimulation *in vitro*. Au laboratoire d'immunologie de l'hôpital Edouard Herriot (Hospices Civils de Lyon), ce test est indiqué dans la recherche des déficits immunitaires primitifs et le suivi de la reconstitution immunitaire des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse. C'est une technique manuelle, longue, couteuse et qui nécessite des opérateurs expérimentés.

Objectif. Le but de cette thèse était de réaliser un état des lieux des pratiques autour du test de prolifération lymphocytaire T afin de simplifier et d'améliorer la technique.

Méthode. L'ensemble des demandes de TTL reçues au laboratoire entre 2015 et 2020 ont été analysées. Les résultats dans les différentes conditions de stimulation par mitogènes (phytohémmagglutinine, anti-CD3 OKT3, concanavaline A, pokeweed mitogen) et antigènes (tuberculine, anatoxine tétanique, candidine) ont été comparés. La possibilité d'utiliser des cellules mononuclées du sang (PBMC) issues d'un donneur sain comme contrôle interne de qualité de cette analyse a été évaluée en mesurant la prolifération et le phénotype des lymphocytes T congelés pendant un an.

Résultats. 726 TTL ont été analysés. Les résultats de TTL étaient concordants après stimulation par phytohémmagglutinine et concanavaline A, ces deux mitogènes agissant par des mécanismes intracellulaires similaires, contrairement à l'OKT3. La réponse proliférative au pokeweed mitogen était moins importante que celle à la phytohémmagglutinine, rendant le test moins sensible au dépistage d'un éventuel déficit de prolifération lymphocytaire T. L'utilisation systématique de différentes concentrations pour chaque antigène et mitogène était redondante et n'apportait pas de plus-value à l'interprétation des résultats. Ainsi, l'utilisation de la concanavaline et du pokeweed a été abandonnée, et seule la concentration la plus élevée de chaque stimulant a été conservée.

Enfin, l'étude des PBMC congelées a montré que, bien que les proportions de lymphocytes T CD3⁺, CD4⁺ et CD8⁺ étaient stables au cours du temps, leur viabilité diminuait progressivement et dès 50 jours après la congélation. En parallèle, la réponse proliférative des lymphocytes T était significativement diminuée dès 50 jours après la congélation et quelle que soit la condition de stimulation, rendant peu pertinente l'utilisation de cellules congelées comme CIQ dans le cadre d'une activité de routine hospitalière.

Conclusion. Ce travail a mené à la simplification du protocole du test de prolifération lymphocytaire T en diminuant le nombre de conditions de stimulation. Ceci a permis de diminuer les coûts réactifs, gagner du temps technique et améliorer la standardisation des résultats en augmentant le nombre de réplicats techniques pour chaque condition de stimulation. Cette démarche d'optimisation des protocoles des analyses en biologie médicale est fondamentale pour les laboratoires soumis au processus d'accréditation guidé par la norme NF ISO 15189 :2012, et permet d'envisager le développement du TTL au laboratoire pour d'autres indications cliniques telles que l'exploration des hypersensibilités médicamenteuses ou l'évaluation de la réponse immunitaire cellulaire post-infectieuse ou vaccinale.

MOTS CLES Test de prolifération lymphocytaire T, optimisation technique, PBMC congelés, NF ISO 15189 :2012

JURY

M. MONNERET Guillaume, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Mme GOSSEZ-COULAUD Morgane, Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier
Mme POITEVIN-LATER, Françoise, Praticien Hospitalier
Mme SENTIS Stéphanie, Maître de Conférence des Universités

DATE DE SOUTENANCE : Lundi 13 février 2023

CONTACT elissa.zakarya@etu.univ-lyon1.fr (morgane.gossez-coulaud@chu-lyon.fr)