Exploration in vitro de la réponse prolifératives des lymphocytes T : mise en place de méthode et analyse de la réponse antigène spécifique

Julien Serrier

▶ **To cite this version:**

Julien Serrier. Exploration in vitro de la réponse prolifératives des lymphocytes T : mise en place de méthode et analyse de la réponse antigène spécifique. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03100136

HAL Id: dumas-03100136

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03100136

Submitted on 6 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

U.F.R. Santé

Faculté des Sciences Pharmaceutiques

THESE

(Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Conditionne l'entrée en phase 3 « dite de consolitation » sous réserve de la validation de la phase 2 de la maquette du DES suivi

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Exploration *in vitro* de la réponse proliférative des lymphocytes T : mise en place de méthode et analyse de la réponse antigène spécifique

Présentée par

Julien SERRIER

Soutenue publiquement le 31/08/2020
devant le jury composé de

Pr Michel BOULOUARD	Pharmacien, PU, UFR Santé Caen,	Président du jury
Pr Brigitte LE MAUFF	Médecin, PU-PH, UFR Santé Caen, Laboratoire d'immunologie CHU de Caen	Directeur
Dr Erwan DUMONTET	Médecin, Praticien hospitalier, Laboratoire d'immunologie, CHU de Rennes	Examinateur
Dr Delphine MARIOTTE	Pharmacien, Praticien hospitalier, Laboratoire d'immunologie, CHU de Caen	Examinateur

Thèse dirigée par le Professeur Brigitte Le Mauff

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel ..... Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan ..... Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie ..... Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick..... Chimie médicinale
DAUPHIN François..... Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël ..... Chimie analytique
FABIS Frédéric..... Chimie organique
FRERET Thomas..... Physiologie, Pharmacologie
GARON David..... Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe ..... Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie..... Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe ..... Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale ..... Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François..... Toxicologie
SOPKOVA Jana..... Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie ..... Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR..... Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR..... Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR..... Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR..... Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne..... Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR..... Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire..... Pharmacie galénique
KIEFFER Charline ..... Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) **– HDR**..... Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine..... Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR..... Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR..... Toxicologie
LEGER Marianne..... Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR..... Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique..... Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni ..... Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima..... Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah..... Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR..... Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme ..... Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe ..... Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc ..... Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR..... Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

PRICOT Sophie ..... Anglais

PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume..... Pharmacie clinique
SEDILLO Patrick ..... Pharmacie officinale
RICHARD Estelle..... Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Remerciements

Aux membres du jury,

Tout d'abord, j'exprime ma gratitude aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail.

Je remercie sincèrement le Pr Michel Boulouard d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Un grand merci au Pr Brigitte Le Mauff pour la direction de cette thèse, pour les heures de correction, pour ses précieux conseils, pour son sens du détail, pour l'encadrement que j'ai reçu dès mon arrivée au laboratoire d'immunologie et pour me pousser à continuer dans cette voie.

Je remercie le Dr Erwan Dumontet d'avoir fait le déplacement depuis Rennes et pour son œil extérieur sur mon travail.

Merci au Dr Delphine Mariotte. Pour sa relecture, ses suggestions avisées, pour son sens de l'esthétisme dans la rédaction du manuscrit, car comme disait Dostoïevski : « la beauté sauvera le monde ».

A ma famille,

Je remercie mes parents et mes grands-parents pour le soutien qu'ils m'ont apporté et pour m'avoir permis de réaliser ces longues années d'études (et ce n'est pas fini). Malgré la distance, vous avez toujours été là pour moi.

A Laurie,

Merci de m'avoir soutenu et supporté pendant ce confinement qui m'a permis d'écrire cette thèse en un temps record. Ces semaines coupées du monde et du soleil m'ont paru beaucoup moins longues à tes côtés.

A mes co-internes,

A ceux de la première heure, Alex pour l'originalité de tes jeux de mots sur la ville de Caen et Flora, pour la finesse de tes blagues au restaurant. Aux autres internes que j'ai pu côtoyer à Caen.

A mes amis,

Au Dr Nick'Olé André, le DJ au peignoir et charentaises, товарищ ou plutôt *tasama* comme on dit chez toi. Je te sais amateur de produits du terroir et j'espère te faire découvrir au travers de cette thèse les propriétés extraordinaires du liquide amniotique de vache. Au futur Dr Vincent « Pepito » Montero, je réserve déjà ma place et mon plus beau sombrero pour ta soutenance. A Emeline, mon GPS de voyage dyslexique. A mes colocs, Carole, Laure, Hugues qui entendent parler de ma thèse depuis un moment déjà. A mes amis de longue date, Cyril, Micka, Antoine et à ceux que j'oublie…

A toute l'équipe du laboratoire d'immunologie du CHU de Caen,

Merci à Olivier d'avoir bien voulu relire ce travail à la dernière minute. Brigitte pour tes conseils en cytométrie, dans la mise en place de la technique de prolifération lymphocytaire et pour la réalisation du test d'activation des basophiles. Aux autres, merci pour la bonne ambiance au laboratoire et pour entretenir ma glycémie tous les jours à la pause-café.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS **1**

LISTE DES FIGURES **3**

LISTE DES TABLEAUX **5**

AVANT-PROPOS **6**

INTRODUCTION **8**

I Le récepteur des lymphocyte T (TCR) ***8***

I.1 La molécule de TCR 8

I.2 Réarrangement des gènes du TCR et variabilité 9

II Le développement des lymphocytes T αβ ***10***

III Répartition des lymphocytes T ***11***

IV Activation des lymphocytes T : ***11***

IV.1 La synapse immunologique 12

V Différenciation des lymphocytes T ***18***

V.2 Différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4 21

V.3 Différenciation des lymphocytes T CD8 25

VI Exploration de la réponse T, tests in vitro ***27***

VI.1 Evaluation de la réponse proliférative : le test de prolifération lymphocytaire (TPL) 27

VI.2 Evaluation de l'activité fonctionnelle 31

VII Applications diagnostiques du test de prolifération lymphocytaire ***33***

VII.1 Diagnostic des déficits immunitaires primaires 33

VII.2 Suivi des produits d'aphérèse de photochimiothérapie extracorporelle (PCE) 37

VII.3 Suivi d'une greffe de « cellules souches hématopoïétiques » 42

VII.4 Diagnostic des hypersensibilités retardées (HSR) 43

VIII Article : « Diagnostic de l'hypersensibilité retardée : des mécanismes immunologiques aux tests de diagnostic in vivo et in vitro ». ***44***

IX Diagnostic biologique d'une dermatite de contact aux protéines du liquide amniotique de vache, à propos d'un cas ***55***

IX.1 La dermatite de contact aux protéines de liquide amniotique de vache 55

IX.2 Explorations cliniques 56

IX.3 Explorations biologiques 57

OBJECTIFS DU TRAVAIL 59

MATERIEL ET METHODE 60

I Test de prolifération lymphocytaire pour le suivi des produits d'aphérèse de PCE 60

I.1 Préparation du milieu de culture 61

I.2 Isolement des cellules mononucléées.....61

I.3 Culture 62

I.4 Marquages et acquisition et analyse en cytométrie 63

I.5 Critères d'analyse.....65

II Test de prolifération lymphocytaire adapté pour le diagnostic d'une dermite de contact aux protéines de liquide amniotique de vache 66

III Test d'activation des basophiles..... 66

RESULTATS 69

I Prolifération des cellules post-PCE 69

I.1 Validation de méthode.....70

I.2 Résultats des patients 76

II Réponse in vitro au liquide amniotique de vache..... 82

II.1 Test de prolifération lymphocytaire 82

II.2 Résultats du test d'activation des basophiles 83

DISCUSSION 84

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 89

BIBLIOGRAPHIE 91

Liste des abréviations

7-AAD : 7-Aminoactinomycine D
8-MOP : 8-méthoxysporalen
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament
BCG : Bacille de Calmette-Guérin
BCR : Récepteur des lymphocytes B
BrdU : Bromodéoxyuridine
CDR : Complementary determining region
CEREDIH : Centre de référence déficit immunitaire héréditaires
CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMF : Cytométrie en flux
CMH : Complexe majeur d'histiocompatibilité
ConA : Concanavaline A
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CTL : Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DAG : Diacylglycérol
DMSO : Dyméthylsulfoxyde
EdU : 5-ethynyl-2'deoxyuridine
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot : Enzyme-linked immunospot
Fas-L : Fas ligand
FDA : Food and drug administration
FITC : Isothiocyanate de fluorescéine
fMLP : N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalaline
GDP : Guanosine diphosphate
GTP : Guanosine triphosphate
GVH : Maladie du greffon contre l'hôte
HSR : Hypersensibilité retardée
ICOS : Inductible T-Cell costimulatory
IFN : Interferon
IGRA : Interferon gamma release assay

IKK : IκB kinase

ICAM : Intracellular adhesion molecule

IL : Interleukine

IRSN : Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire

ITAM : Immunoreceptor-based tyrosine based activation motif

ILC : Innate lymphoïd cells

NFATc : Nuclear factor of activated T-Cells

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural killer

PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique

PCE : Photochimiothérapie extracorporelle

PHA : Phytohémagglutinine A

PMA-Iono : Phorbol 12-myristate 13-acetate - Ionomycine

PNP : Purine nucleoside phosphorylase

RMRP : Ribonuclease mitochondrial RNA processing gene

SAB : Sérum AB humain

SMAC : Supra molecular activation cluster

SVF : Sérum de veau foetal

TAB : Test d'activation des basophiles

Tcm : T centraux mémoires

TCR : T Cell Receptor

Tem : T effecteurs mémoires

TGF : Transforming growth factor

T_H : T helper

TNF : Tumor necrosis factor

TPL : Test de prolifération lymphocytaire

Treg : T régulateurs

Trm : T résidents mémoires

TTL : Test de transformation lymphoblastique

UVA : Ultraviolet A

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

α-Gal : Galactose-α-1,3-galactose

Liste des Figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION DES SOUS-UNITES DU COMPLEXE TCR A/B 8
FIGURE 2 : SCHEMA SIMPLIFIE DU DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES TCR AB DANS LE THYMUS 10
FIGURE 3 : ORGANISATION DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE, PHENOMENE DYNAMIQUE (FIN D'INTERACTION) 13
FIGURE 4 : STRUCTURE DU TCR ET LIAISON AU COMPLEXE CMH/PEPTIDE 14
FIGURE 5 : VOIES DE SIGNALISATIONS INDUITES PAR L'ACTIVATION DU TCR MENANT A LA PRODUCTION DE CYTOKINES ET A LA PROLIFERATION CELLULAIRE 16
FIGURE 6 : INTERACTIONS ENTRE PLUSIEURS COUPLES DE MOLECULES CO-STIMULATRICES OU CO-INHIBITRICES 17
FIGURE 7 : CINETIQUE DE LA REPONSE DES LYMPHOCYTES T 19
FIGURE 8 : PRINCIPALES POPULATIONS DE LT CD4 EFFECTEURS 21
FIGURE 9 : SOUS POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T REGULATRICES 25
FIGURE 10 : PRINCIPAUX MECANISMES DE CYTOTOXICITE DES LYMPHOCYTES T CD8 26
FIGURE 11 : DETECTION DE L'EDU PAR L'ALEXAFLUOR AZIDE ET DETECTION DU BRDU AVEC UN ANTI-BRDU ... 29
FIGURE 12 : EXPRESSION DU CFSE APRES 4 JOURS DE CULTURE SANS STIMULATION ET AVEC STIMULATION PAR LA PHYTOHEMAGGLUTININE A. 30
FIGURE 13 : ARBRE DECISIONNEL DES EXAMENS COMPLEMENTAIRES DEVANT UNE SUSPICION DE DEFICITS IMMUNITAIRE PRIMAIRE 35
FIGURE 14 : APPAREIL UVAR XTSTM, THERAKOS® 40
FIGURE 15 : APPAREILLAGE THERAFLEX®, ECP 41
FIGURE 16 : STRATEGIE DE REALISATION DES TESTS DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE DANS LE CAS D'UNE GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES 42
FIGURE 17 : ISOLEMENT DES CELLULES MONONUCLEEES DU SANG PERIPHERIQUE PAR GRADIENT DE FICOLL . 61
FIGURE 18 : STRATEGIE D'ANALYSE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE : TEMOIN APRES 4 JOURS DE CULTURE 64
FIGURE 19 : STRATEGIE D'ANALYSE DE LA VIABILITE CELLULAIRE : TEMOIN APRES 4 JOURS DE CULTURE 65
FIGURE 20 : STRATEGIE D'ANALYSE DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES 68
FIGURE 21 : INTENSITE DE MARQUAGE AU CFSE POUR UN TEMOIN ET UN PATIENT PRE ET POST-PCE AVEC OU SANS STIMULATION PAR LA PHA 69
FIGURE 22 : VIABILITE DES LYMPHOCYTES TOTAUX SANS OU AVEC MARQUAGE AU CFSE. 70
FIGURE 23 : DETERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE DU NOUVEAU LOT DE PHA DETERMINEE PAR LA PROLIFERATION A 4 JOURS. 71
FIGURE 24 : INTENSITE DE MARQUAGE AU CFSE OBTENUE A PARTIR DE PBMC ISOLEES PAR CENTRIFUGATION SUR GRADIENT DE FICOLL OU PAR CHLORURE D'AMMONIUM APRES STIMULATION PAR LA PHA. 72
FIGURE 25 : INHIBITION DE LA PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T PAR LA PCE APRES 4 JOURS DE CULTURE 78

FIGURE 26 : POURCENTAGES D'INHIBITION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES POST-PCE. COMPARAISON AUX SEUILS POUR VALIDER LA PCE 78
FIGURE 27 : PROPORTION DE CELLULES CD3+, 7AAD- CORRESPONDANT AUX LYMPHOCYTES T VIABLES POUR UN TEMOIN ET UN PATIENT PRE ET POST-PCE AVEC OU SANS STIMULATION PAR LA PHA APRES 4 JOURS DE CULTURE. 79
FIGURE 28 : DIMINUTION DE LA VIABILITE DES LYMPHOCYTES T PAR LA PCE A J4 81
FIGURE 29 : INDEX DE STIMULATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION PROTEIQUE DE LIQUIDE AMNIOTIQUE DE VACHE 82

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PHENOTYPE DES PRINCIPALES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T MEMOIRES CHEZ L'HUMAIN 20
TABLEAU 2 : RESULTATS ATTENDUS DU TEST DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE EN FONCTION DU TYPE DE DEFICIT IMMUNITAIRE 36
TABLEAU 3 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES DIFFERENTS SYSTEMES DE PCE DISPONIBLES 41
TABLEAU 4 : CLINIQUE ET EXPLORATIONS EFFECTUEES LORS DE LA PREMIERE CONSULTATION POUR LE PATIENT AVEC SUSPICION DE DERMITE DE CONTACT AU LIQUIDE AMNIOTIQUE DE VACHE 58
TABLEAU 5 : INFORMATIONS CONCERNANT LES PATIENTS, SEXE, AGE ET MALADIE 60
TABLEAU 6 : COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS A PARTIR DE PBMC ISOLEES PAR CENTRIFUGATION SUR GRADIENT DE FICOLL OU PAR CHLORURE D'AMMONIUM 72
TABLEAU 7 : RESULTATS DES TEMOINS 73
TABLEAU 8 : REPETABILITE DU TPL EFFECTUE 5 FOIS AVEC 5 MARQUAGES INDEPENDANTS POUR UN DONNEUR 73
TABLEAU 9 : REPRODUCTIBILITE DU TPL EFFECTUEE SUR DES PBMC FRAICHEMENT ISOLEES D'UN MEME TEMOIN OU SUR DES PBMC CONGELEES ISSUES D'UNE MEME POCHE DE SANG D'UN TEMOIN 74
TABLEAU 10 : MESURE DE LA STABILITE APRES CONSERVATION 24H AVANT CULTURE 75
TABLEAU 11 : POURCENTAGES DE PROLIFERATION PRE/POST PCE ET POURCENTAGES D'INHIBITION APRES 4 JOURS DE CULTURE 76
TABLEAU 12 : COMPARAISON DE LA VIABILITE DES CELLULES PRE/POST PCE APRES CULTURE AVEC OU SANS STIMULATION PAR LA PHA 80
TABLEAU 13 : RESULTATS DU TEST DE PROLIFERATION LYMPHOCYTAIRE POUR LE PATIENT 82
TABLEAU 14 : RESULTATS DU TEST D'ACTIVATION DES BASOPHILES. POLYNUCLEAIRES BASOPHILES MIS EN CONTACT AVEC 4 CONCENTRATIONS PROTEIQUES DE LIQUIDE AMNIOTIQUE DE VACHE 83
TABLEAU 15 : DESCRIPTION ET AVANCEE DU PROCESSUS DE VALIDATION DE METHODE SELON LE DOCUMENT SH FORM 43 84

Avant-Propos

Le système immunitaire constitue un ensemble de mécanismes par lesquels le corps humain maintient sa propre intégrité, son homéostasie et sa fonctionnalité. Il discrimine le soi du non soi et permet la lutte contre les pathogènes aussi bien exogènes (infectieux) qu'endogènes (générés par l'organisme). On individualise deux types de réponses, l'immunité innée, naturelle et l'immunité adaptative ou spécifique.

La réponse engagée par l'immunité innée est non spécifique du facteur déclenchant. Elle repose sur l'activation de protéines du complément, cytokines, protéines de l'inflammation. Elle inclue aussi des mécanismes cellulaires dont les acteurs sont les granulocytes (polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles), les mastocytes, les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et certaines cellules lymphoïdes telles que les lymphocytes NK (Natural Killer), NKT (Natural killer T), Tγδ et les cellules lymphoïdes innées (ILC). L'immunité innée comprend aussi la production de molécules responsables de l'inflammation permettant le recrutement de nouvelles cellules immunitaires qui amplifient à leur tour la réponse. L'immunité innée permet de combattre les infections rapidement durant le délai de la mise en place de l'immunité adaptative.

L'immunité innée n'est pas toujours suffisante et un second type de réponse immunitaire s'est développée au cours de l'évolution, l'immunité adaptative apparue il y a 500 millions d'années chez les vertébrés. Elle permet de produire une réponse spécifique dirigée contre un antigène grâce à des cellules spécialisées, les lymphocytes B et T. Cette réponse permet aussi de garder une mémoire vis-à-vis de l'antigène et sera réactivée en cas de nouveau contact avec celui-ci. La spécificité d'un lymphocyte pour un antigène est déterminée par la présence d'un immunorécepteur qui reconnait un antigène donné. Il y a peu de cellules spécifiques d'un même épitope et l'ensemble des lymphocytes d'un individu qui reconnaissent une multitude d'antigènes forme le répertoire immunologique. Un lymphocyte est naïf jusqu'à ce qu'il soit activé lors de sa rencontre avec l'antigène. Celle-ci s'effectue lors du contact direct de l'antigène avec le récepteur des lymphocytes B (BCR) ou lors sa présentation sous forme de peptide par une cellule présentatrice d'antigène (CPA) reconnu par le récepteur des lymphocytes T (TCR) αβ. La CPA peut être une cellule dendritique, un monocyte, un macrophage, un lymphocyte B. L'activation d'un lymphocyte entraîne sa

prolifération et sa différenciation fonctionnelle. Pour le lymphocyte B, son activation entraîne sa transformation en plasmocyte qui est la cellule spécialisée dans la production d'anticorps. Les lymphocytes T activés auront une action cytotoxique cellulaire en détruisant directement les cellules infectées ou bien auxiliaire en favorisant l'activation d'autres cellules immunitaires ou en potentialisant leur action (production de cytokines…).

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) constituent une population lymphocytaire ayant la propriété de réguler la réponse immunitaire. Cela leur confère un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie. Ils sont impliqués dans les mécanismes de tolérance périphérique.

Le système immunitaire peut présenter des déficits (constitutifs ou acquis) ou se dérégler. Parmi les dysfonctions, il peut être observé une réponse anormale dirigée contre le soi appelée auto-immunité. Bien qu'il existe des mécanismes qui mettent en jeu certaines populations cellulaires permettant de prévenir ce type de réactions (ex : Treg), leur action n'est pas toujours suffisante et diverses pathologies peuvent en résulter (connectivites, maladies auto-immunes spécifiques d'organes…).

Les phénomènes d'hypersensibilité constituent une deuxième forme de dérèglement du système immunitaire. Dans l'hypersensibilité, on observe une réponse exagérée vis-à-vis d'antigènes. La classification de Gell et Coombs [1] individualise quatre types d'hypersensibilité. Le type I est l'allergie immédiate, liée aux IgE. Les types II et III sont liés aux IgG avec des mécanismes cytotoxiques ou liés aux complexes immuns. Enfin, le type IV constitue les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) impliquant des mécanismes cellulaires et cytotoxiques.

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la réponse engagée par les lymphocytes T pouvant être évaluée *in vitro*. Cette exploration répond à plusieurs enjeux en routine hospitalière de biologie médicale. Mon travail s'est focalisé sur la validation de méthode d'un test évaluant la capacité de prolifération des lymphocytes T en réponse à divers stimuli : le test de prolifération lymphocytaire (TPL). Parmi ses multiples applications, nous avons choisi de l'utiliser pour valider les contrôles d'illumination dans le suivi des produits d'aphérèses de photochimiothérapie extracorporelle (PCE). Cette technique a également été utilisée comme technique d'exploration *in vitro* pour le diagnostic de l'HSR en complément des tests cutanés.

Introduction

La première étape menant à l'activation et à la prolifération cellulaire du lymphocyte T est la liaison via son récepteur, le TCR, à l'antigène apporté par la cellule présentatrice d'antigène. Cette liaison va entraîner une multitude de modifications structurales et fonctionnelles du lymphocyte T qui vont aboutir à sa différenciation.

I Le récepteur des lymphocyte T (TCR)

I.1 La molécule de TCR

Le TCR est une molécule hétérodimérique de la superfamille des immunoglobulines constituée de deux sous unités qui sont dans 95% des cas α/β (Figure 1) et dans 5% des cas γ/δ.

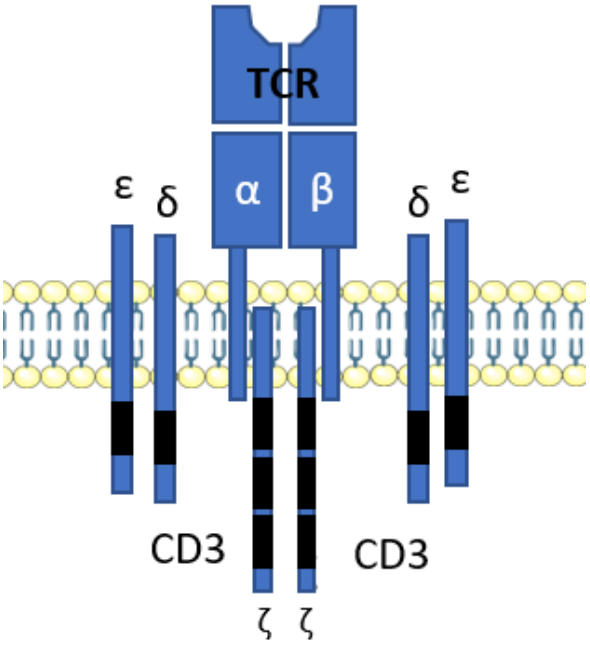


Figure 1 : Représentation des sous-unités du complexe TCR α/β

Chaque molécule de TCR a un poids moléculaire compris entre 40 et 50kD et comporte trois portions :

- Une portion extra-cellulaire
- Une portion transmembranaire
- Une portion intracytoplasmique

Dans la portion extracellulaire, on retrouve une région constante et une région variable, comportant elle-même trois régions hypervariables ou régions de détermination de la complémentarité (CDR1, CDR2 et CDR3).

La région transmembranaire va permettre la stabilisation du TCR via ses interactions avec les chaînes γ, δ, ε et ζ du complexe CD3 [2].

Les TCR γ/δ reconnaissent des antigènes non peptidiques et cette reconnaissance se fait indépendamment du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [3].

Les TCR γ/δ ne seront pas abordés dans la suite de cette thèse.

I.2 Réarrangement des gènes du TCR et variabilité

Afin de générer un large répertoire d'antigène, il existe des mécanismes partagés avec les lymphocytes B qui reposent sur des réarrangements génétiques.

La diversité combinatoire est relative au réarrangement (ou recombinaison) des gènes VJ et VDJ codant pour les parties variables. Elle est sous contrôle des protéines RAG-1 et RAG-2 et permet de créer une grande diversité de TCR. A la diversité combinatoire des TCR s'ajoute une diversité jonctionnelle consistant à l'ajout ou au retrait de nucléotides au niveau des zones de recombinaison.

Indépendamment des mécanismes de réarrangements génétiques, il existe également une diversité d'association consistant en l'appariement aléatoire des chaînes α/β. L'ensemble de ces mécanismes permet d'obtenir plusieurs milliards de TCR différents. Le répertoire des lymphocytes T comprendrait théoriquement entre 2,5 x 10^7 et 10^{20} TCR pour les estimations les plus larges [4].

Pour les régions de détermination de la complémentarité, la variabilité de CDR1 et CDR2 est héritée génétiquement tandis que la variabilité de CDR3, générée par les recombinaisons, est principalement acquise lors de la maturation des lymphocytes T [5].

II Le développement des lymphocytes T αβ

Les lymphocytes T se développent à partir d'une population de cellules souches hématopoïétiques qui migrent de la moelle osseuse vers le thymus et expriment les marqueurs $CD34^+$ et $CD38^{low}$ [6]. Ces cellules sont les précurseurs des lymphocytes T et NK mais aussi de certaines cellules dendritiques (Figure 2). Lors de son entrée dans le thymus, cette population cellulaire n'exprime ni le TCR, ni le CD4, ni le CD8 d'où son appellation de thymocytes double négatifs [7]. Il existe 4 stades de différenciation de ces thymocytes doubles négatifs (DN1 à DN4) caractérisés par leur niveau d'expression des marqueurs CD44 et CD25. Ces thymocytes vont ensuite devenir doubles positifs en exprimant d'abord le CD8 puis le CD4. Pendant ces étapes ont lieu les réarrangements des chaînes β puis α, ils expriment ainsi leur récepteur, le TCR [8]. Ils subissent ensuite une étape de sélection dite positive dans le cortex thymique au cours de laquelle ils vont recevoir des signaux de survie s'ils sont capables de reconnaître les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec suffisamment d'affinité [9]. La majorité des lymphocytes T vont ensuite devenir simples positifs $CD4^+$ ou $CD8^+$. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent le CMH de classe I et les lymphocytes T CD4 le CMH de classe II. Ultérieurement, une deuxième étape de sélection dite négative a lieu dans la medulla pendant laquelle les lymphocytes T vont recevoir un signal de mort cellulaire s'ils reconnaissent le CMH avec une trop forte affinité [9]. Les lymphocytes matures vont alors quitter le thymus et pourront être activés en périphérie.

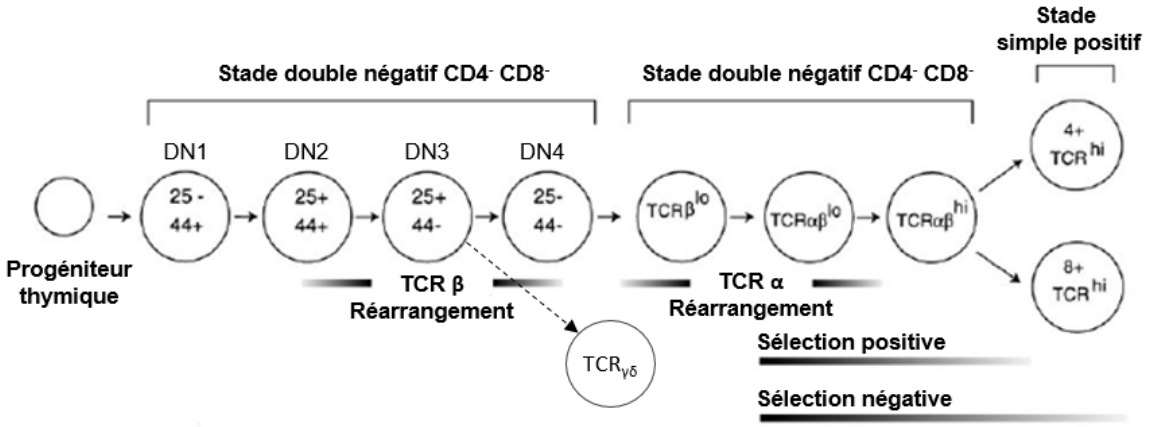


Figure 2 : Schéma simplifié du développement des lymphocytes TCR αβ dans le thymus (adapté d'après [8,10])

III Répartition des lymphocytes T

L'écotaxie ou « homing » correspond à la migration des lymphocytes du sang vers les organes lymphoïdes secondaires après la sortie du thymus. C'est dans ces organes lymphoïdes secondaires qu'aura lieu la rencontre entre le lymphocyte T et son antigène. En l'absence d'antigène, les lymphocytes vont sortir des organes lymphoïdes secondaires et continuer à circuler. Les étapes de cette recirculation sont contrôlées par des chimiokines et un ensemble de molécules d'adhérence qui reconnaissent des ligands présents à la surface des cellules endothéliales cuboïdes des veinules post capillaires permettant ainsi le passage des lymphocytes T sanguins vers les organes lymphoïdes secondaires. Les principales molécules d'adhérence font partie de la famille des sélectines, des intégrines ou de la superfamille des immunoglobulines [11].

Au-delà de la distribution périphérique, les molécules d'adhérence servent aussi lors des interactions entre le lymphocyte T et la CPA. On retrouve en particulier l'intégrine LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen 1) présente à la surface des lymphocytes naïfs qui se lie à ICAM-1 et ICAM-2 (Intracellular adhesion molecule) présents à la surface des CPA. L'interaction avec l'antigène entraîne un changement de conformation de LFA-1 qui permet d'augmenter l'affinité et la stabilité de la liaison lymphocyte T/CPA [12].

IV Activation des lymphocytes T :

L'activation du lymphocyte T est dépendante de plusieurs signaux et voies de signalisation intracellulaires qui permettent la prolifération cellulaire et l'acquisition de ses fonctions effectrices avec la production de cytokines. L'IL-2 est la principale cytokine responsable de la prolifération [13]. L'activation du lymphocyte T permet également la transcription de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (R-IL-2) et induit la progression des lymphocytes T de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et la réplication de leur ADN.

Contrairement aux lymphocytes B et hormis les cas particuliers des super antigènes qui court-circuitent la voie de présentation classique et des TCR γ/δ, un lymphocyte T est incapable de reconnaitre un antigène de façon native, il doit passer par l'intermédiaire d'une CPA [14].

Les antigènes exogènes lors de leur contact avec une CPA doivent être endocytés et dégradés par des protéases, les cathepsines, avant d'être présentés sous forme peptidique. Ils le sont, soit via des molécules du CMH de classe II aux lymphocytes T

$CD4^+$ [5] soit grâce à des mécanismes de cross-présentation via un CMH de classe I aux T $CD8^+$ qui ne reconnaissent habituellement que les antigènes endogènes [15].

IV.1 La synapse immunologique

Par analogie avec les synapses neuronales, on nomme l'interface entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte une synapse immunologique ou SMAC (Supra molecular activation cluster). Il s'agit d'une plateforme de signalisation dynamique comprenant des molécules d'adhérence appartenant à la famille des intégrines, le TCR, des molécules de co-stimulation et des protéines de signalisation.

Lors du contact avec une CPA, un lymphocyte T balaie la surface de la CPA en formant des interfaces transitoires appelées kinapses ou synapses en mouvement. La stabilisation des kinapses aboutit à la formation de la synapse immunologique. Il faut atteindre un seuil d'antigène (environ 10 liaisons à des complexes CMH/peptide) pour effectuer la transition de kinapse à synapse [16].

Le principal rôle de la synapse immunologique est le contrôle et la concentration des signaux d'activation des lymphocytes T (signal antigénique et de co-stimulation). Des complexes de signalisation se forment et vont se regrouper progressivement en différentes zones concentriques. Géographiquement, on identifie plusieurs régions qui s'organisent autour du TCR. La zone centrale (c-SMAC) est la zone de contact entre la CPA et le lymphocyte T qui comprend notamment le TCR, le CD3 et les molécules de costimulation. La zone périphérique (p-SMAC) contient des molécules qui jouent un rôle dans l'adhérence telle que l'intégrine LFA-1. Enfin, la zone distale (d-SMAC) est composée de molécules de grosse taille repoussées en périphérie telles que CD43, CD44 et CD45 [16] (Figure 3). Les interactions TCR/CMH sont ainsi concentrées dans des microclusters qui migrent de façon centripète vers le c-SMAC [17].

La migration des différentes molécules au sein de la synapse est permise par un réarrangement du cytosquelette d'actine et des microtubules avec l'organisation d'un trafic vésiculaire intracellulaire [18].

Ce mécanisme physiologique est mis à mal notamment par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui entraîne la formation de synapses défectueuses avec une perturbation du réarrangement du cytosquelette et de la signalisation intracellulaire [18].

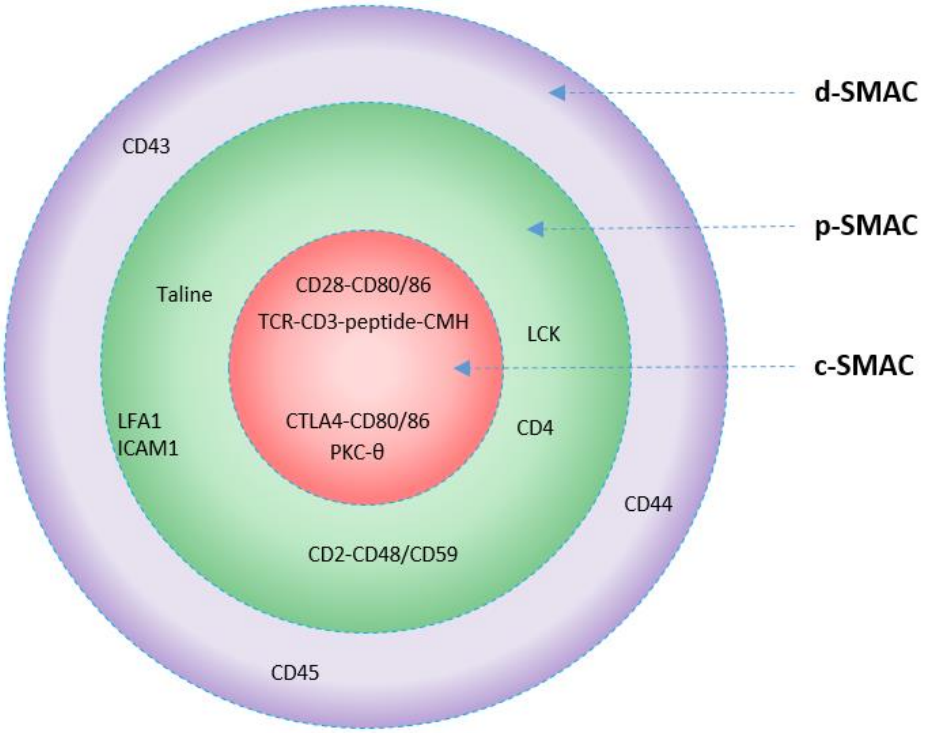


Figure 3 : Organisation de la synapse immunologique, phénomène dynamique (fin d'interaction) (adapté d'après [16])

IV.1.1 Interaction TCR / complexe CMH/peptide : 1er signal

Le signal antigénique qui contrôle la spécificité de la réponse immunitaire est appelé premier signal.

Le TCR reconnait le complexe CMH/peptide présenté par une CPA (Figure 4). En l'absence de domaine intracytoplasmique, c'est le complexe CD3 (chaînes γ, δ, ε et ζ) qui permet les interactions avec les molécules de signalisation intracellulaire. La liaison est également renforcée par les corécepteurs CD4 et CD8 qui interagissent avec des zones conservées portées par les molécules de CMH classe I pour le CD8 ou classe II pour le CD4 [19]. Ces corécepteurs sont également impliqués dans le recrutement de seconds messagers participant à la cascade de transduction du signal. La capacité du complexe CMH/peptide à activer un lymphocyte T est généralement corrélée à l'affinité, la durée et les répétitions de la liaison au TCR [20]. L'interaction entre le TCR et le complexe CMH/peptide est de faible affinité (KD = 0,1 – 500µM) [21,22].

Ce sont les régions de détermination de la complémentarité qui vont assurer la jonction entre le TCR et le complexe CMH/peptide. Les régions les moins variables CDR1 et CDR2 interagissent avec les régions conservées de l'hélice α du CMH et

établissent l'orientation et la configuration globale de l'interaction tandis que la variabilité des régions de contacts du peptide avec les boucles CDR3 déterminent sa spécificité [5]. Le TCR reconnaît ainsi à la fois le peptide et la molécule de CMH qui le présente.

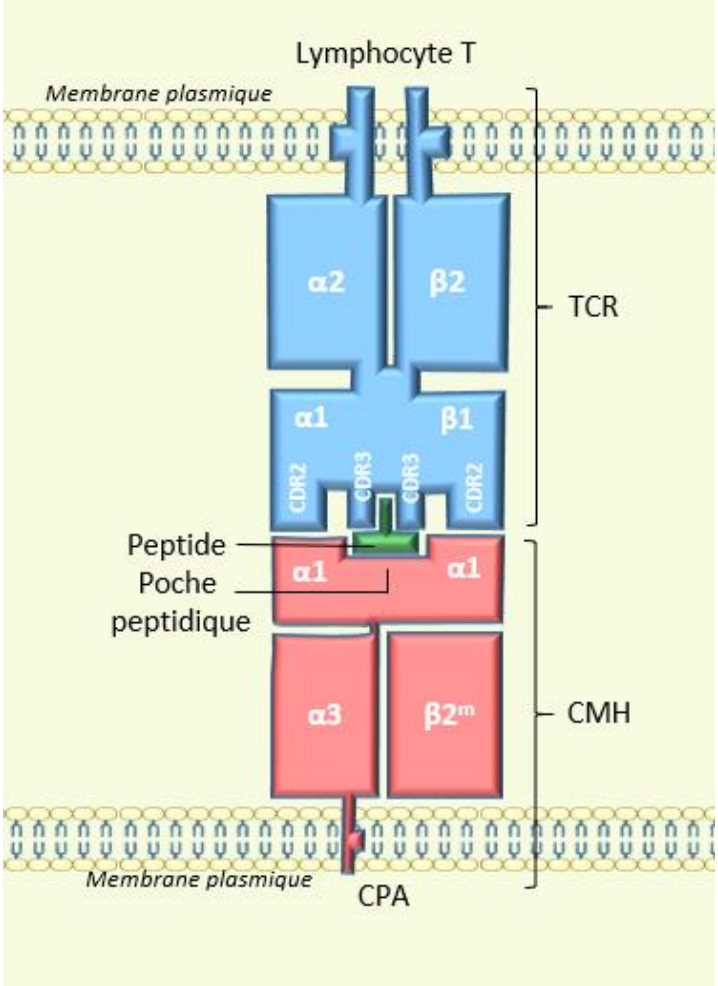


Figure 4 : Structure du TCR et liaison au complexe CMH/peptide (d'après [5])

a) Signalisation intracellulaire TCR / antigène-dépendante

Le signal antigénique est également relayé par plusieurs voies de signalisation intracellulaires menant à la production de l'IL-2 et de la chaîne α de son récepteur (Figure 5). Elles permettent la progression des lymphocytes T de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et la réplication de leur ADN.

Les chaînes accessoires du complexe CD3 comportent des domaines intracellulaires contenant des tyrosines appelés ITAM (Immuoreceptor-based Tyrosine Based Activator Motif). A l'état basal, les tyrosines des domaines ITAM sont déphosphorylées par l'activité phosphatase du CD45 [23].

L’instauration de la synapse immunologique va permettre la relocalisation de tyrosines kinases via des radeaux lipidiques [24] et notamment des protéines de la famille des Src kinases dont fait partie Lck (Lymphocyte-specific protein). Cette kinase est associée constitutivement au CD4 ou au CD8 et phosphoryle tous les domaines ITAM présents sur les chaînes γ,δ et ζ du CD3 [25]. La phosphorylation des domaines ITAM va permettre de recruter des molécules de la famille des Syk kinases dont ZAP 70 (Zeta-chain-Associated Protein Kinase 70 kD) qui se fixe sur la chaîne ζ et devient elle-même la cible de Lck. ZAP70 se transforme alors en site d’ancrage qui va pouvoir connecter d’autres molécules. Ces dernières vont encore démultiplier leurs interactions en activant deux principales voies de signalisation (Figure 5), la voie des phospholipases C (PLC), qui permet notamment le relargage de calcium (Ca^{2+}) à l’intérieur du lymphocyte et la voie des protéines Ras qui active la voie des MAPK (Mitogen activated protein kinase). Ces voies de signalisation entraînent l’activation de facteurs de transcription tels que NFAT, NF-κB et AP-1 qui permettent la production de cytokines et notamment d’IL-2. D’autres voies déclenchent un remaniement du cytosquelette impliquant notamment les protéines WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) et participent aussi à l’activation du lymphocyte T [26].

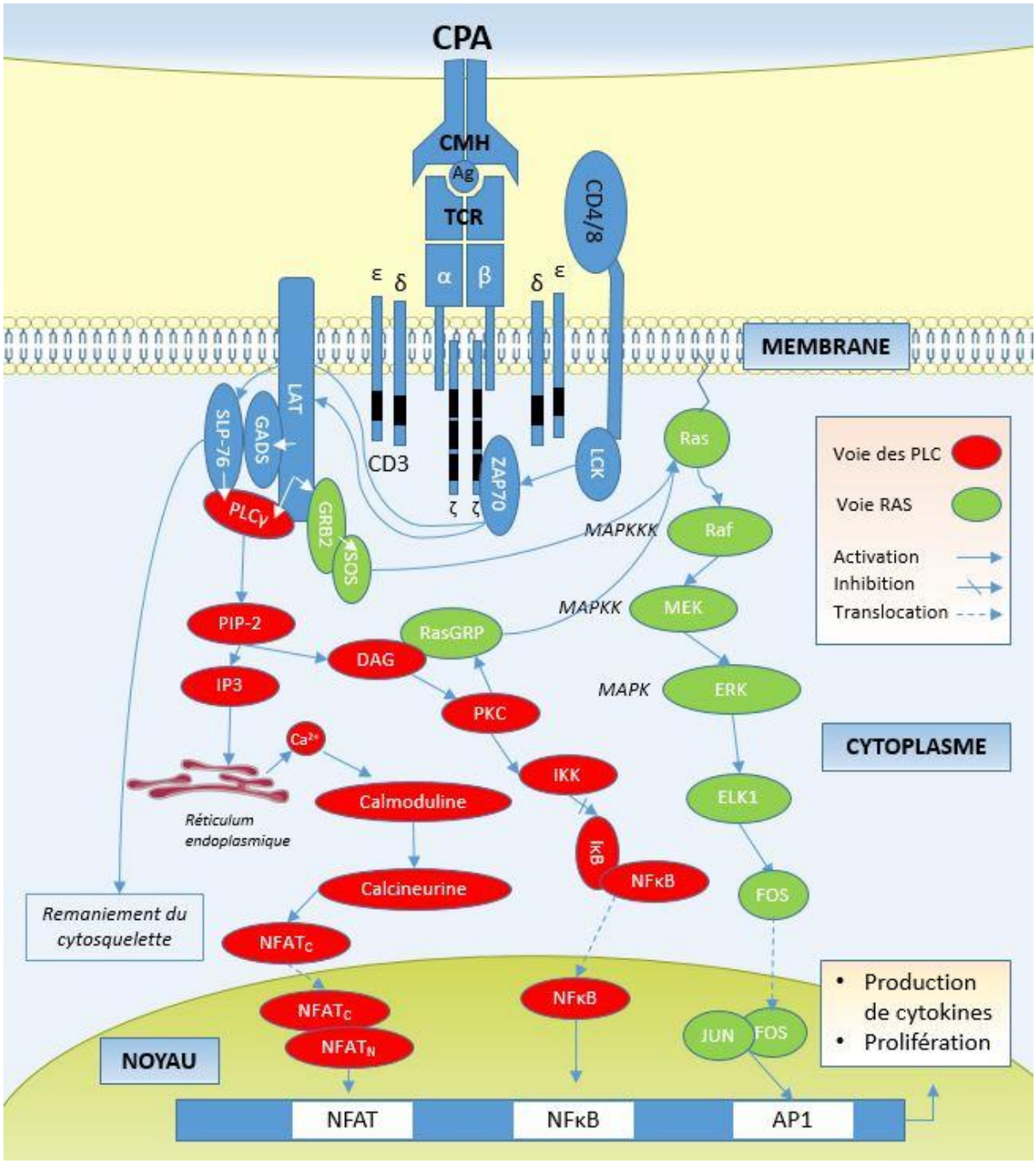


Figure 5 : Voies de signalisations induites par l'activation du TCR menant à la production de cytokines et à la prolifération cellulaire (adapté d'après [27])

IV.1.2 Les molécules de co-stimulation : 2nd signal

Les molécules de co-stimulation permettent lors de l'interaction entre le lymphocyte T et le complexe CMH/peptide de la CPA d'abaisser le seuil antigénique nécessaire à la transduction du signal. Le signal de co-stimulation est donc le second signal qui contrôle l'activation du lymphocyte T. Sans co-stimulation, on observe *in vitro* une absence de réponse antigène spécifique qui mène à l'inactivation du lymphocyte T, on

parle d'anergie. La plupart des molécules de costimulation font partie de la superfamille des immunoglobulines ou de la superfamille des récepteurs au TNF. A la surface des CPA se trouvent des molécules qui font partie des protéines de la famille B7 et sont les ligands des principales molécules de costimulation.

La principale molécule de co-stimulation est CD28. C'est une glycoprotéine homodimérique de la superfamille des immunoglobulines présente sur tous les lymphocytes T CD4 et sur une plus faible proportion des lymphocytes T CD8 [28]. Elle peut s'associer à plusieurs molécules de la famille des protéines B7 dont B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) présentes sur la membrane des CPA (Figure 6) [29].

Le rôle de CD28 est crucial lors de l'activation du lymphocyte T et son absence mène à l'anergie *in vitro*. La molécule B7.2 est faiblement exprimée de manière constitutive et est surrégulée très rapidement alors que B7.1 est surrégulée de manière inductible à la suite de l'activation du lymphocyte. La molécule B7.2 est donc la molécule la plus importante pour l'initiation de la réponse immune [30]. La liaison de CD28 à B7-1 et B7-2 entraine l'entrée en phase G1-S ainsi qu'une production d'IL-2 et de la chaîne α de son récepteur [31].

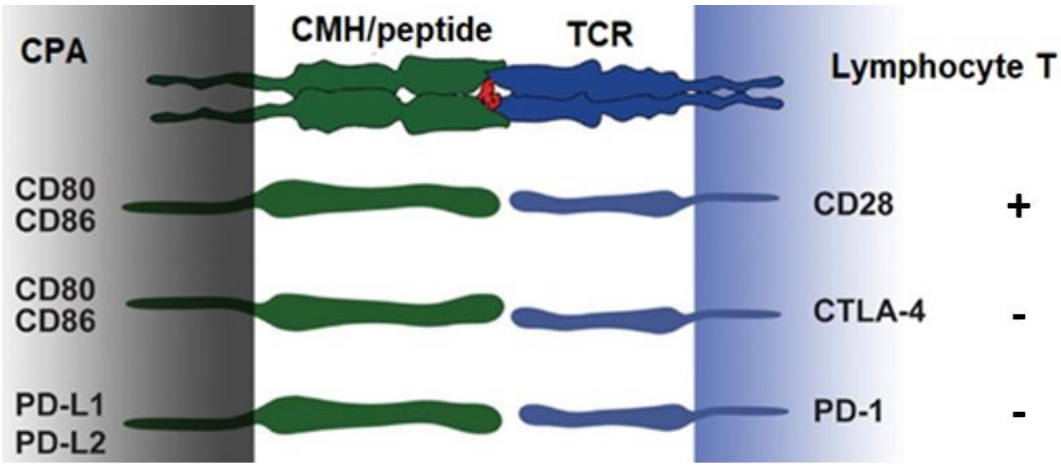


Figure 6 : Interactions entre plusieurs couples de molécules co-stimulatrices ou co-inhibitrices [32]

La co-stimulation positive est contrebalancée par la costimulation négative ou co-inhibition. L'équilibre entre la stimulation positive et négative est indispensable pour assurer à la fois une réponse immunitaire tout en maintenant une tolérance immune et en prévenant les risques d'auto-immunité. Ainsi, CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) est la molécule qui régule CD28 et inhibe son signal. Cette molécule est principalement présente sur les lymphocytes T après activation. CTLA-4 agit via les mêmes ligands que CD28 mais a une affinité supérieure à ce dernier [30].

PD-1 (Programmed cell death-1) joue également un rôle important d'inhibition. PD-1 est le récepteur des protéines PDL1 et PDL2. Comme CTLA-4, son expression est augmentée lors de l'activation des lymphocytes [30].

Les molécules CTLA-4 et PD-1 inhibent la prolifération en freinant la sécrétion d'IL-2 et d'autres cytokines effectrices [30]. Les fonctions de ces molécules en font des cibles thérapeutiques intéressantes et ont mené au développement de thérapies immunomodulatrices (immunosuppresseurs, inhibiteurs de points de contrôles) [33,34].

V Différenciation des lymphocytes T

Les cellules T matures qui n'ont pas encore rencontré l'antigène sont dites naïves. Elles sont chez l'homme de phénotype $CD45RA^+$ et expriment des récepteurs aux molécules d'adressage des ganglions lymphatiques telles que le récepteur de chimiokine CCR7 et la L-Sélectine CD62L. Lors de la stimulation par l'antigène, le lymphocyte va s'activer, proliférer et se différencier en lymphocyte T effecteur. Ces cellules sécrètent des cytokines et/ou molécules cytotoxiques. Contrairement au lymphocyte T naïf, le lymphocyte T effecteur n'a plus besoin d'un deuxième signal pour être activé lors de sa rencontre ultérieure avec l'antigène.

V.1.1 Différentiation mémoire

La réponse qui résulte de la première rencontre des lymphocytes T naïfs avec l'antigène est appelée réponse primaire. Elle se décompose en trois phases (Figure 7).

Premièrement, il se produit une phase activation et d'expansion clonale. Dans cette phase, on observe une augmentation importante du nombre de lymphocytes T CD4 ou de CD8 selon le contexte (infectieux, toxique…). L'expansion s'accompagne d'une différenciation des lymphocytes naïfs en T effecteurs.

Après élimination de l'antigène, une grande majorité des lymphocytes T devenus inutiles meurent par apoptose. Cette étape s'appelle la phase de contraction où seule une partie minoritaire d'environ 5% des lymphocytes T va survivre. Elle résulte de mécanismes de la mort cellulaire induite par l'activation [35].

Durant ces différentes phases, une partie des cellules effectrices deviennent des lymphocytes T mémoires qui vont persister. Ces lymphocytes ont une longue durée de vie et pourront, lors d'un nouveau contact avec le même antigène, engager une

réponse immunitaire secondaire plus précoce et plus importante [36]. Ils sont en effet capables de se diviser plus rapidement que des lymphocytes T naïfs [37].

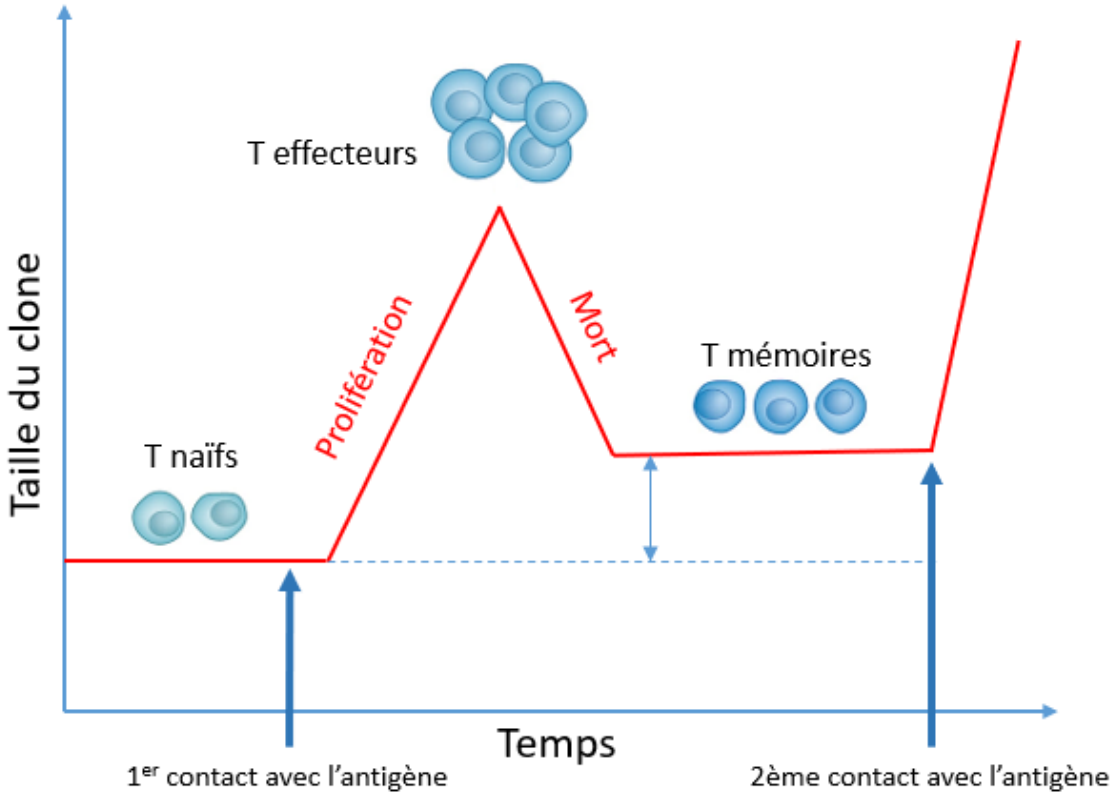


Figure 7 : Cinétique de la réponse des lymphocytes T (d'après [38])

V.1.2 Sous populations de lymphocytes T mémoires

Historiquement, les lymphocytes T mémoires ont été classés en fonction de leur localisation et de leur phénotype. Les principaux phénotypes sont décrits en Tableau 1.

Les lymphocytes T mémoires ont une longue durée de vie. Certaines cytokines dont l'IL-7 et l'IL-15 sont impliquées dans la survie et la différentiations des lymphocytes T mémoires [39].

	T naïfs	T_{SCM}	T_{CM}	T_{EM}
CD45RO	-	-	+	+
CD45RA	+	+	-	-
CCR7	+	+	+	-
CD62L	+	+	+	-
CD27	+	+	+	+/-
CD28	+	+	+	+/-
CD31	+/-	+	-	-
CD95	-	+	+	+
CD49d	-	?	+/-	+
CXCR3	-	+	+	+
CD11a	-	+	+	+
CD122	-	+	+	+/-
CD127-	+	+	+	-

Tableau 1 : Phénotype des principales sous-populations de lymphocytes T mémoires chez l'humain (d'après [40]). T_{SCM} : T cellule souche T mémoire, T_{CM} : T central mémoire, T_{EM} : T effecteur mémoire

Les T centraux mémoires (Tcm) expriment le récepteur de chimiokine CCR7 et le CD62L qui permettent leur circulation dans les tissus lymphoïdes périphériques de la même façon qu'une cellule T naïve. Ils ont la capacité de se différencier rapidement en cellules effectrices [41].

Les lymphocytes T effecteurs mémoires (Tem) n'expriment par CCR7 et CD62L, ils perdent donc la capacité de migrer dans les organes lymphoïdes et sont principalement présents dans le sang et les tissus périphériques non lymphoïdes où ils agissent in situ. Ils ont la capacité d'exercer une réponse effectrice rapide en sécrétant des cytokines telles que l'IFN-γ, l'IL-4 et l'IL-5 [41].

Les lymphocytes mémoires résidents (Trm) grâce à l'expression du CD69 (marqueur d'activation) et du CD103 (molécule d'adhérence) ne migrent pas et persistent dans les tissus épithéliaux périphériques où ils auront un rôle de protection vis-à-vis des réinfections [42].

Les cellules « souches » T mémoires T_{SCM} forment une sous population de lymphocytes T mémoires très peu différenciés exprimant un marqueur « naïf », le CD45RA. Elles forment un réservoir de cellules souches et elles ont la capacité de

s'auto-renouveler grâce à des mécanismes qui ne sont toujours pas entièrement élucidés [40,43].

V.2 Différenciation fonctionnelle des lymphocytes T CD4

V.2.1 Polarisation des lymphocytes T helper

Après l'activation, les lymphocytes T CD4 se différentient en différents types de lymphocytes auxiliaires, c'est la polarisation. Elle dépend de la nature de l'antigène et de l'environnement lors du contact antigénique. Ces lymphocytes T helpers (T_H) sont classés en fonction de leur capacité à produire telle ou telle cytokine. On parle de profils cytokiniques (Figure 8). Ils sont dérivés du T naïf stimulé dit T_H0 qui produit à la fois de l'IL-2, de l'IFN-γ, de l'IL-4 et de l'IL-5.

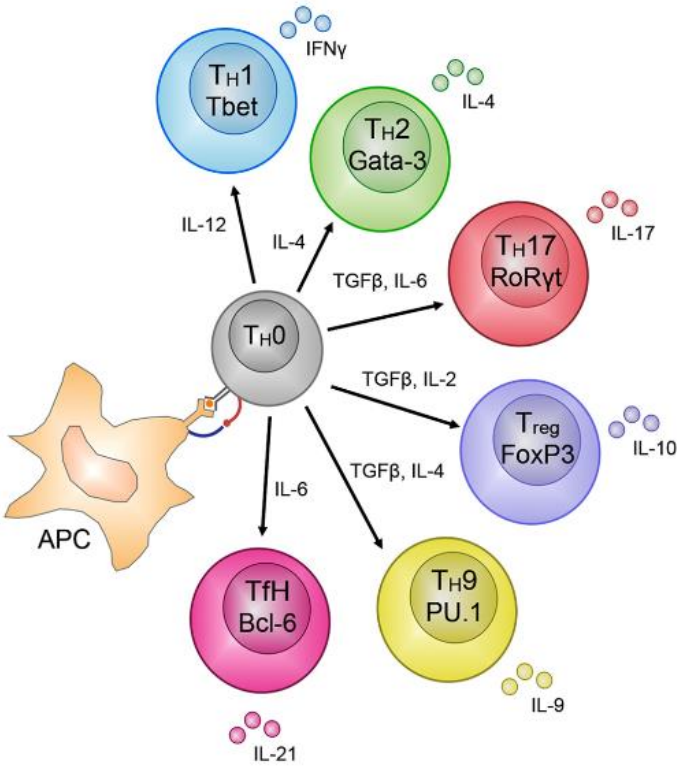


Figure 8 : Principales populations de LT CD4 effecteurs [44]

a) Les lymphocytes T_H1

Les lymphocytes T_H1 sont capables de sécréter de grandes quantités d'IL-2, d'IFN-γ et de TNF-α [45]. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription T-bet (T-box transcription factor) et identifiés phénotypiquement grâce à leurs récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR3. La réponse T_H1 favorise une immunité de type cellulaire et est principalement orientée vis-à-vis des pathogènes intracellulaires (virus,

bactéries ou antigènes tumoraux). Ils participent à l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et à la cytotoxicité des lymphocytes NK. Ils agissent sur les macrophages en augmentant leur recrutement et leur capacité de phagocytose. Ils entraînent également la sécrétion d'anticorps de type IgG par les lymphocytes B. Cette production d'anticorps facilite l'activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et l'opsonisation [45].

La polarisation T_H1 est permise par la sécrétion d'IFN-γ et par l'IL-12 [46]. La sécrétion d'IFN-γ va également diminuer la réponse T_H2. A l'inverse, la réponse T_H1 est inhibée par la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4.

b) Les lymphocytes T_H2

Les lymphocytes T_H2 sécrètent les IL-4, 5, 6, 9, 10, 13. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription GATA3 et on les identifie phénotypiquement grâce à leurs récepteurs de chimiokines CCR3, CCR4, CCR8, CXCR4 et CRTH2 [45]. Ces lymphocytes permettent une réponse contre les pathogènes extracellulaires et notamment vis-à-vis des parasites. Ils permettent la production d'anticorps en particulier la commutation des anticorps de classe IgE par les lymphocytes B. Ces IgE permettent la cytotoxicité dépendante des anticorps via leur interaction avec les polynucléaires éosinophiles. Leur interaction avec les basophiles et mastocytes entraîne la libération de granules contenant notamment de l'histamine impliquée dans les phénomènes d'allergie par hypersensibilité immédiate.

La réponse T_H2 est favorisée par la sécrétion d'IL-4 et diminue la réponse T_H1 via la sécrétion d'IL-10, d'IL-4 et en réprimant le facteur de transcription STAT4 responsable de la sécrétion d'IFN-γ [47].

c) Les lymphocytes T_H9

Les lymphocytes T_H9 sécrètent surtout de l'IL-9, mais aussi les interleukines IL-10 et IL-21. Ils expriment particulièrement les facteurs de transcription PU-1 et IRF-4, mais aussi GATA-3. Leur différentiation est stimulée par le TGF-β et l'IL4 [48]. Ils ont été initialement décrits dans leur participation à la réponse anti-parasitaire [49]. La sécrétion d'IL-9 induit la sécrétion de mucus et il a été montré que les lymphocytes T_H9 sont impliqués dans certaines maladies respiratoires, notamment l'asthme, mais aussi dans certaines maladies auto-immunes chez la souris telles que l'encéphalopathie auto-immune expérimentale [50].

d) Les lymphocytes T_H17

Les lymphocytes T_H17 sécrètent les interleukines 17A, 17F, 6, 22 et 21 [51]. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription RorγT et on les identifie phénotypiquement grâce à leurs récepteurs de chimiokines CCR6 et CCR4 [52]. La sécrétion d'IL-17A entraine notamment un recrutement des polynucléaires neutrophiles [53]. Ces lymphocytes jouent un rôle dans la réponse contre les pathogènes extracellulaires et les champignons [54]. De plus, ces cellules ont été décrites en tant qu'acteur dans la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires et auto-immunes telles que le psoriasis, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.

La réponse T_H17 est favorisée par la sécrétion d'IL-1β, d'IL-6, d'IL-23 et de TGF-β (Transforming growth factor β) [55].

Il a plus récemment été identifié une sous-population intermédiaire $T_H1/17$ capable de produire à la fois de l'IL-17A et de l'IFN-γ [56].

e) Les lymphocytes T_H folliculaires

Les lymphocytes T_H folliculaires (ou T_H21) permettent de réguler le développement de l'immunité B ainsi que l'acquisition d'une mémoire B. Ils produisent de l'IL-21 et de l'IL-4 [57] et expriment le facteur de transcription BCL-6 [58]. Ils sont identifiés phénotypiquement par les marqueurs PD-1, ICOS et CXCR5. Ils agissent sur la formation des centres germinatifs et sont nécessaires aux processus de commutation isotypique des lymphocytes B et à la production de plasmocytes de longue durée de vie ayant une forte affinité pour l'antigène ou de lymphocytes B mémoires [59]. Il semblerait que d'autres lignées des lymphocytes T helpers (T_H1, T_H2, T_H17) puissent acquérir des fonctions et le phénotype des T_H folliculaires en fonction de l'environnement inflammatoire [58]. Ces cellules sont induites en réponse à l'IL-6 et l'IL-21 [60].

f) Les lymphocytes T_H22

Plus récemment identifiés, les lymphocytes T_H22 ont d'abord été considérés comme une sous-population de lymphocytes T_H17 [61]. Les lymphocytes T_H22 se caractérisent par leur importante production d'IL-22 et leur absence de production d'IL-17, ils sécrètent également de l'IL13, 26 et du TNFα. Ces cellules expriment le facteur de transcription AHR (récepteur d'aryl hydrocarbone) [62]. Elles expriment les récepteurs de chimiokines CCR4 et CCR10 leur permettant une migration préférentielle vers la

peau, l'intestin, les poumons et les glandes salivaires [63]. Ces cellules jouent un rôle dans l'inflammation mais aussi dans le développement du psoriasis et probablement dans d'autres pathologies immunitaires [61]. Ces cellules sont induites par la sécrétion d'IL-6 et de TNF-α [64].

V.2.2 Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les lymphocytes T régulateurs sont identifiés par leur forte expression constitutive de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) et leur faible expression du récepteur à l'IL-7 (CD127). Ils expriment le facteur de transcription FoxP3. Ces lymphocytes ont comme principale caractéristique d'inhiber la prolifération des autres lymphocytes via leurs fonctions immunosuppressives. Ils jouent un rôle prépondérant dans la tolérance immunitaire périphérique. L'absence de FoxP3 provoque une perte de la fonction suppressive et s'exprime cliniquement par une endocrinopathie auto-immune appelée le syndrome IPEX. Les Treg expriment constitutivement CTLA4. L'expression de CTLA4 est augmentée lors de l'activation des Treg [65].

a) Les Treg naturels (nTreg)

La population la plus représentée est la population T_{reg} directement issue du thymus. Les nTreg produisent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF-β. Leur rôle est d'inhiber la prolifération des lymphocytes T en réponse à un antigène, eux-mêmes ne prolifèrent pas à ce même antigène. La sécrétion d'IL-10 va aussi diminuer la réponse T_H1 [66].

b) Les Treg périphériques

Les Treg induits (iTreg) sont des lymphocytes T régulateurs induits dans les tissus périphériques. Elles expriment les mêmes marqueurs que les nTreg ($CD25^{+high}$, FoxP3…) et remplissent les mêmes fonctions mais différent dans leur besoin en signaux de costimulation [67]. Les iTreg peuvent être induits *in vitro* grâce à de l'IL-2, du TGF-β ou de la rapamycine [67].

Ils existe également deux autres populations périphériques n'exprimant pas le facteur de transcription FoxP3, les Tr1 produisant de l'IL-10 et les T_H3 qui sécrètent du TGF-β (Figure 9) [68].

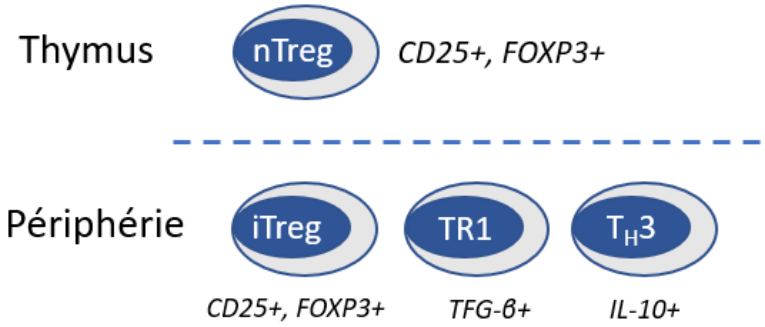


Figure 9 : Sous populations lymphocytaires T régulatrices (D'après [69])

V.3 Différenciation des lymphocytes T CD8

Après activation par l'antigène, le lymphocyte T CD8 (pré-CTL) devient un lymphocyte T cytotoxique (CTL). Ces cellules interviennent dans l'immunité vis-à-vis des pathogènes intracellulaires (virus, bactéries intracellulaires) en entrainant la lyse des cellules cibles.

V.3.1 Cytotoxicité granulaire

La principale action cytotoxique des CTL repose sur l'exocytose de granules contenant des molécules solubles, les granzymes et les perforines (Figure 10).

Les perforines sont des protéines qui polymérisent en présence de calcium et constituent des tubules transmembranaires de 12 à 18 molécules formant des pores dans la membrane. Ces pores permettent l'entrée des granzymes dans la cellule [70].

Les granzymes sont des enzymes à sérine protéase. Il existe plusieurs types de granzymes (A, B, C…) mais c'est la granzyme B qui possède l'activité cytotoxique la plus importante [71]. La mort cellulaire est induite dans les minutes qui suivent l'entrée des granzymes dans la cellule grâce au clivage de certaines caspases dont la caspase 3 activant le processus d'apoptose [72].

Les granules cytotoxiques contiennent également une autre molécule : la granulysine qui altère la perméabilité des membranes pauvres en cholestérol et notamment celle des bactéries, champignons, parasites [73].

Ce processus de cytotoxicité entraîne la mort de la cible cellulaire et le CTL va pouvoir ensuite aller tuer d'autres cellules [72].

V.3.2 Cytotoxicité membranaire

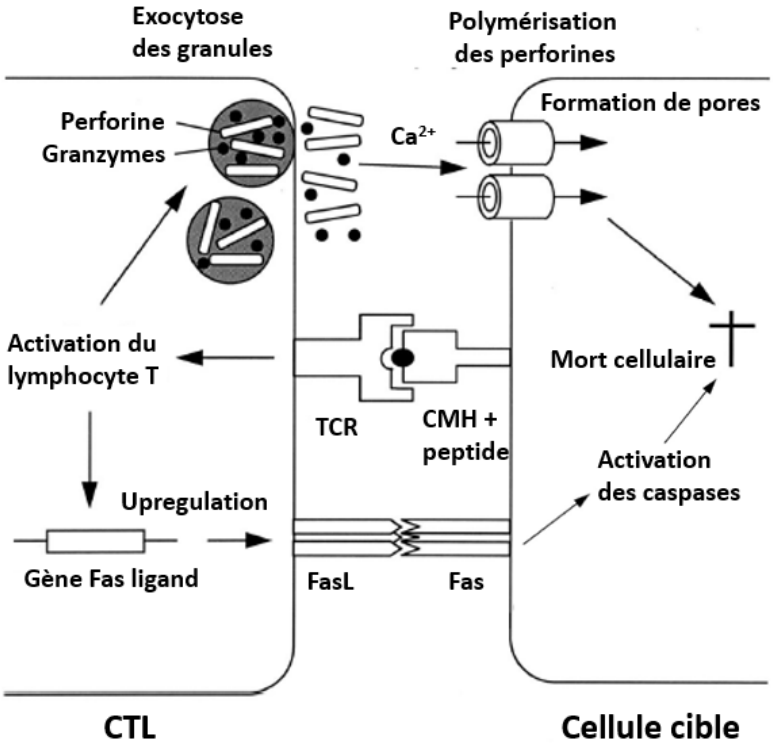


Figure 10 : Principaux mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T CD8, adapté d'après [74])

La cytotoxicité membranaire est dirigée par le Fas ligand (Fas-L), une molécule de la superfamille des récepteurs aux TNF-α dont l'expression est augmentée lors de l'activation du lymphocyte T et qui reconnait la molécule Fas (ou CD95 ou Apo-1) à la surface de la cellule cible. Leur liaison déclenche la cascade d'activation des caspases et donc l'apoptose [74].

V.3.3 Production de cytokines

Les CTL produisent également des cytokines telles que l'IFN-γ et le TNF-α. L'IFN-γ a par exemple une action antivirale en inhibant la réplication virale [75]. Il augmente aussi l'expression des gènes codant pour le CMH de classe I et augmente donc la présentation des peptides antigéniques par les cellules cibles [76]. De plus, l'IFN-γ et le TNF-α augmentent le recrutement des macrophages [45].

VI Exploration de la réponse T, tests *in vitro*

VI.1 Evaluation de la réponse proliférative : le test de prolifération lymphocytaire (TPL)

Le test de prolifération lymphocytaire (TPL) ou test de transformation lymphoblastique (TTL) étudie la capacité de prolifération des lymphocytes vis à vis de mitogènes ou d'antigènes spécifiques. Un mitogène est capable d'activer une ou plusieurs voies de signalisation et d'entraîner la prolifération cellulaire polyclonale. Dans le cas d'une stimulation par un antigène, les lymphocytes T mémoires présensibilisés du patient vont être activés *in vitro* lors d'une re-stimulation *p*ar l'antigène d'intérêt.

A partir de sang hépariné, les cellules mononucléées sont isolées par centrifugation sur un gradient de densité de Ficoll. Elles sont ensuite mises en culture 3 à 7 jours en présence de mitogènes et/ou d'antigènes/allergènes. La prolifération sera comparée à celle mesurée sans stimulation et validée par un contrôle positif avec un mitogène (cf Matériels et méthodes). Après avoir récupéré les cellules, on mesure la réplication de l'ADN ou bien directement la division cellulaire grâce à l'incorporation de traceurs intracellulaires.

VI.1.1 Agents stimulants

Il est possible de réaliser une activation polyclonale des lymphocytes T par l'intermédiaires de lectines. Ce sont des glycoprotéines d'origine végétale ou animale capables d'activer la prolifération lymphocytaire en se liant de façon spécifique à des oligosaccharides présents à la surface des lymphocytes et notamment au TCR. Les principales lectines utilisées pour la prolifération lymphocytaire sont la phytohémagglutinine A (PHA), la concanavaline A (conA) et le Pokeweed mitogène (PWM). Ils sont utilisés pour évaluer la capacité de réponse lymphocytaire à une stimulation.

Des anticorps monoclonaux anti-CD3 (ou plus rarement anti-CD2) sont aussi utilisés tels que l'OKT-3 avec ou sans anti-CD28.

Sont également utilisés des agents court-circuitant des voies de transduction du signal antigénique tels que le Phorbol 12-myristate 13-acetate et l'ionomycine (PMA-Iono). La PMA active la protéine kinase C et l'ionomycine, un ionophore calcique, déclenche la libération de calcium par le réticulum endoplasmique. Ces deux agents entrainent donc l'activation de voies de signalisation intracellulaires décrites

précédemment (Figure 5). L'avantage des molécules court-circuitantes est qu'elles ne nécessitent pas d'interaction avec des récepteurs de surface.

De plus, pour évaluer cette réponse prolifération antigène spécifique, il est également possible d'utiliser des superantigènes comme les entérotoxines staphylococciques.

Pour évaluer l'efficacité des réponses vaccinales, des antigènes vaccinaux sont utilisés tels que l'anatoxine tétanique, la toxine diphtérique ou le Bacille de Calmette-Guérin (BCG) pour induire une réponse lymphocytaire *in vitro*.

VI.1.2 Traceurs intracellulaires

a) Marqueurs radioactifs

La technique de référence utilise comme marqueur une molécule radioactive, la thymidine tritiée. C'est une base nucléotidique qui permet de marquer l'ADN en synthèse lors de la phase S et donc sa réplication induite lors de la prolifération. On mesure le nombre de coups par minute à l'aide d'un compteur β à scintillation liquide reflétant l'incorporation de thymidine radioactive.

Le marquage s'effectue 16h avant la fin de la culture et la mesure est très rapide, cela présente l'avantage d'un temps de technique court en comparaison des méthodes utilisant la cytométrie en flux (CMF). Inconvénients, les techniques « chaudes », plus contraignantes, sont de moins en moins utilisées car elles nécessitent des laboratoires spécialisés soumis à des contrôles par l'institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN), des pièces à accès contrôlé et une surveillance du personnel habilité réalisant la technique. Le développement de techniques non radioactives les supplante donc peu à peu.

b) Techniques de cytométrie en flux (CMF)

Les marqueurs de réplication :

Des traceurs alternatifs non radioactifs peuvent aussi être utilisés et quantifiés par CMF. On retrouve tout d'abord des molécules permettant de mesurer la réplication de l'ADN à l'instar de la thymidine tritiée. On peut citer par exemple le BrdU (bromodéoxyuridine) [77] et l'EdU (5-ethynyl-2′deoxyuridine) [78]. Le BrDU est un nucléotide de synthèse qui s'incorpore à l'ADN. Les cellules sont ensuite incubées en présence de BrDU puis fixées et l'ADN est dénaturé. Il faut réaliser une étape de marquage par un anticorps anti-BrdU qui est révélé par un anticorps secondaire

fluorescent. Inconvénient de la technique, l'étape de marquage allonge le temps de technique et l'étape de dénaturation peut affecter la fixation d'autres anticorps.

L'EdU, commercialisé par la société Thermofisher scientific® dans le kit Click-it™ est également un nucléotide de synthèse qui se fixe à l'ADN et dont la révélation ne nécessite pas d'étape de dénaturation. L'incorporation d'EdU est révélée par une réaction de « click » catalysée par le cuivre qui créé une liaison covalente entre un azide et un alcyne. La molécule fluorescente utilisée, le Click-iT™Alexa Fluor® contient le groupement azide et l'EdU contient le groupement alcyne.

La petite taille de l'azide élimine le besoin de dénaturer l'ADN pour que la molécule de détection de l'EdU ait accès au nucléotide (Figure 11) [79].

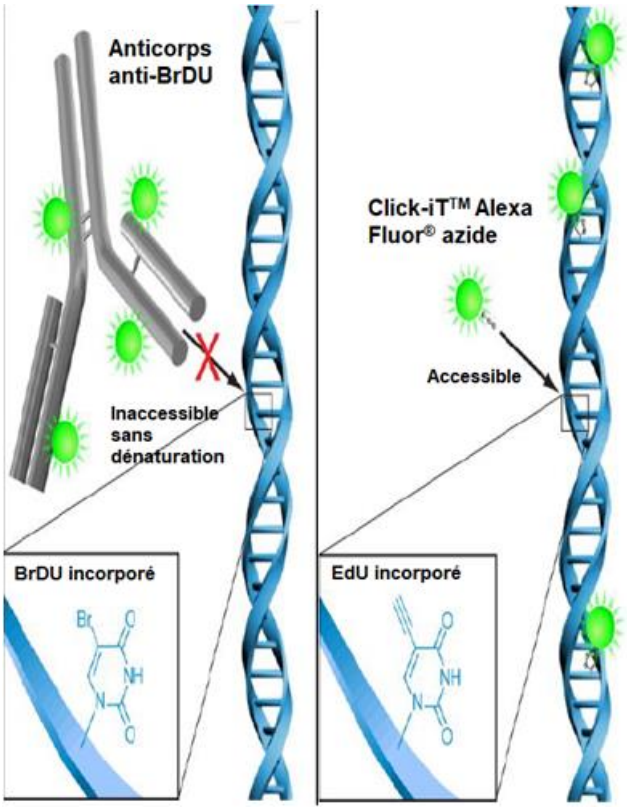


Figure 11 : Détection de l'EdU par l'AlexaFluor azide et détection du BrdU avec un anti-BrDU.
Traduit d'après la notice d'utilisation du kit Click-iT® par Thermofisher scientific ***[80]***.

Les marqueurs de division cellulaire :

On peut également évaluer la division cellulaire grâce à des molécules fluorescentes telles que le CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) [81]. Le CFSE se fixe de façon covalente via son groupement succinimidyl aux lysines des molécules intracellulaires [82]. Il reste dans le cytoplasme des cellules pendant plusieurs semaines sans induire de perte de viabilité. A chaque division cellulaire, le CFSE est distribué de façon équivalente entre les cellules filles ce qui permet d'évaluer

la prolifération des lymphocytes par cytométrie en flux (Figure 12).

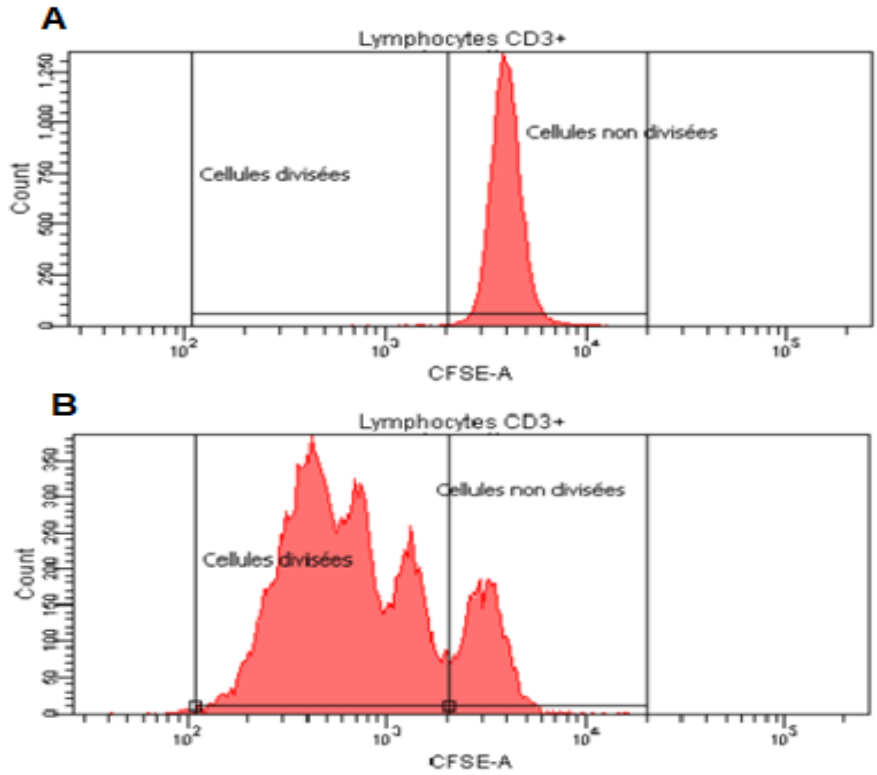


Figure 12 : Expression du CFSE après 4 jours de culture sans stimulation (A) et avec stimulation par la phytohémagglutinine A (B)

Les marqueurs d'activation :

Il est également possible de mesurer l'expression de marqueurs d'activation lymphocytaires membranaires (CD69) [83] ou nucléaires (Ki67) [84]. CD69 est impliqué dans la prolifération lymphocytaire en transmettant le signal d'activation. KI67 est un antigène présent sur une protéine nucléaire exprimée par les cellules en prolifération donc pas sur les cellules en G0.

Enfin, on peut mesurer la phosphorylation des protéines STAT-5 qui se transloquent dans le noyau et régulent la transcription de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) essentielle à la prolifération lymphocytaire. Une très récente étude de Bitar et al. suggère que le niveau de phosphorylation de la protéine STAT-5A déterminé par cytométrie en flux à 24h serait un bon indicateur de l'initiation d'une prolifération lymphocytaire. Cette méthode permettrait un gain de temps de technique considérable [85].

VI.2 Evaluation de l'activité fonctionnelle

Le test de prolifération lymphocytaire évalue la capacité de prolifération des lymphocytes mais n'apprécie pas l'activité fonctionnelle. Celle-ci est évaluée par les tests qui mesurent la production de cytokines, des marqueurs de cytotoxicité (perforine/granzyme B etc.) ou l'activité cytotoxique (ex : test de relargage du chrome 51). Puisque dans ce travail, nous nous intéresserons principalement aux lymphocytes T CD4 et que nous n'étudions pas de réactions vis-à-vis de cellules cibles, nous ne détaillerons pas l'aspect cytotoxicité.

VI.2.1 ELISA

L'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) classique permet de quantifier directement les cytokines présentes dans le surnageant de culture. Des puits préalablement recouverts d'anticorps anti-cytokine sont remplis de surnageant de culture et incubés. Après lavage, est ajouté un anticorps primaire anti-cytokine puis après un second lavage un anticorps secondaire couplé à une enzyme. La révélation se fait après un ultime lavage par ajout du substrat de l'enzyme et la lecture est effectuée par spectrophotométrie.

Cas particulier de la détection de l'IFN-γ : l'Interferon gamma release assay (IGRA) est une autre méthode qui mesure la libération d'IFN-γ en réponse à une stimulation par des antigènes. Les cellules du patient en sang total sont incubées pendant 12h avec des antigènes spécifiques, puis la mesure de la libération d'IFN-γ dans le plasma est effectuée par ELISA. Cette méthode a déjà fait ses preuves dans le diagnostic de la tuberculose et de la tuberculose latente (Quantiferon®) mais demeure assez limitée dans ses applications.

VI.2.2 ELISpot

L'ELISpot (enzyme-linked immunospot) [86] est une technique qui permet de déterminer le nombre de lymphocytes T effecteurs produisant une cytokine en réponse à la stimulation par un antigène. Les cellules mononucléées du patient sont cultivées dans des puits recouverts d'anticorps anti-cytokines. Après une incubation de 18 à 24h en présence ou non d'un antigène, les cellules sont éliminées et un second anticorps spécifique de la cytokine, couplé à une enzyme est ajouté. La révélation se fait à l'aide d'un substrat chromogène et on compte le nombre de tâches (spots) révélées par le substrat, chaque spot reflétant la sécrétion de la cytokine d'intérêt par un lymphocyte T. Le résultat est exprimé en nombre de cellules formant des spots par million de

lymphocytes. Ce test est très sensible et permet de détecter 25 cellules sécrétrices/10^6 cellules mononucléées [86].

VI.2.3 Techniques de cytométrie en flux

a) Mesure dans le surnageant de culture

La production de cytokines est mesurable dans le surnageant de culture par cytométrie en flux à l'aide de billes fluorescentes. Sont utilisées des billes couplées avec des anticorps de capture anti-cytokine qui sont incubées avec le surnageant puis, après lavage, des anticorps couplés à une molécule fluorescente qui reconnaissent un épitope différent de celui de l'anticorps de capture sont ajoutés. L'utilisation de billes de fluorescence variable permet la mesure simultanée de plusieurs cytokines (multiplex).

b) Mesure intracytoplasmique

Pour les marquages intracytoplasmiques, de la bréfeldine ou de la monensine est ajoutée lors de la culture avec l'antigène pour bloquer l'export de cytokines puis les cellules sont fixées et perméabilisées avant d'effectuer le marquage avec un anticorps couplé à un fluorochrome [87]. Avec cette technique, ce n'est pas la production de cytokines qui est mesurée, car elles n'ont pas été encore secrétées, mais leur accumulation intracellulaire et la fréquence des cellules productrices.

VI.2.4 Techniques multiplex et ultrasensibles

Ce sont des approches plus récentes. Les techniques multiplex permettent le dosage simultané de plusieurs cytokines ; les techniques ultrasensibles quant à elles ne permettent le dosage que d'une seule cytokine à la fois mais avec une meilleure sensibilité, de l'ordre du pg/ml.

Les techniques multipex peuvent, comme décrit précédemment, utiliser la cytométrie mais des techniques d'électrochimioluminescence existent également. On peut citer par exemple le Multiplex beads array assay [88] en cytométrie ou encore la technologie MSD® sur micro puits en électrochimioluminescence [89].

Pour les dosages ultrasensibles, on peut citer par exemple les technologies Simoa™ et Erenna® qui reposent sur l'isolement de billes paramagnétiques qui se lient aux cytokines. Ces techniques semblent avoir les meilleures sensibilités [90].

VII Applications diagnostiques du test de prolifération lymphocytaire

VII.1 Diagnostic des déficits immunitaires primaires

Un déficit immunitaire est une situation pathologique liée à l'insuffisance d'une ou de plusieurs fonctions immunologiques.

Les déficits immunitaires primaires sont des déficits congénitaux dont le diagnostic est souvent réalisé durant l'enfance. Il existe plusieurs centaines de syndromes de déficits immunitaires et plusieurs centaines de gènes identifiés à ce jour. La prévalence de ce type de déficit est faible, entre 1,5 et 18,8 pour 100 000 habitants [91].

Les déficits immunitaires secondaires sont des déficits acquis dont le diagnostic se fait surtout à l'âge adulte. Pour ces pathologies, les tests d'exploration *in vitro* de la réponse des lymphocytes T sont de peu d'utilité.

Les déficits congénitaux peuvent affecter autant l'immunité adaptative (cellulaire ou humorale) que l'immunité innée.

VII.1.1 Stratégie de diagnostic des déficits immunitaires primaires

La première étape du diagnostic consiste à identifier les signes cliniques d'appel en fonction de l'âge. Par exemple, chez l'enfant on recherche :

1) Infections récurrentes des voies respiratoires hautes et basses
   a. Plus de 8 otites par an (pendant l'automne et l'hiver) chez les moins de 4 ans
   b. Plus de 4 otites par an (pendant l'automne et l'hiver) chez les plus de 4 ans
2) Plus de 2 pneumonies par an ou plus de 2 sinusites par an
3) Infections sévères à germes de type pneumocoque, Haemophilus, Neisseria (ou un seul épisode de méningite ou de sespis) ; des infections à bactéries pyogènes récurrentes
4) Infections récurrentes avec le même type de pathogène
5) Infections inhabituelles ou d'évolution inhabituelle : infections opportunistes, diarrhées persistantes, muguet ou candidose récidivente
6) Une cassure de la courbe staturo pondérale et/ou une diarrhée persistante
7) Antécèdents familiaux de déficits immunitaires ou de signes cliniques similaires

A partir de ces signes d'appel, des examens biologiques de première intention sont effectués [92] :

- Hémogramme ou Numération de Formule Sanguine avec recherche d'une lymphopénie
- Dosage pondéral des immunoglobulines : recherche d'un déficit de la synthèse d'anticorps
- Sérologies post-vaccinales et/ou post infectieuses : évaluation d'une réponse immunitaire anti-infectieuse et de la production d'anticorps

Si une anomalie est détectée ou si les arguments cliniques sont importants, il est possible d'effectuer des examens biologiques de 2ème intention [92] :

- Exploration de l'immunité spécifiques :
  - Immunophénotypage lymphocytaire
  - Dosage des sous classes d'Immunoglobulines
  - Phénotypage des lymphocytes naïfs/mémoires
  - Test de prolifération lymphocytaire
- Exploration de l'immunité non spécifique
  - Tests fonctionnels des polynucléaires et du complément

Le bilan pourra être confirmé par recherche de mutations génétiques (puce, séquençage).

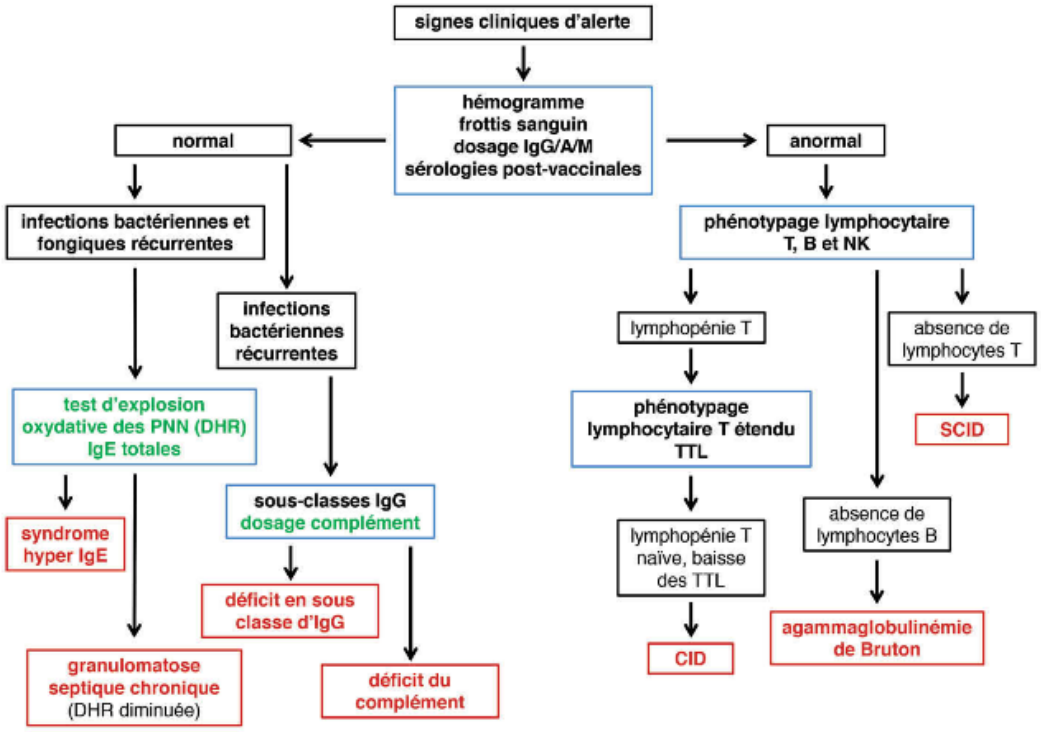


Figure 13 : Arbre décisionnel des examens complémentaires devant une suspicion de déficits immunitaire primaire [92]. Les cadres bleus correspondent aux examens pouvant être prescrits dans le cadre d'une suspicion de déficit immunitaire. . Les examens complémentaires pouvant être réalisés en première intention selon le contexte clinique sont notés en vert. Notées en rouge dans les cadres rouges sont décrites les pathologies pouvant être diagnostiquées. TTL : test de prolifération lymphocytaire, CID : déficit immunitaire combiné, SCID : déficit immunitaire combiné sévère, DHR : dihydrorhodamine, PNN : polynucléaire neutrophile

VII.1.2 Evaluation de la réponse antigène spécifique des lymphocytes T

Le test de prolifération lymphocytaire est un examen de seconde intention. Il doit être prescrit en cas de lymphopénie T en complément d'un immunophénotypage T (Figure 13) ou lorsqu'un faisceau d'arguments cliniques évoque un déficit immunitaire T (infections opportunistes, signes d'auto-immunité, d'inflammation digestive) [93]. Cependant, il faut un minimum de 500 à 1000 lymphocytes T /µL pour pouvoir réaliser le test.

Un test de prolifération lymphocytaire avec une réponse T diminuée oriente vers des déficits immunitaires qui peuvent altérer la réponse cellulaire et/ou humorale. En fonction de la réponse aux mitogènes et/ou antigènes utilisés, le diagnostic peut être orienté vers certaines mutations présentées en Tableau 2. Dans le cas d'un antigène vaccinal, le test ne sera valable que s'il est effectué dans les 2 ans qui suivent une vaccination sauf pour la vaccination par le BCG dont la réponse mesurée est stable plus longtemps [92].

Type de déficit immunitaire héréditaire	TTL				Ref
	PHA	OKT3	PMA-Iono	Ag	
DICs avec nombre de lymphocytes >500/µL	- ou ↓↓↓			-	[94]
Syndrome d'Omenn	- ou ↓↓			-	[94]
Déficit en ZAP70	- ou ↓↓↓	- ou ↓↓↓	N	- ou ↓↓	[95]
Déficit en CD8A	N	N	N	N	[96]
Déficit en RMRP	↓↓	N ou ↓		N ou ↓	[97]
Déficit en IKBKB	N ou ↓	OKT3 : - ou ↓↓↓ OKT3+CD28 : - ou ↓ OKT3+CD28+IL-2 : N			[98,99]
Déficit dans le complexe CARD11-BCL10-MALT1 (CBM)	N ou ↓	OKT3+CD28 : - ou ↓↓			[100]
Déficit en ITK	N	OKT3+CD28 : - ou ↓			[101]
Défauts du flux calcique (ORAI1, STIM1)	↓ ou ↓↓↓	OKT3 : ↓ ou ↓↓↓ OKT3+CD28+IL-2 : ↓	↓ ou ↓↓↓	-	[102]
Déficit en PNP	↓↓↓	↓↓↓		↓↓↓	[103]
Défaut d'expression du CMH de classe II (CIITA, RFX5, RFXA, RFXANK)	N			-	[104]
Déficit en FOXN1	- ou ↓↓↓				[105]
Déficit en CORO1A	↓↓				[106]
Déficit en CD40 et CD40L	N			N	[107]
Syndrome de DiGeorge avec lymphopénie et diminution du % de cellules T naïves	N ou ↓			N ou ↓	

Tableau 2 : Résultats attendus du test de prolifération lymphocytaire en fonction du type de déficit immunitaire [108] N : normal ; - : négatif

VII.2 Suivi des produits d'aphérèse de photochimiothérapie extracorporelle (PCE)

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) ou photophérèse est une approche thérapeutique décrite en 1987 par Edelson et al [109]. Cette technique est basée sur l'administration de cellules mononuclées autologues exposées à un agent photosensibilisant et à une irradiation ultraviolette A (UVA).

Elle a montré son intérêt dans le traitement de certaines pathologies lymphoprolifératives T et auto-immunes [110].

Cette technique permet de diminuer les symptômes de ces pathologies tout en présentant peu d'effets indésirables.

Cependant, l'utilisation d'un procédé d'irradiation extracorporelle de cellules mononucléées humaines pose la question des contrôles qualité des produits sanguins. Ainsi, depuis la commission de thérapie génique et cellulaire du 7 avril 2011, l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) demande aux centres disposant d'appareil de photochimiothérapie extracorporelle d'effectuer des contrôles post-irradiation. « Le procédé doit être validé et des données relatives à un certain nombre de préparations doivent être fournies (fonction du niveau d'activité) afin de s'assurer de la maîtrise du procédé » [111].

VII.2.1 Indications et recommandations

Initialement développée pour le traitement des lymphomes T cutanés, la photochimiothérapie extracorporelle a aujourd'hui un spectre plus large d'indications [110] :

- Lymphomes T cutanés épidermotropes :
  - Lymphome de Sézary : reconnu par la Food and Drug Administration (FDA) depuis 1988
  - Mycosis Fongoïde
- Maladie du greffon contre l'hôte (GVH) (en seconde intention)
- Rejet de greffe d'organes solides
- Pathologies auto-immunes et inflammatoires (ne relève pas de la thérapeutique courante)

Dans l'ensemble, la PCE est une technique très bien tolérée qui entraîne très peu d'effets secondaires. Cela facilite son utilisation et son évaluation dans de nombreuses pathologies.

VII.2.2 Mécanisme d'action

La PCE est utilisée dans deux situations complétement opposées, d'un côté pour induire une réponse cytotoxique vis-à-vis de clones pathologiques (lymphomes T cutanés) et de l'autre pour induire une réponse immunomodulatrice tolérogène (GVH et rejet de greffe). Ses mécanismes d'actions apparemment contradictoires ne sont toujours pas élucidés mais des pistes ont été proposées.

a) Induction d'une réponse cytotoxique

La PCE a un effet antimitotique et pro-apoptotique sur les lymphocytes traités. La molécule photo-activable 8-MOP diffuse passivement dans les cellules lymphoïdes. Après avoir été activé par des UVA, le 8-MOP crée des liaisons covalentes entre les bases pyrimidiques, ce qui entraîne un arrêt de la réplication de l'ADN ainsi que des mutations et des erreurs de transcription [112]. La PCE a donc un effet antiprolifératif vis-à-vis des lymphocytes (plus particulièrement des lymphocytes T) [113]. Les lymphocytes traités qui sont réinjectés au patient vont alors entrer en apoptose dans les 48 à 72h [114]. Les monocytes et cellules dendritiques dérivées des monocytes ne subissent pas ou peu d'apoptose [115] mais vont augmenter leur capacité de phagocytose des lymphocytes en apoptose [112].

Des études récentes semblent montrer que la PCE induit une conversion rapide des monocytes en cellules dendritiques. Le fibrinogène, présent dans le plasma, se fixe sur la membrane de la PCE, puis les plaquettes se lient au fibrinogène et s'activent en exprimant la P selectine. Dans ces conditions, la liaison de la PSGL-1 monocytaire à la P selectine plaquettaire entraîne la différentiation des monocytes en cellules dendritiques qui vont pouvoir phagocyter des fragments de cellules tumorales lymphoïdes pour ensuite les présenter *in vivo* à des lymphocytes T [116]. Ce phénomène est bénéfique dans les lymphomes cutanés T notamment grâce à l'augmentation de la production de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques des lymphocytes pathologiques [112]. Cela permet d'expliquer l'obtention d'une réponse spécifique vis-à-vis des clones pathologiques ainsi que les rémissions obtenues alors que seulement 10 % du volume des lymphocytes pathologiques sont traités *ex vivo* [112].

b) Induction d'une réponse immunomodulatrice

Pour ce qui est du mode d'action immunomodulateur de la PCE utilisé dans le traitement de la GVH, il serait dû en partie à l'induction d'une tolérance aux antigènes provoquée par une bascule dans la balance des populations de cellules dendritiques DC1/DC2 en faveur des DC2. Cela atténuerait ainsi l'alloréactivité facilitée, en partie, par la sécrétion de cytokines TH1. En effet, les DC1 myéloïdes produisent de l'IL-12 qui induit les T helpers vers la voie TH1 alors que les DC2 plasmacytoïdes produisent moins d'IL-12 et induisent les T helpers vers la voie TH2 [117]. De plus, il a récemment été décrit que les cellules dendritiques traitées par PCE induisaient la différentiation d'une population immunomodulatrice de lymphocytes T CD8+ empêchant l'activation de lymphocytes T CD8 effecteurs dans un modèle d'hypersensibilité de contact chez la souris [118].

VII.2.3 Principe de la photochimiothérapie extracorporelle

La PCE se déroule en 4 étapes :

1. Prélèvement du sang du patient
2. Séparation des cellules mononucléées par cytaphérèse
3. Traitement des cellules mononucléées :
    - Addition ex-vivo d'une molécule photo-activable, le 8-méthoxysporalen (8-MOP)
    - Irradiation aux UVA
4. Réinjection au patient des cellules traitées

VII.2.4 Méthodes disponibles

Il existe deux types de procédures :

- Une procédure en système fermé : les 4 étapes de la PCE sont réalisées avec un appareillage unique, en une seule opération
- Une procédure en système ouvert qui nécessite de réaliser séparément chaque étape en utilisant à chaque fois un appareillage différent.

a) Système fermé:

L'appareil UVAR XTSTM (Figure 14) de la société américaine Therakos permet à la fois la séparation des cellules et l'irradiation par les UVA. Cet appareil reste connecté au patient tout au long de la procédure.

Les globules rouges du patient sont séparés des globules blancs et du plasma par centrifugation (les globules rouges et le reste du plasma sont réinjectés au patient). Le 8-MOP est ajouté aux leucocytes puis les cellules sont irradiées en passant sous un film mince entre deux rampes de lampes à UVA. Les cellules photoactivées sont ensuite réinjectées au patient.

Ce système fermé est utilisé par environ 40% des centres disposant d'appareils de photochimiothérapie. Il ne nécessite pas de mettre en œuvre des contrôles de qualité bactériologiques (pas de contamination car système fermé) ni de contrôles immunologiques (lots de 8-MOP et processus validés par le fournisseur).

Figure 14 : Appareil UVAR XTSTM, Therakos®

b) Système ouvert

Une poche de cellules mononucléées est prélevée par aphérèse et les cellules sont ensuite séparées à l'aide d'un séparateur de cellules Cobe Spectra. Ceci permet une extraction plus importante des cellules mononucléées qu'en système fermé avec une contamination minimale en globules rouges (<2%) (Tableau 3), les globules rouges pouvant limiter l'efficacité de l'irradiation. Cette étape dure environ 3h. La suspension cellulaire est transférée sous atmosphère contrôlée dans une poche adaptée à l'irradiation UVA dans laquelle est ajoutée le 8-MOP à une concentration de 200ng/ml. Puis, la poche est placée dans l'appareillage à irradiation Theraflex® ECP (Figure 15)

de MacoPharma™ ou dans l'UVA Biogenics® de Vilbert-Lourmat™. Le temps d'irradiation est calculé par l'appareil pour délivrer la dose nécesaire en fonction de l'hématocrite de la suspension cellulaire. Les cellules mononucléées sont ensuite réinjectées le plus rapidement possible au patient.

Ce système ouvert nécessite de mettre en œuvre des contrôles qualité. Il est utilisé dans près de 60% des centres disposant d'appareils de photochimiothérapie en France.

Figure 15 : Appareillage Theraflex®, ECP

VII.2.5 Comparaison des deux systèmes

	Système fermé	Système ouvert
Avantages	• Simplicité de mise en œuvre et de réalisation • Système « tout en un » • Utilisation d'un 8-MOP de qualité pharmaceutique	• Contamination minimale en globules rouges (Ht<2%) • Extraction d'une quantité supérieure de cellules mononucléées • Contrôle qualité avant et après irradiation possible • Technique adaptée aux petits volumes et à la pédiatrie • Utilisation d'appareils non dédiés • Coûts réduits par rapport au système fermé • Permet d'autres application hors PCE
Inconvénients	• Volume extracorporel important • Contamination en globules rouge (Ht>4%) • Coût plus important • Volume traité plus faible que pour le système ouvert • Absence de contrôles après irradiation	• Risque de contamination bactérienne des poches • Possibilité d'erreur d'attribution • Autorisation de réalisation de thérapie cellulaire nécessaire (8-MOP à statut produit thérapeutique annexe) • Coût de personnel

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des différents systèmes de PCE disponibles

VII.2.6 Procédures de contrôle post-irradiation

Comme évoqué précédemment, seul le système ouvert peut être sujet à des contrôles. En plus des contrôles bactériologiques, on peut contrôler l'effet antiprolifératif lié à l'irradiation des lymphocytes.

Pour la bactériologie, deux hémocultures (aérobies et anaérobies) sont ensemencées avec des cellules mononuclées du patient. Elles doivent être répondues négatives au bout de 10 jours d'incubation.

Pour les contrôles immunologiques, le test de prolifération lymphocytaire permet de s'assurer de l'effet inhibiteur de l'irradiation UVA sur les lymphocytes. La mesure du TPL avant et après irradiation permet d'évaluer l'effet antiprolifératif de la PCE et de contrôler ainsi l'efficacité de la procédure. Il est applicable quelle que soit la pathologie (tumorale ou non) même en cas de traitements immunosuppresseurs.

VII.3 Suivi d'une greffe de « cellules souches hématopoïétiques »

Lorsqu'un patient subit une greffe de cellule souches hématopoïétiques, il est possible d'évaluer le retour à une réponse lymphocytaire T normale grâce au test de prolifération lymphocytaire.

A partir de 1000 lymphocytes/µL, on effectue un test en stimulant la prolifération avec de la PHA, Si le test est positif, on vaccine le patient et on teste la réponse vaccinale *in vitro* un mois après la troisième injection (Figure 16).

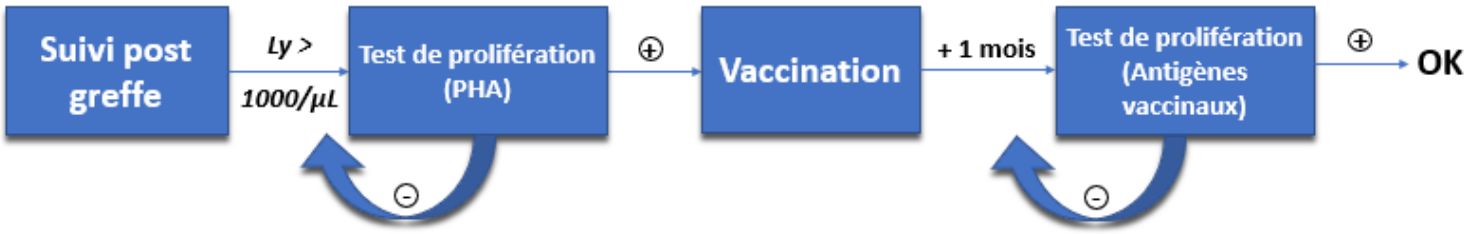


Figure 16 : Stratégie de réalisation des tests de prolifération lymphocytaire dans le cas d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques [108]

VII.4 Diagnostic des hypersensibilités retardées (HSR)

Les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) sont définies comme celles qui surviennent plus de 6 heures après une exposition aux allergènes et dépendent de mécanismes cellulaires impliquant principalement les lymphocytes T.

Le TPL est un outil biologique qui a montré son efficacité dans le diagnostic de l'HSR. Il est déjà validé dans le diagnostic de la bérylliose pulmonaire dont il permet la déclaration en tant que pathologie d'exposition professionnelle [119]. Il a un réel intérêt du fait de son innocuité pour le patient. Il a également une bonne spécificité et une sensibilité équivalente aux tests cutanés. Pour augmenter la sensibilité globale, il peut d'ailleurs être associé aux tests cutanés. Il a également un intérêt lorsque les tests cutanés ne peuvent pas être effectués (syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse, toxidermies nécrosantes ou impossibilité de tester l'allergène suspect). L'association de techniques complémentaires telles que le dosage des cytokines dans le surnageant de culture (ELISpot, ELISA…) permet également d'augmenter la sensibilité du TPL.

Il nécessite des formulations permettant l'utilisation en culture des allergènes et il ne permet pas d'évaluer une réactivité vis-à-vis des métabolites des produits suspects.

Par ailleurs, le TPL est un test cher, chronophage, nécessitant un laboratoire spécialisé.

La physiopathologie de l'HSR ainsi que les caractéristiques et modalités d'application du TPL dans ce contexte sont abordées en détail dans l'article publié en Avril 2020 dans la Revue Francophone des Laboratoires intitulé « Diagnostic de l'hypersensibilité retardée des mécanismes immunologiques aux tests de diagnostic *in vivo* et *in vitro* ».

Dossier scientifique

Diagnostic de l'hypersensibilité retardée : des mécanismes immunologiques aux tests de diagnostic *in vivo* et *in vitro*

Julien Serrier[1], Juliette Charpy[2], Maxime Cravat[3], Brigitte Le Mauff[1,4], Anthony Leon[5], Julien Goret[2,*], pour le réseau AllergoBioNet[6]

1 Laboratoire d'immunologie, CHU de Caen, avenue de la Côte-de-Nacre, CS 30001, 14033 Caen cedex, France.
2 Laboratoire d'immunologie et immunogénétique, hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux, place Amélie-Raba-Léon, 33076 Bordeaux cedex, France.
3 Laboratoire d'immunologie, CHU de Nancy, rue du Morvan, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France.
4 Normandie Université, UniCaen, esplanade de la Paix, 14000 Caen, France.
5 Laboratoire de biologie médicale, centre hospitalier Émile-Durkheim, 3 avenue Robert-Schuman, 88021 Épinal cedex, France.
6 AllergoBioNet – Réseau des biologistes de l'allergie des centres hospitaliers, www.allergobionet.fr

*Auteur correspondant : julien.goret.ext@chu-bordeaux.fr (J. Goret).

Résumé

Les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) sont définies comme celles qui surviennent plus de six heures après une exposition aux allergènes et font intervenir l'immunité à médiation cellulaire. La peau est l'organe le plus souvent atteint dans les HSR aux produits naturels ou de synthèse ainsi qu'aux médicaments. La plupart des éruptions cutanées sont bénignes et spontanément résolutives, mais certaines sont graves, entraînant un risque élevé de morbidité et de mortalité. Elles doivent être reconnues tôt et gérées rapidement. La démarche diagnostique repose sur une anamnèse exhaustive, des tests *in vivo* tels que l'intradermoréaction retardée, le patch-test ou le test de provocation orale et des tests biologiques *in vitro* explorant l'activité de lymphocytes T spécifiques. Les performances de ces tests varient selon les manifestations cliniques. Les avancées concernant l'immunopathogenèse ont permis d'identifier des allèles HLA associés aux manifestations cliniques et ainsi de déterminer des facteurs de prédisposition. Cet article décrit les caractéristiques et la place actuelle de ces tests selon les phénotypes d'HSR.

© CULTURA/IMAGE SOURCE / BSIP

Mots clés
- allergie
- diagnostic
- HLA
- hypersensibilité retardée
- médicament

Keywords
- allergy
- delayed hypersensitivity
- diagnosis
- drug
- HLA

Abstract

Delayed hypersensitivity reactions: phenotypes, predisposing factors, diagnosis and management

Delayed hypersensitivity reactions (DHR) are defined as reactions that occur more than 6 hours after exposure to small reactive molecules or drugs. The skin is the most often affected organ. Potentially life-threatening severe cutaneous adverse reactions (SCAR) are associated with a high risk of morbidity and mortality. They should be recognized and managed early by clinicians. The diagnostic workup is based on a precise anamnesis, a history of past events, *in vivo* tests such as delayed intradermal testing, patch-test or oral challenge and *in vitro* biological tests exploring the specific lymphocyte activity. Advances in understanding the delayed T cell–mediated reactions lead to identification of predisposing of HLA alleles. We describe the performance of these tests regarding the HSR phenotypes.

© 2020 – Elsevier Masson SAS
Tous droits réservés.

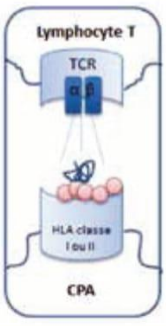
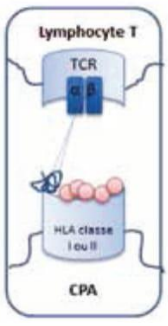
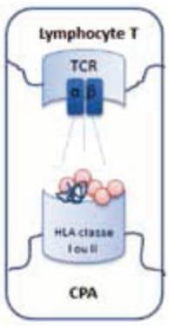
Introduction

Les réactions d'hypersensibilité retardée (HSR) sont définies comme celles qui surviennent plus de six heures après une exposition aux allergènes. Ces derniers comprennent des antigènes issus d'agents pathogènes intracellulaires persistants (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, etc.) ou d'agents non infectieux, comme les médicaments, les métaux ou de petites molécules naturelles ou de synthèse chimiquement réactives (silice, béryllium, parfums, cosmétiques, etc.). Les facteurs influençant le déclenchement des réactions d'HSR sont multiples et déterminent une sensibilité individuelle : on retrouve ainsi l'âge, le sexe, le statut immunitaire, les infections, les facteurs environnementaux, les conditions d'exposition (dose, fréquence), la voie d'exposition (orale, cutanée, respiratoire) et la nature de l'allergène.
Les manifestations cliniques des HSR sont multiples et incluent principalement des manifestations cutanées telle que des éruptions morbilliformes et urticariennes typiques ainsi que des réactions plus graves et potentiellement fatales. L'eczéma de contact (EC) touche 5 à 20 % de la population des pays industrialisés. Elle représente jusqu'à 20 % des maladies professionnelles et 4 000 molécules potentiellement allergisantes ont été recensées. Les réactions sévères concernent les réactions indésirables cutanées graves aux médicaments (SCARs pour *Severe Cutaneaous Adverse Drug Reaction*) : on retrouve le syndrome de Stevens-Johnson (SJS) ou de nécrose épidermique toxique (TEN pour *Toxic Epidermal Necrolysis*), le syndrome de réaction au médicament avec éosinophilie et troubles systémiques (Dress) et des maladies d'atteinte d'organe unique (foie et rein). Ces manifestations sont rares avec une incidence de 0,35 à 9 par million de patients exposés [1].
Dans cette revue de la littérature, nous abordons les mécanismes immunologiques impliqués dans les réactions d'HSR. Nous décrivons les manifestations cliniques, les facteurs de prédisposition et les tests diagnostiques *in vivo* et *in vitro* réalisables en décrivant leur positionnement, leurs performances et leurs limites.

Physiopathologie des HSR : les mécanismes immunologiques impliqués

On peut parler indifféremment d'immunité à médiation cellulaire, d'hypersensibilité de type IV ou d'HSR, dans la mesure où les manifestations pathologiques sont liées à des réponses immunitaires à médiation cellulaire. Les réactions d'HSR se déroulent selon deux phases. La première phase asymptomatique, dite de contact ou de sensibilisation, correspond à l'activation de lymphocytes T helper (LTh) et la production de cytokines et de lymphocytes mémoires (Tmem). L'activation des lymphocytes T repose sur trois principaux modèles [2-5], non exclusifs, décrits dans le ***tableau I*** [4]. Lors d'un second contact avec l'allergène, celui-ci est reconnu par les lymphocytes Tmem générés qui s'activent. Ils secrètent alors des cytokines qui vont permettre le

Tableau 1. Physiopathologie des hypersensibilités médiées par les lymphocytes T.

	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	

D'après [2-5].

Tableau 1. Classification révisée de Gell and Coombs pour l'hypersensibilité de Type IV ou hypersensibilité retardée.

Types	Médiateurs cellulaires	Cytokines médiatrices	Phénotypes ou manifestations cliniques
Type IVa	1re phase : Th1 2nde phase : macrophages	IFNγ TNFα IL-18	Eczéma de contact
Type IVb	1re phase : Th2 2nde phase : éosinophiles, lymphocytes B, IgE, IgG4, mastocytes	IL-4 IL-5 IL-13	Exanthème maculopapuleux Dress
Type IVc	Lymphocytes T cytotoxique → destruction immédiate de la cellule	Granzyme B Perforine Fas Ligand Granulysine	Érythème multiforme SJS/TEN Érythème pigmenté fixe (FDE, *Fixed Drug Erythema*) Lésion hépatique d'origine médicamenteuse (DILI, D*drug-Induced Liver Injury*)
Type IVd	1re phase : Th1/Th17 2nde phase : neutrophiles	GM-CSF IL-8 CXCL8	AGEP

Le mécanisme de la toxidermie flexurale ou syndrome babouale (Sdrife, *Symetrical Drug Prelated Intertriginous and Flexural Exantheme*) n'est pas connu.

recrutement des cellules effectrices : les lymphocytes T cytotoxiques (LTc), les macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les polynucléaires éosinophiles ***(tableau 2)***. Celles-ci infiltrent le site d'exposition à l'antigène et induisent une inflammation et des dommages tissulaires.

L'EC au nickel est un exemple d'hypersensibilité de type IVa basée sur le concept d'haptène où le nickel lié à une protéine de la peau forme un néo-antigène (métalloprotéine). Les cellules de Langerhans captent ce néo-antigène, le dégradent et présentent un complexe peptide-nickel/CMH (pCMH) aux lymphocytes Th1 naïfs au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Ces derniers sont activés, se différencient en lymphocytes effecteurs et Tmem qui circulent et retournent dans la peau par chimiotactisme. En effet, la présence du néo-antigène stimule les cellules de la peau et les macrophages qui libèrent de nombreuses chemokines attirant les lymphocytes dans la zone touchée. Au moment où le patient est exposé à nouveau au nickel, les lymphocytes sécrètent alors de nombreuses cytokines dont l'IFNγ. Celui-ci active localement les macrophages et les kératinocytes qui prolifèrent entraînant une hyperplasie et un épaississement de la peau. Ces cellules produisent à leur tour des cytokines inflammatoires, augmentent l'expression des CMH et des récepteurs au TNF ainsi que la production de radicaux oxygénés responsables des dommages tissulaires. De plus, les LTc détruisent directement les cellules de la peau présentant des pCMH et perpétuent l'inflammation locale.

Le Dress, qui illustre l'hypersensibilité de type IVb, est associé à une activation de la voie Th2 induisant une forte production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et le recrutement des éosinophiles. L'étude immunohistochimique de biopsies cutanées a également révélé la présence de perforine, de granzyme B, de Fas ligand (FasL) et d'IFNγ [6]. La réactivation des virus du groupe herpès serait également impliquée dans la pathogenèse du Dress. Il a été démontré que les cellules T activées présentaient des spécificités dirigées contre les herpès virus humain 6 et 7, du virus Epstein-Barr, et du cytomégalovirus [7]. Ces observations pourraient être expliquées par la notion d'immunité hétérologue : les cellules T spécifiques du médicament seraient du fait de réactivité croisée des cellules Tmem spécifiques de ces virus capables d'infection persistante et de réactivations intermittentes.

L'hypersensibilité de type IVc correspond au concept p-i et a pour phénotype le SJS notamment. Ce type de réaction ne nécessite pas de phase de sensibilisation ni d'apprêtement antigénique et induit une réaction immédiate des LTc et des lymphocytes T *natural killer* [8]. Ces cellules provoquent l'apoptose directe des kératinocytes présentant l'antigène en produisant du granzyme et des peptides cytotoxiques en concentrations élevées [3].

La pustulose exanthémateuse aiguë généralisée ou l'*Acute Generalized Exanthematous Pustulosis* (Agep) est la manifestation clinique qui illustre l'hypersensibilité de type IVd. Au cours de la phase initiale, les vésicules sont composées principalement de cellules Th1 spécifiques du médicament et de kératinocytes. Les kératinocytes vont recruter activement les PNN par la production de chemokines telles que le CXCL8 et assurer leur survie et leur multiplication par la production de GM-CSF et d'IL-5. Les cellules Th17 peuvent également jouer un rôle dans l'Agep par la libération d'IL-17 et d'IL-22, qui ont un effet synergique sur la production de CXCL8 par les kératinocytes [9]. Des taux de granzyme élevés suggèrent également que cette dernière pourrait jouer un rôle dans l'Agep [10].

Clinique et diagnostic différentiel des HSR

Atteintes cutanées

Eczéma de contact

Syndrome le plus bénin, il apparaît chez un individu sensibilisé 24 à 48 heures après un nouveau contact avec l'allergène. On observe des lésions très prurigineuses, sous forme de placards érythémato-papuleux, inflammées à contours irréguliers. Celles-ci évoluent en lésions suintantes après rupture des vésicules et s'accompagnent de lésions de grattage, puis vers une phase croûteuse ou une desquamation avant une guérison sans cicatrice.

Ce syndrome peut être confondu avec une dermatite d'irritation qui est généralement localisée au niveau de la peau qui a été en contact d'une substance irritante, d'apparition plus rapide et présentant des lésions à bord net. La dermatite atopique se distingue par une atteinte cyclique touchant les plis, la tête et le cou chez un patient atopique. Ces dernières peuvent néanmoins favoriser l'EC.

Toxidermies

On parle de toxidermie pour tout effet indésirable cutané lié à une prise médicamenteuse. Elles sont potentiellement graves pouvant mettre en jeu le pronostic vital. La plupart de ces pathologies sont syndromiques ***(tableau 3)*** [11-13].

Atteintes immuno-allergiques spécifiques d'organes

Les HSR peuvent atteindre d'autres organes de manière concomitante ou non (cas rares) aux toxidermies. Les atteintes décrites dans la littérature sont les suivantes : hématopoïétique, hépatique, rénale, pulmonaire, pancréatique, intestinale et myocardique. Le diagnostic est difficile en raison d'une physiopathologie qui reposerait sur la destruction de l'organe par des lymphocytes T activés. La présence de granulome peut être observée. Les macrophages stimulés par les cellules T n'arrivent pas à éliminer l'allergène causal (silicose, béryllium, etc.) et l'enferment alors dans une formation histologique composée de cellules multinucléées géantes. Dans ce processus, de nombreuses cytokines sont produites dont le TNFα, l'IL-2 et le GM-CSF. Le diagnostic repose sur la recherche de réaction lymphocytaire spécifique (cf. démarche diagnostique *in vitro*) et sur un faisceau d'arguments.

Détermination de l'imputabilité

Il est nécessaire devant toute suspicion d'HSR de réaliser un interrogatoire précis pour recueillir l'ensemble des données cliniques, chronologiques (délai d'apparition, réapparition si nouvelle exposition et évolution à l'arrêt de l'exposition) et sémiologiques (clinique, facteurs favorisants et diagnostics différentiels). Il faut noter que l'atopie n'est pas un facteur de risque de toxidermie.

Il ne faut pas oublier qu'étiqueter à tort un patient comme étant allergique à un médicament peut avoir de lourdes conséquences sur les choix thérapeutiques et est plus délétère pour le patient qu'un bilan allergologique complet.

Démarche diagnostique *in vivo*

La positivité des tests cutanés, patchs tests (PT) et/ou intradermoréactions (IDR), est un argument fort pour définir l'imputabilité du produit ou du médicament. À l'inverse, leur négativité n'exclut pas une HSR. La valeur diagnostique des tests cutanés dépend de la nature de la réaction cutanée et du type de molécule impliquée. Leur spécificité est excellente mais leur sensibilité est variable ***(tableau 4).*** Il est généralement admis d'effectuer les tests au moins quatre à six semaines après la réaction aiguë [14]. Quand c'est possible, il faut avoir arrêté les corticoïdes et les dermocorticoïdes depuis au moins sept jours ou les traitements immunosuppresseurs un mois avant les tests.

Patch test

La méthode de réalisation des PT est indiquée dans les réactions cutanées allergiques aux médicaments et dans l'allergie de contact. Les recommandations européennes les placent avant les IDT [15]. Leur réalisation est relativement standardisée en Europe par l'utilisation d'allergènes en dispositifs commerciaux (batterie standard européenne pour l'EC) ou préparés à la demande par les pharmacies hospitalières. Les composés sont dissous dans de la vaseline ou de l'eau et appliqués soit sur un disque en papier filtre ou une bande dans la chambre du patch. La stabilité des préparations pour PT n'est pas décrite dans la littérature. Généralement, les patchs sont disposés sur la partie supérieure plate du dos, bien que cette région ait la plus faible densité en lymphocytes T résidents. La sensibilité relative du dos par rapport aux autres sites est inconnue [14,16]. Les tests sont laissés en place 48 heures puis retirés et repérés. Une première lecture est réalisée à 48 heures puis à 96 heures et à sept jours. Il n'existe pas de contrôle positif approprié. Les PT doivent être préparés avec le médicament dans sa forme commerciale, chaque médicament étant dilué à 30 % [14] ou 20 % [17]. L'étude de Brajon *et al.* a montré que la concentration en principe actif variait de 0,05 à 30 % dans les préparations à base de vaseline issues de comprimés broyés [18]. Des études complémentaires sont nécessaires pour maîtriser ces

Tableau 3. Phénotypes

Phénotype	Manifestations cutanées	Autres signes cliniques	Délai d'apparition
Exanthème maculo-papuleux	Éruption érythémateuse maculopapuleuse polymorphe (scarlatiforme voire rubilliforme) Atteinte du tronc avec extension symétrique vers les membres	Sub-fébrile (< 38,5 °C) Prurit parfois intense	Éruption du 9e jour (4-14 jours) 2-3 jours après réintroduction
Sdrife	Érythème maculopapuleux, délimité, souvent symétrique, localisé au niveau des plis de flexions, interfessiers, inguinaux et périgénitaux	Fièvre inconstante	5 à 10 jours après initiation du traitement Quelques heures à quelques jours après réintroduction
Agep	Érythème, rouge vif, œdémateux, diffus en nappe (scarlatiniforme) d'éruption brutale. Associé à l'apparition rapide (heures) de nombreuses petites pustules stériles non folliculaires, blanches Localisation majoritaire dans les grands plis.	Fièvre Prurit +/- altération de l'état général	1 à 5 jours (jusqu'à 3 semaines)
Dress 3 des 4 critères obligatoires signalés en gras **Syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse**	Exanthème maculeux inflammatoire, diffus avec prurit, polymorphe et variable Enanthème possible	Œdème facial **Fièvre > 38 °C** **Lymph-adénopathies** **Atteinte d'un organe**: hépatite (+++) pneumopathie interstitielles, néphropathies interstitielles, myocardite	2 à 6 semaines
FDE	Lésion(s) maculeuse(s), rouge-brune(s), +/- bulleuse(s) Récidive de la ou des lésions au même endroit après réexposition	+/- syndrome pseudo-grippal	Quelques jours à quelques semaines Quelques heures après ré-introduction
SJS (< 10 % de la surface corporelle) **TEN** (> 30 % de la surface corporelle) **Syndrome transitoire** (10-30 %)	Macules érythémateuses étendues et diffuses Puis érosion et bulles multifocales avec décollement cutané en lambeaux à la moindre pression (syndrome de Nikolski en doigt de gant) due à nécrose de l'épiderme Mise à nu du derme sur une grande surface corporelle Érosion des muqueuses : oculaire, orale, génitale, anale, urinaire, trachéale, bronchique…	Fièvre AEG Brûlures oculaires Atteintes respiratoires	4 à 28 jours

D'après [10-12].

Tableau 4. Utilisation des patch-tests (PT), des intradermo-réactions (IDT)

Phénotypes	IDT	Patch-test	TP
Exanthème maculo-papuleux	Potentiellement utile TP direct serait indiqué dans en cas de faible imputabilité du médicament Sensibilité : 6 à 36 %	Utile Positif dans 10 à 40 % des cas	Après tests cutanés retardés négatifs dans situations peu probables VPN : 90 %
Eczéma de contact	Potentiellement utile	Utile	Après tests cutanés retardés négatifs VPN non décrite
Sdrife	Potentiellement utile	Utile Positif dans 52 à 82 % des cas	Après tests cutanés retardés négatifs VPN non décrite
FDE	Pas de données	Utile si application au niveau des zones précédemment lésées Jusqu'à 41 % de positivité	À dose totale quand le patch test est négatif VPN non décrite

D'après [18].

cliniques des toxidermies.

Anomalies biologiques	Molécules associées	Diagnostic différentiel	Évolution
Hyperéosinophilie	Antibiotiques (β-lactamines, sulfamides) Allopurinol Antiépileptiques Antituberculeux	Éruption bactériennes ou virales (scarlatine, rubéole…)	Bénigne Disparition en 1 semaine
	Pénicillines A	Infections streptococciques, ou virale (Parvovirus B19)	
Hyperleucocytose avec : neutrophilie importante +/- éosinophilie	Antibiotiques (pénicillines A, pristinamicine, gluoroquinolones, macrolides) Hydroxychloroquin Diltiazem	Psoriasis pustuleux généralisé Infection cutanée	Régression spontanée en quelques jours Desquamation Mortalité < 5 %
Anomalie hématologique: Éruptionosinophilie > 1G/L lymphocytes activés lymphocytoses lymphopénie thrombopénie	Anticonvulsivants (Carbamazepine, phénobarbital, lamotrigine) Allopurinol, Antibiotiques (β-lactamines, fluoroquinolones, sulfamides, minocycline) Abacavir Nevirapine	Éruptions virales (réactivation HHV6/7/8, CMV ou EBV) Érythrodermies Dermites de contact Lymphomes T épidermotropes Syndrome hyperéosino-philiques	Lente sur plusieurs semaines Mortalité jusqu'à 10 %
	Paracétamol AINS Tétracycliques Sulfonamides Barbituriques	Maladies bulleuses auto-immunes	Disparition des lésions inflammatoires en quelques jours avec une hyperpigmentation résiduelle
Troubles hydro-électroliques Insuffisances rénales Cytolyse hépatique Atteinte hématologique	Sulfamides Carbamazépine phénobarbitale, Phénitoïne Névirapine AINS (oxicams) Allopurinol	épidermolyse staphylococcique (absence d'érosion des muqueuses) Maladies bulleuses auto-immunes	Mortalité élevée (10 à 50 % en fonction de la gravité d'atteinte cutanée) Atteintes respiratoires = mauvais pronostiques Complications infectieuses Séquelles cutanées fréquentes Risque de cécité

et du test de provocation (TP) pour l'exploration des réactions retardées.

Phénotypes	IDT	Patch test	TP
Agep	Potentiellement utile	Utile La sensibilité dépend du médicament testé : 58 à 64 %	Contre-indiqué : risque de réaction systémique
Dress	Sensibilité : 64 à 100 % Sécurité actuellement inconnue	Utile Positif dans 32 à 80 % des cas selon le médicament testé	Contre-indiqué : risque de réaction systémique
SJS/TEN	Considérée comme contre-indiquée bien que réactions graves rares	Faible sensibilité : 9 à 24 %	Contre-indiqué : risque de réaction systémique
Dili	Faible sensibilité s'il n'y a pas d'atteinte cutanée associée	Faible sensibilité s'il n'y a pas d'atteinte cutanée associée	Contre-indiqué : risque de réaction systémique

concentrations finales. Des protocoles de réalisation régulière des PT sont proposés pour le SJS/TEN et le Dress [19].

Intradermoréaction retardée

L'IDR retardée présente un intérêt lorsque des formes solubles et stériles des médicaments sont disponibles. Elle est plus sensible que le PT pour l'exanthème maculopapuleux et le Dress ***(tableau 4)*** et présente un risque minime, en particulier si six mois ou plus se sont écoulés depuis la réaction initiale [20,21]. L'IDR est réalisée par injection de la préparation à tester (0,02 à 0,05 mL) dans le derme au niveau de la surface palmaire de l'avant-bras. Un contrôle négatif correspondant à du sérum physiologique est recommandé. En l'absence de contrôle positif approprié, celui-ci n'est pas réalisé [22, 23]. Les critères de positivité des résultats et la concentration du médicament ont une influence sur la sensibilité et la spécificité de l'IDR. Il est recommandé de lire la réaction à quinze minutes pour éliminer une réaction immédiate à des produits histamino-libérateurs. Une IDR retardée est considérée positive par l'apparition entre 24 et 48 heures d'un érythème et d'une infiltration dépassant de 5 mm la ligne de base tracée au moment de l'application [24]. Aujourd'hui, les concentrations utilisées sont celles définies pour les *prick tests* dans l'exploration des réactions immédiates [24]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires ; d'autant que l'activation des lymphocytes T est dose-dépendante et nécessite donc l'application de différentes dilutions.

Test de provocation

Le test de provocation (TP) est toujours considéré comme la référence pour l'exploration des hypersensibilités aux médicaments. Il peut être combiné aux tests cutanés. Il n'existe pas de consensus pour sélectionner les patients qui seraient les candidats appropriés pour bénéficier d'un TP d'emblée ou après une IDR ou un PT négatif ; il est toutefois admis d'éviter les TP en cas de résultat positif à l'IDR ou au PT. Le TP est donc réservé aux patients considérés à faible risque. En cas d'antécédents clairs d'exanthème bénin, l'administration d'une dose unique est considérée comme sans danger et présente un taux d'événements indésirables de 6,9 % [25]. Dans les manifestations graves, le risque de réaction systémique est accru. Un test unique peut être négatif. Cependant, une épreuve prolongée avec évaluation à cinq-sept jours (contre trois jours) augmente la sensibilité du test. La valeur prédictive négative (VPN) du TP est rassurante (> 90 %), notamment pour les antibiotiques [26-28]. En général, s'il existe un autre médicament efficace, les médicaments de structure apparentée ne doivent pas être réintroduits. Cependant, pour certaines pathologies, comme le VIH et la tuberculose, le rapport bénéfice-risque oriente vers la remise en cause séquentielle des médicaments potentiellement impliqués.

> La valeur diagnostique des tests cutanés dépend de la nature de la réaction et de la molécule impliquée

Démarche diagnostique *in vitro* ou *ex vivo*

Les tests biologiques peuvent être un apport pour l'identification de l'agent responsable en complément des tests réalisés *in vivo* et présentent l'avantage de leur innocuité. Mais, au regard des mécanismes impliqués, on peut supposer que leur efficacité puisse être variable selon les formes cliniques : dans le contexte de réponse cellulaire spécifique qui est le support de ces allergies, ils visent tous à mettre en évidence une réponse lymphocytaire Tmem.

Test de prolifération lymphocytaire

Le test de prolifération lymphocytaire (TPL) ou test de transformation lymphoblastique (TTL) est la méthode la plus fréquemment utilisée pour étudier la réponse spécifique des lymphocytes T vis-à-vis d'allergènes (principalement médicaments et métaux). Les lymphocytes Tmem présensibilisés du patient vont être activés *in vitro* [29].

À partir de sang hépariné, on isole les cellules mononucléées par centrifugation sur un gradient de densité puis elles sont mises en culture trois à sept jours en présence de l'allergène. La réplication de l'ADN ou la division cellulaire sont mesurées : la réponse sera comparée à celle mesurée sans stimulation et validée par un contrôle positif avec un mitogène. Le marqueur le plus souvent utilisé est la thymidine tritiée (radioactive) qui s'incorpore à l'ADN en synthèse et on mesure le nombre de coups par minute (cpm). Le résultat est exprimé en index de stimulation (SI : cpm de la prolifération avec l'allergène/cpm de prolifération sans allergène) et est considéré comme positif si supérieur 2. Des traceurs alternatifs non radio-actifs, comme le bromodéoxyuridine ou le 5-éthynyl-2'déoxyuridine [30], mesurés par cytométrie en flux (CMF), peuvent aussi être utilisés. La division cellulaire peut être évaluée par un marqueur intracytoplasmique fluorescent avant stimulation, comme

le carboxyfluorescein succinimidyl ester dont la distribution dans chaque cellule-fille est quantifiée par CMF. Il est également possible de mesurer l'expression de marqueurs d'activation lymphocytaire membranaires (CD69) [31] ou de marqueurs nucléaires de division cellulaire (Ki67) [32].

La sensibilité des TPL réalisés avec la thymidine tritiée est très variable et peut aller de 22 à 75 % et la spécificité de 63 à 100 %, pour les β-lactamines, les anticonvulsivants et les anesthésiques locaux [33]. La sensibilité est supérieure (58-89 %) pour les patients ayant présenté des réactions allergiques d'intensité faible ou modérée comparativement à celle observée pour des réactions plus sévères (25-75 %) [33]. La sensibilité est aussi dépendante de la nature de l'allergène et du délai par rapport à la symptomatologie clinique : il serait ainsi préférable de réaliser le test entre deux semaines et trois mois après la réaction dans le cadre s'un syndrome de SJS/TEN et plus tardivement pour un Dress.

Une méthode dérivée du TPL, Melisa® memory lymphocyte immunostimulation assay [34], principalement utilisée pour évaluer les réponses aux métaux, est réalisée dans des conditions de déplétion partielle en monocytes. Ses faibles sensibilité et spécificité comparativement au TPL qui ont été confirmées vis-à-vis du nickel et du mercure [35] ne lui confèrent donc aucune supériorité.

Évaluation de l'activation fonctionnelle

L'ELISpot *(enzyme-linked immunospot)* [36] est une technique qui permet de déterminer le nombre de lymphocytes T effecteurs produisant une cytokine en réponse à la stimulation par un antigène. Les cellules mononucléées du patient sont cultivées dans des puits recouverts d'anticorps anti-cytokines (le plus souvent anti-IL4 et anti-IFNγ). Après une incubation de 18 à 24 heures en présence ou non d'un allergène, les cellules sont éliminées et un second anticorps spécifique de la cytokine, couplé à une enzyme est ajouté. Le nombre de taches (spots) révélées par le substrat chromogène est alors compté. Le résultat est exprimé en nombre de cellules formant des spots par million de cellules. Ce test est très sensible et permet de détecter 25 cellules sécrétrices/10^6 cellules mononucléées et la sensibilité de l'Elispot-IFNγ semble supérieure à celle du TPL pour les syndromes de SJS/TEN (35 % contre 71 %, respectivement) [33]. L'activation lymphocytaire peut aussi être évaluée en mesurant les cytokines produites (IL-2, IL5, IL-13, IFNγ) ou des marqueurs de cytotoxicité (granzyme B, granulysine) par Elisa ou CMF. La combinaison de ces différentes techniques pourrait augmenter considérablement la sensibilité de la technique (> 80 %) [37].

Limites et perspectives

À l'heure actuelle, les tests *in vitro* de diagnostic de l'HSR sont chers, chronophages, donnent peu de résultats positifs et sont réalisés dans des laboratoires spécialisés. Ils nécessitent des formulations qui permettent leur usage en culture, et n'évaluent pas une sensibilisation vis-à-vis des métabolites des produits suspectés. En France, très peu de laboratoires réalisent ces tests, et les techniques « chaudes » laissent place de plus en plus à la CMF moins contraignante. Si un TP n'est pas toujours possible pour la confirmation de la responsabilité du produit, les tests *in vitro* sont aussi sensibles que les tests cutanés et ont une bonne spécificité. Il serait souhaitable de les y associer pour améliorer la sensibilité globale. La standardisation des méthodes, un programme d'évaluation externe de qualité, le développement de techniques plus sensibles et leurs éventuelles combinaisons pourraient permettre d'améliorer la sensibilité. Celle-ci devrait alors être évaluée dans des études plus larges. Il faut rappeler que dans le contexte du diagnostic de pathologies d'exposition professionnelle, comme la bérylliose pulmonaire chronique, le TPL est un outil diagnostique incontesté.

Prédire les réponses des cellules T : typage HLA

De nombreuses études ont démontré l'association d'allèles HLA aux réactions graves à médiation cellulaire T à certains médicaments ***(tableau 5)***. L'association entre SJS/TEN et HLA-B*57:01 a conduit à la mise en œuvre du test de dépistage en routine avant le traitement par l'abacavir. Ce test a une valeur prédictive positive de 55 % et une VPN de 100 %, exigée pour l'innocuité des médicaments. Le principal obstacle au dépistage HLA systématique pour de nombreux médicaments tient au fait que l'association d'un HLA est nécessaire mais n'est pas prédictive du développement de l'HSR. Il faudrait donc tester un nombre extrêmement élevé de patients afin de prévenir un cas d'HSR. Par exemple, dans le cas de l'hépatite à la flucloxacilline et HLA-B*57:01, près de 14 000 dépistages seraient nécessaires pour prévenir un cas d'hépatite. La mise en œuvre du dépistage de l'HSR à l'abacavir dans la pratique clinique a été couronnée de succès, car :

- peu de patients sont testés pour prévenir un cas ;
- les traitements anti-VIH sont prescrits par un nombre de spécialistes restreints ;
- la VPN est excellente ;
- l'accès au dépistage dans les laboratoires est facile.

Tableau 5. Association d'allèles HLA aux médicaments dans les manifestations d'hypersensibilité retardée.

Molécule	Manifestation clinique	Allèle HLA	Populations étudiées	OR	VPN	VPP	NNT	Remarques
Abacavir	Rash, fièvre, malaise, troubles gastro-intestinaux	B*57:01	Caucasienne, africaine, afro-américaine	690	100 % (patch test)	55 %	13	En routine pour le VIH dans le monde
Allopurinol	SJS/TEN Dress	B*58:01	Caucasienne, chinoise	> 800	100 % (population chinoise)	3 %	250	Dépistage sélectif
Efavirenz	Rash	DRB1*01	Française	-	-	-	-	-
Nevirapine	Dress	B*14/Cw8 Cw8 Cw4 DRB1*15 B*3505 B*3501 B*15/DRB1*15	Italienne, japonaise, chinoise (Han), asiatique, australienne	-	-	-	-	-
	Rash	B*35:05 Cw4	Thaïlandaise, africaine, asiatique, européenne	-	97 %	16 %	-	-
	Hépatite	DRB1*01 :01 DRB1*01 :02	Européenne, australienne, sud-africaine	-	96 %	18 %	-	-
Flucoxacillin	Hépatite	B*57:01 DRB1*0107-DQB1*0103	Européenne		> 99 %	< 1 %	13819	Pas utilisé
Amoxicilline et aminopénicillines	Hépatite	HLA*02 :01 DQB1*0602 DRB*15 :01-BQB1*06 :02	Européenne	-	-	-	-	
	Rash	A*2 DR*52	Italienne	-	-	-	-	
Sulfaméthoxazole	SJS/TEN	B*38	Européenne	-	-	-	-	
Sulfamides	SJS/TEN	A*29 B*12 DR7	Européenne	-	-	-	-	
Isoniazide	Dili	NAT2, CYP2E1*5 et *1B	Européenne	-	-	-	-	
Carbamazépime	SJS/TEN	B*15:02	Caucasienne, chinoise	> 1 000	100 % (population chinoise)	3 %	100	En routine en Asie du Sud-Est
	Dress	A*31:01	Européenne, chinoise, japonaise	9,5	> 99 %	< 1 %	5 000	
Dapsone	Dress, Rash, hépatite	B*13:01	Australienne, chinoise, japonaise	81	> 99 %	< 1 %	13819	Programme en cours dans les pays d'endémie de lèpre (Chine, Asie du Sud-Est)

NNT : nombre de patients à tester pour une manifestation clinique (*number needed to treat*) ; OR : Odd ratio ; VPN : valeur prédictive négative ; VPP : valeur prédictive positive. D'après [18].

Prise en charge immédiate et traitement

Pour tous les patients, l'identification de l'allergène et son retrait rapide sont les premiers impératifs. Pour le syndrome de SJS/TEN, un arrêt précoce du médicament responsable est associé à un meilleur pronostic. Les stratégies de prise en charge des manifestations cutanées graves des HSR sont principalement symptomatiques, visant à éviter la morbidité à court terme et la mortalité et les séquelles graves à long terme. Le risque de morbidité est augmenté pour les molécules qui ont des demi-vies longues. Les patients présentant un détachement de l'épiderme, une érythrodermie, une atteinte des muqueuses sont exposés à augmentation de la perte de liquide et de protéines, une hypovolémie, une insuffisance rénale, une dérégulation thermique et un risque infectieux nécessitent une prise en charge dans des unités spécialisées [19]. Parallèlement aux soins locaux, les approches thérapeutiques pour les patients atteints de SJS/TEN sont toujours en discussion. Les données actuelles sont issues de petites séries et de cas rapportés dans la littérature. La rareté des SCARs rend difficile la réalisation d'essais randomisés de grande échelle comparant les stratégies de traitement. Les approches par l'utlisation de traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs (corticostéroïdes, cyclophosphamide, inhibiteurs de la calcineurine, anti-TNF, immunoglobulines intraveineuses ou plasmaphérèse) ont eu des résultats controversés.

Conclusion

Les HSR sont des pathologies complexes. Les avancées concernant l'immunopathogénèse vont conduire à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques et diagnostiques. La détermination de l'imputabilité est délicate et nécessite une approche exhaustive et multidisciplinaire. Malgré leurs performances variables, les tests *in vivo* et *in vitro* disponibles actuellement constituent des aides importantes au diagnostic. Des approches combinées seront probablement nécessaires. Celles-ci restent à évaluer avec rigueur et à grande échelle dans de larges études.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements
Nous remercions Erwan Dumontet (service d'immunologie, thérapie cellulaire et hématopoïèse, pôle biologie, CHU Pontchaillou, Rennes, France) et Benjamin Savoye (service d'allergologie, CHU de Caen, France) pour leur relecture et leurs conseils.

Points à retenir

- L'HSR repose sur l'activation de lymphocytes T mais les manifestations cliniques dépendent des cellules effectrices impliquées (LTc, macrophages, PNN, polynucléaires éosinophiles…) et des cytokines produites.
- L'activation des lymphocytes T dépend de l'interaction des allergènes avec le HLA selon le modèle haptène/prohaptène, le modèle d'interaction pharmacologique (concept p-i) et le modèle de répertoire du soi modifié.
- Des allèles HLA sont associés aux manifestations cliniques pour certains médicaments et déterminent des facteurs de prédisposition.
- Les tests *in vivo* sont pertinents pour certains phénotypes, notamment s'ils sont réalisés à distance des manifestations cliniques et en l'absence de risque systémique. Une standardisation de méthodes est actuellement souhaitée.
- Les tests *in vitro,* comme le TPL, sont aussi sensibles que les tests cutanés. La standardisation des méthodes, le développement de programme d'évaluation externe de qualité, le développement de techniques de plus en plus sensibles et leurs éventuelles combinaisons pourraient permettre d'améliorer la sensibilité.
- L'association tests cutanés et des tests *in vitro* pourrait augmenter la sensibilité globale.

Références

[1] Gomes ER, Marques ML, Regateiro F. Epidemiology and risk factors for severe delayed drug hypersensitivity reactions. Current pharmaceutical design 2019.
[2] Pichler WJ: Pharmacological interaction of drugs with antigen-specific immune receptors: the p-i concept. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2002, 2(4):301-5.
[3] Redwood AJ, Pavlos RK, White KD, Phillips EJ. HLAs: Key regulators of T-cell-mediated drug hypersensitivity. Hla 2018, 91(1):3-16.
[4] Schrijvers R, Gilissen L, Chiriac AM, Demoly P. Pathogenesis and diagnosis of delayed-type drug hypersensitivity reactions, from bedside to bench and back. Clinical and translational allergy 2015, 5:31.
[5] White KD, Chung WH, Hung SI et al. Evolving models of the immunopathogenesis of T cell-mediated drug allergy: the role of host, pathogens, and drug response. The Journal of allergy and clinical immunology. 2015,136(2):219-34; quiz 235.
[6] Hansel K, Bellini V, Bianchi L et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms from ceftriaxone confirmed by positive patch test: an immunohistochemical study. The journal of allergy and clinical immunology In practice. 2017;5(3):808-10.
[7] Picard D, Janela B, Descamps V et al. Drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS): a multiorgan antiviral T cell response. Science translational medicine. 2010;2(46):46ra62.

[8] Bellon T, Blanca M. The innate immune system in delayed cutaneous allergic reactions to medications. Current opinion in allergy and clinical immunology. 2011;11(4):292-8.
[9] Kakeda M, Schlapbach C, Danelon G et al. Innate immune cells express IL-17A/F in acute generalized exanthematous pustulosis and generalized pustular psoriasis. Archives of dermatological research. 2014, 306(10):933-8.
[10] Feldmeyer L, Heidemeyer K, Yawalkar N. Acute generalized exanthematous pustulosis: pathogenesis, genetic background, clinical variants and therapy. International journal of molecular sciences.2016;17(8).
[11] Amsler E, Soria A.Hypersensitivity reactions to beta-lactam antibiotics. La Revue de medecine interne.2017;38(11):737-48.
[12] Brandt O, Bircher AJ. Delayed-type hypersensitivity to oral and parenteral drugs. Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG.2017;15(11):1111-32.
[13] Maniu CM, Buss G, Feldmeyer L et al. Severe delayed drug hypersensitivity reactions. Revue medicale suisse. 2013;9(382):803-4, 806-11.
[14] Barbaud A, Goncalo M, Bruynzeel D, Bircher A. Guidelines for performing skin tests with drugs in the investigation of cutaneous adverse drug reactions. Contact dermatitis. 2001;45(6):321-8.
[15] Torres MJ, Romano A, Celik G et al. Approach to the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: similarities and differences between Europe and North America. Clinical and translational allergy. 2017;7:7.
[16] Phillips EJ, Sullivan JR, Knowles SR, Shear NH. Utility of patch testing in patients with hypersensitivity syndromes associated with abacavir. AIDS. 2002;16(16):2223-5.
[17] Brockow K, Romano A, Blanca M et al. General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity. Allergy. 2002;57(1):45-51.
[18] Brajon D, Menetre S, Waton J et al. Non-irritant concentrations and amounts of active ingredient in drug patch tests. Contact dermatitis. 2014;71(3):170-5.
[19] Duong TA, Valeyrie-Allanore L, Wolkenstein P, Chosidow O. Severe cutaneous adverse reactions to drugs. Lancet. 2017;390(10106):1996-2011.
[20] Barbaud A, Collet E, Milpied B et al. A multicentre study to determine the value and safety of drug patch tests for the three main classes of severe cutaneous adverse drug reactions. The British journal of dermatology. 2013;168(3):555-62.
[21] Trubiano JA, Douglas AP, Goh M et al. The safety of antibiotic skin testing in severe T-cell-mediated hypersensitivity of immunocompetent and immunocompromised hosts. The journal of allergy and clinical immunology In practice. 2019;7(4):1341-3 e1341.
[22] Empedrad R, Darter AL, Earl HS, Gruchalla RS. Nonirritating intradermal skin test concentrations for commonly prescribed antibiotics. The Journal of allergy and clinical immunology. 2003;112(3):629-30.
[23] Phillips EJ, Bigliardi P, Bircher AJ et al: Controversies in drug allergy: testing for delayed reactions. The Journal of allergy and clinical immunology. 2019;143(1):66-73.
[24] Brockow K, Garvey LH, Aberer W al: Skin test concentrations for systemically administered drugs -- an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. Allergy. 2013;68(6):702-12.
[25] Blumenthal KG, Shenoy ES, Varughese CA et al. Impact of a clinical guideline for prescribing antibiotics to inpatients reporting penicillin or cephalosporin allergy. Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2015;115(4):294-300 e292.
[26] Demoly P, Romano A, Botelho C et al. Determining the negative predictive value of provocation tests with beta-lactams. Allergy. 2010;65(3):327-32.
[27] Tonson la Tour A, Michelet M, Eigenmann PA, Caubet JC. Natural history of benign non-immediate allergy to beta-lactams in children: a prospective study in retreated patients after a positive and a negative provocation test. The journal of allergy and clinical immunology In practice. 2018;6(4):1321-6.
[28] Waton J, Pouget-Jasson C, Loos-Ayav C et al. Drug re-challenges in cutaneous adverse drug reactions: information and effectiveness in the long-term management of patients. Allergy. 2011;66(7):941-7.
[29] Milovanova TN: Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. Cytometry Part B, Clinical cytometry. 2007;72(4):265-75.
[30] Poujol F, Monneret G, Friggeri A et al. 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. 2014;415:71-9.
[31] Beeler A, Zaccaria L, Kawabata T et al. CD69 upregulation on T cells as an in vitro marker for delayed-type drug hypersensitivity. Allergy. 2008;63(2):181-8.
[32] Soares A, Govender L, Hughes J et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. Journal of immunological methods. 2010;362(1-2):43-50.
[33] Mayorga C, Dona I, Perez-Inestrosa E et al. The value of in vitro tests to diminish drug challenges. International journal of molecular sciences. 2017;18(6).
[34] Stejskal VD, Cederbrant K, Lindvall A, Forsbeck M. Melisa-an *in vitro* tool for the study of metal allergy. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA. 1994;8(5): 991-1 000.
[35] Vadala M, Laurino C, Palmieri B. The memory lymphocyte immunostimulation assay in immune system disorders: is useful or useless? Journal of laboratory physicians. 2017;9(4):223-6.
[36] Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H et al. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. Journal of immunological methods. 1983;65(1-2):109-21.
[37] Mayorga C, Celik G, Rouzaire P et al. In vitro tests for drug hypersensitivity reactions: an ENDA/EAACI Drug Allergy Interest Group position paper. Allergy. 2016;71(8):1103-34.

IX Diagnostic biologique d'une dermatite de contact aux protéines du liquide amniotique de vache, à propos d'un cas

Le patient est un vétérinaire de 30 ans qui a consulté dans le service de dermatologie du CHU de Caen à la suite de l'apparition de lésions cutanées des poignets et des avant-bras, urticariennes puis eczématiformes après contact avec des liquides d'origine animale tels que le liquide amniotique de vache et le sang de vache lors des vêlages. Les signes cliniques étaient compatibles avec une dermite de contact aux protéines.

Dans le but de confirmer et d'identifier un allergène responsable de la dermite de contact ont été réalisés plusieurs tests cutanés et biologiques au cours de deux consultations (Résultats disponibles en Tableau 4) .

Après les tests allergologiques de la première consultation, afin d'éliminer l'imputabilité du latex, le patient a porté les gants qu'il utilise lors des vêlages en dehors de tout contexte obstétrical pendant 1h30 sans aucune éruption cutanée. De plus, il a effectué deux laparotomies chez des vaches sans gants pendant lesquelles il a reçu des projections de sang de l'animal sur les avant-bras. Il aurait alors présenté des réactions urticariennes sur ces zones durant moins d'une heure à deux reprises sans aucun autre symptôme.

IX.1 La dermatite de contact aux protéines de liquide amniotique de vache

Les dermatites de contact aux protéines de liquide amniotique sont des réactions peu fréquentes. Elles font partie pour la plupart des maladies d'expositions professionnelles des vétérinaires et professionnels des soins aux animaux [120]. Leur mécanisme physiopathologique est à cheval entre l'hypersensibilité immédiate et retardée [121]. On décrit une réaction d'hypersensibilité immédiate liée aux IgE (type 1 de la classification de Gell et Coombs [1]) à l'origine d'une urticaire de contact. Dans un second temps peut apparaître une réaction d'HSR à type d'eczéma [121].

On compte à ce jour 24 cas décrits dans la littérature [122–130]. Concernant leur diagnostic, les patch tests et open tests sont habituellement peu contributifs car ils sont effectués sur peau saine et ne sont donc pas prédictifs d'une réaction lors d'un test sur

peau lésée [121]. D'autre part, les pricks tests et intradermoréactions ne sont généralement pas réalisés pour le liquide amniotique et plus largement pour les liquides biologiques d'origine animale. Cependant, plusieurs exemples sont rapportés dans la littérature de vétérinaires atteints de dermatite de contact au liquide amniotique de vache ayant bénéficié de tests cutanés [122,125,126,128]. Il faut souligner que d'après Nuñez et al, certains cas de dermatite de contact au liquide amniotique seraient dus à la présence de galactose-alpha-1,3-galactose (α-Gal) dans le liquide amiotique [131]. L'α-Gal est un épitope glucidique présent dans la composition de la plupart des membranes cellulaires des mammifères à l'exception des primates de l'ancien monde chez qui l'α-Gal est reconnu par le système immunitaire comme antigène étranger. Il ne semble pas que l'α-Gal soit l'allergène responsable des réactions du patient car le dosage des IgE spécifiques de l'α-Gal était négatif. Toutefois, en l'absence de tests cutanés réalisés, son imputabilité ne peut être formellement écartée.

IX.2 Explorations cliniques

Pour écarter une réaction due aux protéines du latex présentes dans les gants utilisés lors des vêlages, un prick test au latex (décoction maison) a été réalisé aux concentrations usuelles sans dilution (pur). Un diamètre <3 mm à 15 min en comparaison d'un contrôle négatif a été considéré comme négatif.

Des patch tests IQ® Chamber (Chemotechnique Diagnostics, Malmö, Suède) ont également été réalisés selon les recommandations européennes [132] avec lecture à 48h et 96h (Résultats et détails des patchs en Tableau 4). Ils sont rendus négatifs en absence de réaction, douteux en cas d'érythème simple et positifs si érythème accompagné d'œdème, vésicules, bulles, papules, hypopion, pétéchies ou nécrose [133].

Lors de la seconde consultation ont été pratiqués un open test avec du liquide amniotique fraîchement décongelé provenant d'une génisse primipare de race Prim'Holstein, d'aspect visqueux comportant deux phases, une liquide et une gélatineuse sur une zone de 5 x 5 cm² sur l'avant-bras droit en avant du pli du coude et sur une zone de 5 x 5 cm² sur l'omoplate droite. (Résultats en Tableau 4)

Compte tenu de l'origine animale du liquide, aucun prick test et intradermoréaction n'ont pu être pratiqués.

IX.3 Explorations biologiques

Lors de la première consultation, un tube sec a été prélevé pour doser des IgE spécifiques avec la technique ImmunoCap® (ThermoFisher, Phadia SAS, Uppsala, Suède) dont la positivité est définie par le fabriquant >0.1 $kUA.L^{-1}$ (Résultats et détail des IgE en Tableau 4).

Lors de la seconde consultation, deux tubes héparinés et un tube EDTA ont été prélevés pour effectuer un test de prolifération lymphocytaire et un test d'activation des basophiles (TAB). 15ml de liquide amniotique de vache congelé ont été transmis au laboratoire. Bien que plusieurs études aient montré son utilité dans le diagnostic de la dermite de contact aux métaux [134,135], il n'existe pas de mention dans la littérature de l'intérêt du TPL pour le diagnostic des dermatites de contact aux protéines.

Première Consultation

Signes cliniques :

Lésions cutanées des poignets et des avant-bras, urticariennes puis eczématiformes après contact cutané avec du sang et du liquide amniotique de vache

Tests cutanés :		**Interprétation**
Prick tests [a]		
Latex		Négatif
Patch tests [b]		
IQ Chamber Chemotechnique®		
Batterie européenne standard		Négatif
Batterie excipient, cosmétique		
Dodécyle Gallate		Douteux
Batterie fragrance		Négatif
Batterie GERDA*		Négatif
Chlorhexidine		Négatif
Povidone iodée		Négatif
Batterie caoutchouc		Négatif
Batterie plastiques et colles		Négatif
Atopie patch		Négatif
Alcool éthylique 96%		Négatif
Casaque vétérinaire Génia® pour le vêlage		Négatif
Gants en polyuréthane pour le vêlage		Négatif

Biologie :		**Interprétation**
IgE spécifiques ImmunoCAPs® (kUA.L^{-1}) [c]	<0.1	Négatif
Latex	0,2	Positif faible
Recombinants latex**	<0.1	Négatifs
Chat (squames/poils) :	<0,1	Négatif
Vache (squame/poils)	<0,1	Négatif
Albumine sérique de vache	<0,1	Négatif
α-Gal (galactose-alpha-1,3-galactose)	<0,1	Négatif
Chlorhexidine	<0,1	Négatif

Deuxième consultation

Signes cliniques :

Réaction urticarienne après deux laparotomies sans gants chez des vaches avec projection de sang

Tests cutanés :		**Interprétation**
Open Tests		
Liquide amniotique de vache (*génisse Prim'holstein primipare*)	5x5 cm² : pli du coude	Négatif à 20min, 1h, 72h
	5x5cm² : omoplate droite	Négatif à 20min, 1h, 72h

Tableau 4 : Clinique et explorations effectuées lors de la première consultation pour le patient avec suspicion de dermite de contact au liquide amniotique de vache

a) Prick test : Un diamètre <3 mm à 15 min en comparaison d'un contrôle négatif est considéré comme négatif

b) Patch tests négatif : absence de réaction ; douteux : erythème simple ; positif : erythème + œdème ou vésicule/bulles/papules/hypopion/pétéchies/nécrose

c) Seuil positivité ImmunoCap® >0.1 kUA.L-1

*GERDA : Groupe d'étude et de recherche en Dermato-Allergologie

** Recombinants latex : rHeb b1, rHeb b3, rHeb b5, rHeb b6.02, rHeb b8, rHev b11

Objectifs du travail

L'établissement français du sang (EFS) Haut de France/Normandie site de Caen réalise des protocoles de photochimiothérapie extracorporelle avec le système ouvert Theraflex® ECP de MacoPharma™, mais il n'effectue pas lui-même ses contrôles post-irradiation car l'organisme n'a pas mis en place de structure de contrôle en interne. Les contrôles bactériologiques sont envoyés au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo Universitaire (CHU) de Caen et les contrôles immunologiques au laboratoire d'immunologie du CHU de Caen.

La première technique de contrôle utilisée par le laboratoire d'immunologie du CHU de Caen a été le test de prolifération lymphocytaire utilisant la thymidine tritiée avec stimulation par la PHA. Cependant, depuis quelques années, les méthodes utilisant la radioactivité sont devenues difficilement applicables au sein du laboratoire. C'est pourquoi il a été décidé de remplacer la technique radio-immunologique utilisant la thymidine tritiée par la technique de CMF utilisant le CFSE.

L'objectif de ce travail a donc été de mettre en place au laboratoire d'immunologie du CHU de Caen une méthode de test de prolifération lymphocytaire permettant la réalisation de contrôle immunologique du procédé de photochimiothérapie extracorporelle utilisé par l'EFS site de Caen par une méthode alternative à celle utilisée classiquement avec un traceur non radioactif.

Après avoir été sollicité par le service de Dermatologie du CHU de Caen, un second objectif a été ajouté et consiste à évaluer ce test pour ses applications dans le diagnostic des HSR. Dans ce cadre, un cas clinique présentant le diagnostic clinico-biologique d'une dermite de contact aux protéines de liquide amniotique de vache est présenté.

Matériel et méthode

I Test de prolifération lymphocytaire pour le suivi des produits d'aphérèse de PCE

Nous avons testé des cellules mononucléées obtenues par aphérèse de patients traités par PCE toujours en parallèle de cellules circulantes d'un donneur sain. Les cellules mononuclées témoins ont été obtenues dans un premier temps à partir de sang total hépariné prélevé chez des donneurs sains de l'EFS. Dans un second temps, ont été utilisées des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) provenant d'une poche de cytaphérèse d'un donneur sain de l'EFS congelées dans de l'azote liquide à -196°C.

Au total, le test de prolifération lymphocytaire a été effectué pour :

- 13 témoins donneurs de sang anonymes de l'EFS : pour évaluer la méthode et définir des bornes d'acceptabilité.
- 10 patients âgés entre 35 et 84 ans (médiane = 54 ans) présentant différentes pathologies (Tableau 5).

Patient	Sexe	Age	Maladie
HEI	M	71	Sézary
DUR	M	84	Sézary
BOI	M	74	Sézary
BIN	F	66	GVH
BES	M	38	GVH
VAN	F	56	GVH
REN	M	34	GVH
LEC	F	35	GVH
DEW	M	52	GVH
FER	M	52	GVH

Tableau 5 : Informations concernant les patients, sexe, âge et maladie. GVH : maladie du greffon contre l'hôte ; Sézary : Lymphome T épidermotrope de Sézary

I.1 Préparation du milieu de culture

Nous avons préparé un milieu de culture « complet » RPMI 1640, Sérum de Veau Fœtal (SVF) 10%, glutamine 1%, pyruvate 1%, pénicilline/streptomycine 1%.

I.2 Isolement des cellules mononucléées

I.2.1 Isolement des PBMC par centrifugation sur gradient de Ficoll

Les PBMC ont été diluées au ½ dans du PBS Dulbecco®. Le sang dilué a été déposé à la surface du Ficoll-Paque PLUS® sans mélanger les 2 phases puis elles ont été centrifugées à 900G, 30 min à 18°C avec accélération lente et sans frein. L'anneau cellulaire des PBMC à l'interface supérieure entre le plasma et le Ficoll (Figure 17) a été récupéré et les cellules lavées à deux reprises par centrifugation (10 min, 400G à 18°C puis 15 min, 200G, 18°C). Le culot a été remis en suspension dans 1ml de RPMI 1% SVF. Le comptage des cellules a été effectué à l'aide d'une cellule de Kova® ou sur l'automate de numération cellulaire Sysmex-XN®.

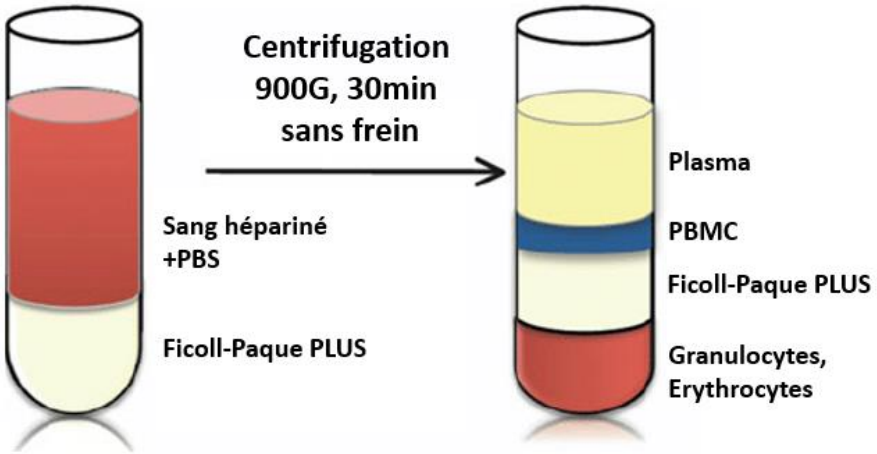


Figure 17 : Isolement des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) par gradient de Ficoll (adapté d'après [136]).

I.2.2 Isolement des PBMC par traitement au chlorure d'ammonium

Les produits d'aphérèse ont été centrifugés 5min, 300G à 18°. Le culot cellulaire a été concentré dans 1ml puis mélangé à 9mL de chlorure d'ammonium Stemcell™. La suspension cellulaire a été incubée pendant 10min sur de la glace pilée puis lavée deux fois avec du RPMI par centrifugations (10 min, 400G, 18°C et 15 min, 200G,

18°C). Le comptage des cellules a été effectué à l'aide d'une cellule de Kova® ou sur l'automate de numération cellulaire Sysmex-XN®.

I.2.3 Décongélation des PBMC

Les cellules ont été décongelées rapidement au bain marie à 37°C puis après formation d'un glaçon mobile dans le cryotube, elles ont été transférées dans 10mL de milieu complet. Le tube a été centrifugé à 200G, 18°C pendant 5 min et le culot a été repris dans 20mL de milieu complet. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% de CO2 pendant au minimum 2h. Le tube a été récupéré, centrifugé (200G, 18°C, 15min) puis le culot a été récupéré après décantation dans du milieu complet.

I.2.4 Etude de la stabilité des produits d'aphérèse à 24h

Pour l'étude de la stabilité des échantillons à 24h, les échantillons pré et post-PCE ont été séparés en deux à réception, la fraction qui devait être mise en culture le jour même a suivi le protocole habituel avec traitement au chlorure d'ammonium et la seconde fraction à mettre en culture à 24h a été centrifugée à 700G pendant 10min. Le culot a été repris dans 15ml de milieu complet. Enfin, cet échantillon a été mis pendant 24h à température ambiante sur la paillasse avant d'être mis en culture dans les conditions usuelles.

I.3 Culture

Les cellules ont été ajustées à une concentration de 1M/ml dans du milieu de culture complet. Pour le marquage au CFSE, les cellules ont été incubées avec du CFSE (Invitrogen, Thermofisher®) à une concentration de 0,5µM dans du milieu RPMI 1% SVF pendant 20min à 37°C, 5% CO_2 puis lavées deux fois et ajustées avec du milieu complet pour obtenir des suspensions cellulaires à 0,5M/ml. Pour la mise en culture, 200µl de suspension cellulaire (100 000 cellules) ont été déposés dans des plaques de culture 96 puits en U sous différentes conditions. La PHA a été utilisée à une concentration finale de 20µg/ml ou 40µg/ml selon les lots. Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% CO_2 puis récoltées après 3, 4 ou 5 jours de culture.

I.4 Marquages et acquisition et analyse en cytométrie

Les lymphocytes ont été marqués avec 5µL d'un anticorps anti-CD3 PE-Cy7 (clone SK7, BD Pharmingen®) pour identifier les lymphocytes T et 5µL de 7AAD (BD Pharmingen®) pour déterminer la viabilité.

Après culture, les cellules ont été lavées avec du CellWASH® (BD), reprises dans 40µL de RPMI, 1% SVF puis marquées et incubées 20min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après lavage, le culot est repris dans 400µL de BD CellWash® et les cellules immédiatement analysées.

Les données ont été acquises sur un cytomètre FACS Canto II (BD) avec un laser bleu de 488nm avec le logiciel DIVA (BD). L'acquisition a été faite sur au moins 500 événements CFSE positifs, CD3 positifs, 7AAD négatifs correspondant aux lymphocytes T viables. Quand elles étaient présentes, ont été exclues les populations de cellules $CFSE^{high}/SSC^{high}$ correspondant aux cellules de Sézary (Figure 18) [137].

L'analyse a été effectuée avec le logiciel DIVA (BD) parmi les singulets sur les cellules viables, 7AAD négatives. Les lymphocytes ont été sélectionnés sur leur morphologie puis les lymphocytes T grâce à l'expression du CD3. Les cellules divisées ont été identifiées par une diminution du marquage CFSE (Figure 18). La viabilité cellulaire des lymphocytes T a été déterminée par le pourcentage de cellules $7AAD^{-}$ dans la population $CD3^{+}$ (Figure 19).

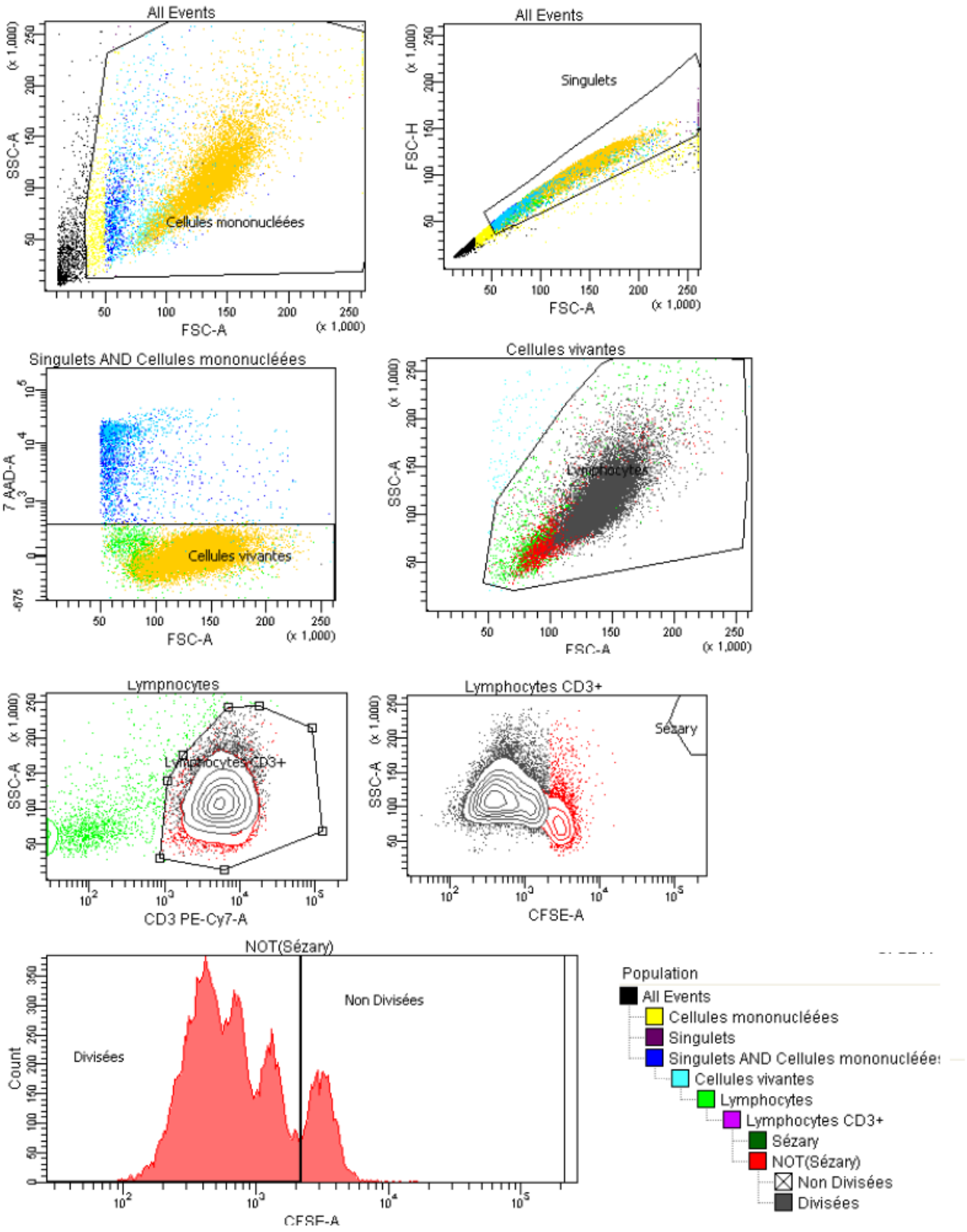


Figure 18 : Stratégie d'analyse de la prolifération cellulaire : témoin après 4 jours de culture

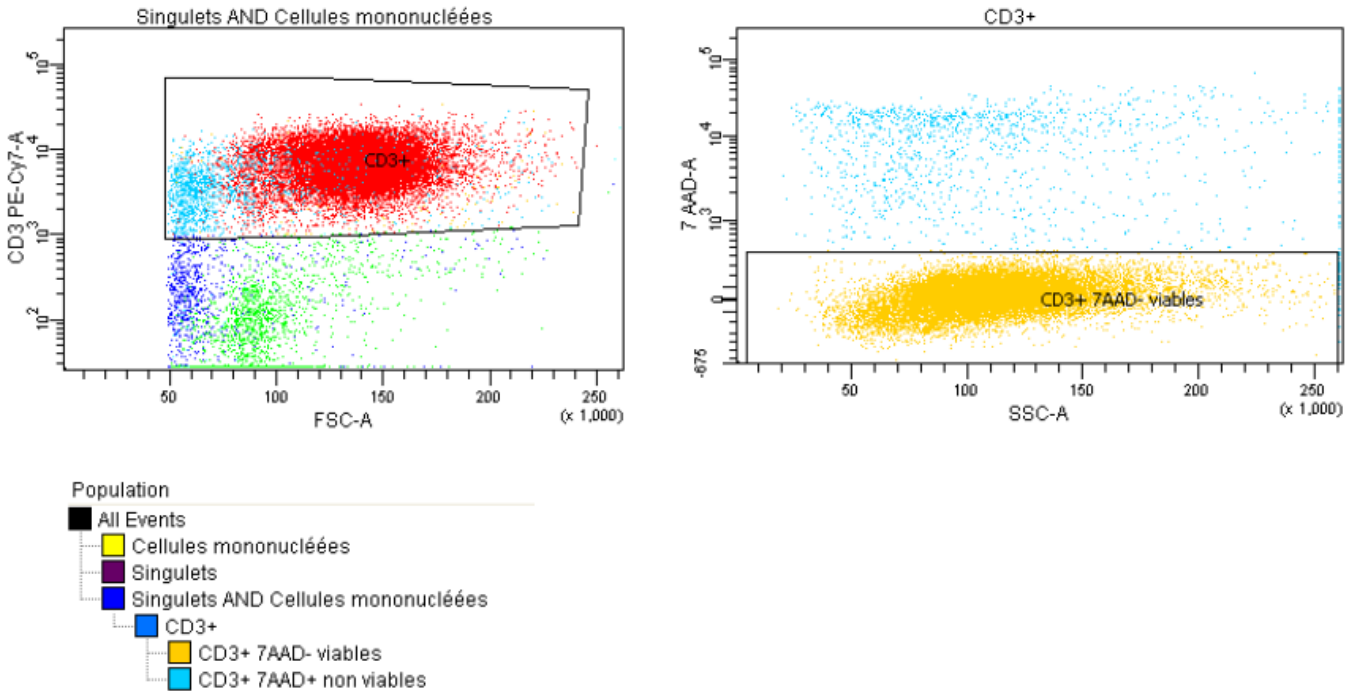


Figure 19 : Stratégie d'analyse de la viabilité cellulaire : témoin après 4 jours de culture

I.5 Critères d'analyse

Nous avons calculé le pourcentage de cellules divisées correspondant au rapport du nombre de cellules divisées $CFSE^{low}$ sur la somme des cellules non divisées et divisées $CFSE^{high}$: % de Division = Nombre de cellules divisées $CFSE^{low}$ / (Divisées + Non divisées $CFSE^{high}$)) x 100.

La prolifération après stimulation par la PHA a été quantifiée en soustrayant les pourcentages de prolifération des conditions avec et sans PHA : Δ = % de $DivisionPHA^{+}$ - % de $DivisionPHA^{-}$.

Le pourcentage d'inhibition de la PCE a été obtenu par la formule : %Inhibition = ((ΔPrépCE – ΔpostPCE) / ΔPrépCE) x 100

Les critères d'acceptabilité de l'expérience sont une prolifération du témoin Δ >20% et du patient Δ Pré-PCE > 3% [138]. La PCE est considérée efficace lorsque le pourcentage d'inhibition est supérieur à 90% selon Evrard et al [138] ou à 70% selon l'ANSM [139].

II Test de prolifération lymphocytaire adapté pour le diagnostic d'une dermite de contact aux protéines de liquide amniotique de vache

Le liquide amniotique a d'abord été dilué dans du RPMI puis filtré sur des filtres de 40µm et de 20µm.

Nous avons effectué des dilutions de dix en dix en commençant avec une concentration protéique de liquide amniotique de 0,3 $g.l^{-1}$ selon le protocole de Levy, Bircher et Büchner qui avaient déjà évalué la prolifération lymphocytaire en réponse à des protéines de lait de vache [140].

Le protocole du test de prolifération lymphocytaire est identique à celui décrit précédemment hormis pour l'utilisation du SVF qui a été remplacé par du sérum AB humain (SAB) aux mêmes concentrations afin d'éviter la réactivité vis-à-vis des protéines bovines. Nous avons aussi testé une condition de culture avec un milieu contenant 10% de SVF comme source de protéines du sang de vache.

Les cellules ont été incubées à 37°C, 5% de CO_2 pendant 7 jours

Nous avons défini un Index de stimulation (SI) = %Prolifération avec l'allergène / %Prolifération sans allergène. Le résultat est positif si SI > 3 [119].

III Test d'activation des basophiles

Le test d'activation des basophiles est une technique d'exploration de l'hypersensibilité immédiate (réaction de type 1 de la classification de Gell et Coombs [1]). Son principe consiste en une activation des polynucléaires basophiles *in vitro* par un allergène qui induit l'expression du CD63 (gp53), une protéine membranaire dont l'expression marque l'activation des basophiles. L'expression du CD63 est ensuite quantifiée en cytométrie [141].

Ce test mime ce qui se passe *in vivo* avec l'externalisation à la membrane du CD63 présent dans les granules après pontage par l'allergène des IgE spécifiques. Le TAB permet de mettre en évidence des réactions liées aux IgE [142].

Pour la réalisation du test, nous avons utilisé le kit Flow CAST® (Bühlmann Laboratories, Schonenbuch, Suisse).

Les deux contrôles positifs disponibles dans le kit sont un anticorps monoclonal spécifique reconnaissant le récepteur aux IgE (FcεRI) et un activateur cellulaire non spécifique, le fMLP. Un contrôle négatif sans stimulation a également été réalisé.

Pour les marquages, le kit comprend un anticorps CCR3-PE permettant d'identifier les basophiles et un anti-CD63-FITC pour quantifier l'activation. CCR3 est un récepteurs de chimiokines (dont l'éotaxine), c'est un marqueur fortement exprimé par les basophiles, éosinophiles et les lymphocytes T_H2 [143].

III.1.1 Marquage

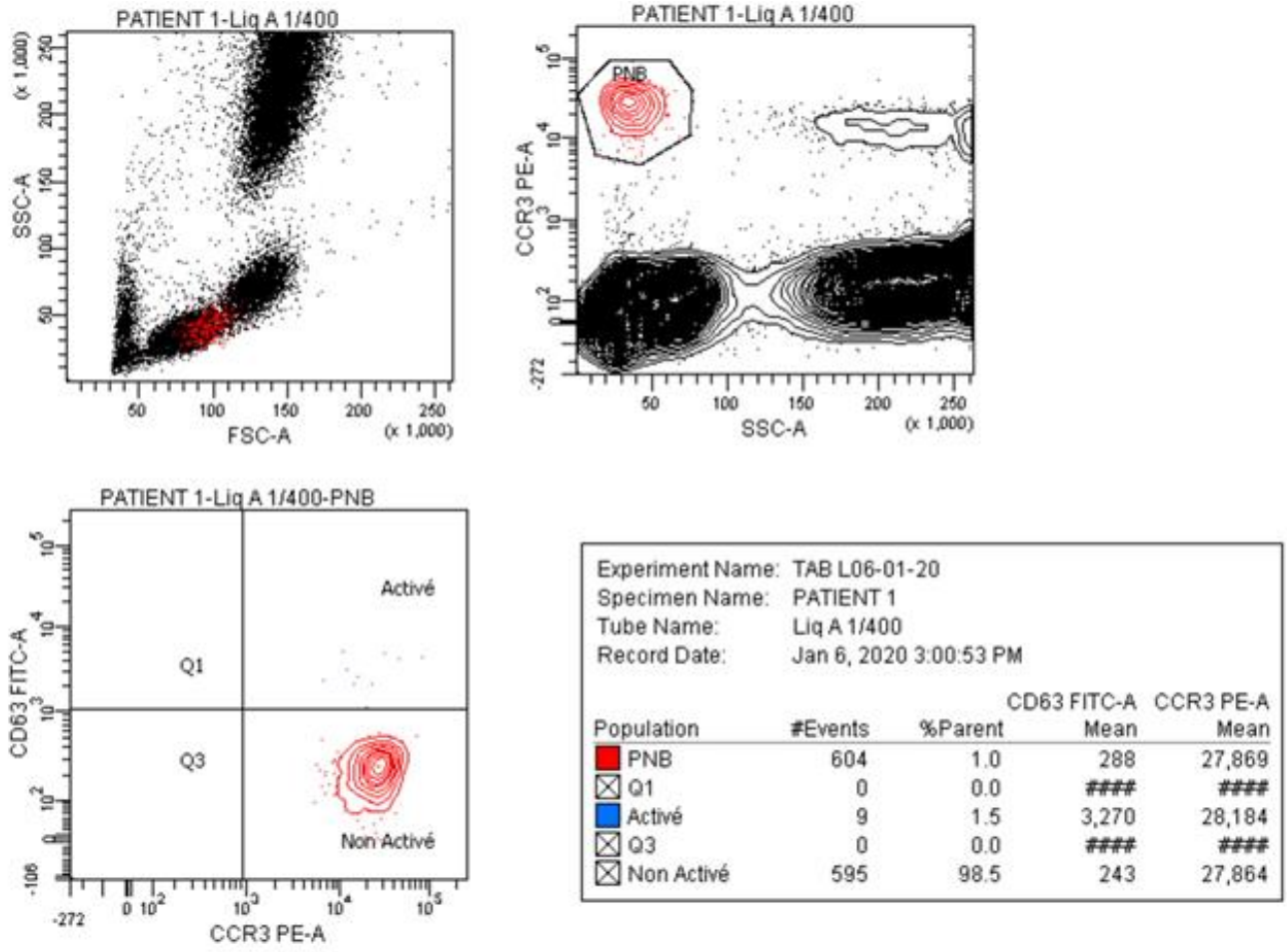
Nous avons effectué des dilutions pour nous rapprocher de la concentration recommandée par le fournisseur pour des protéines d'origine animales telles que les protéines de blanc d'œuf ou de lait de vache ; soit une concentration de 20ng.ml^{-1} [144]. Le liquide amniotique à la concentration protéique de 0,3g.l^{-1} a été dilué de dix en dix.

A 50µL de sang total ont été ajoutés, 50µL de stimulus, 20µL de réactif de coloration, 100µL de tampon. Les tubes ont été incubés 15 min à 37°C dans un bain marie.

Une lyse des globules rouges a ensuite été effectuée avec 2ml de réactif de lyse préchauffé (18-28°C) 10min à température ambiante à l'abri de la lumière. Après centrifugation 5min, 500G à 18°C, le culot cellulaire a été repris dans 300µL de tampon de lavage et l'acquisition au cytomètre de flux a été directement réalisée.

III.1.2 Acquisition, analyse et interprétation des résultats

Les données ont été acquises sur un cytomètre FACS Canto II (BD) avec un laser bleu de 488nm avec le logiciel DIVA (BD). L'acquisition a été faite sur au moins 600 événements CCR3 positifs, SSC^{low} correspondant aux polynucléaires basophiles. L'analyse est réalisée avec le logiciel DIVA (BD) parmi les cellules CCR3 positives, SSC^{low} correspondant aux polynucléaires basophiles, les cellules activées ont été identifiées grâce à l'expression du CD63 (Figure 20).



Population	#Events	%Parent	CD63 FITC-A Mean	CCR3 PE-A Mean
PNB	604	1.0	288	27,869
Q1	0	0.0	####	####
Activé	9	1.5	3,270	28,184
Q3	0	0.0	####	####
Non Activé	595	98.5	243	27,864

Figure 20 : Stratégie d'analyse du test d'activation des basophiles

Pour pouvoir interpréter les résultats, le fournisseur recommande qu'au moins un des contrôles (anti- FcεRI ou fMLP) soit supérieur à 10%. Il définit également une valeur seuil de pourcentage de cellules CD63 positives à 15% pour les protéines [144].

Ces recommandations peuvent être modifiées en fonction des allergènes testés.

Résultats

I Prolifération des cellules post-PCE

Les profils de fluorescence du CFSE représentatifs que nous avons obtenus sont présentés en Figure 21. Les cellules des témoins et celles des patients pré-PCE se divisent et prolifèrent en réponse à une stimulation polyclonale par la PHA, on observe une diminution de la fluorescence du CFSE. Les cellules des patients post-PCE stimulées par la PHA ne prolifèrent plus et restent CFSE positives.

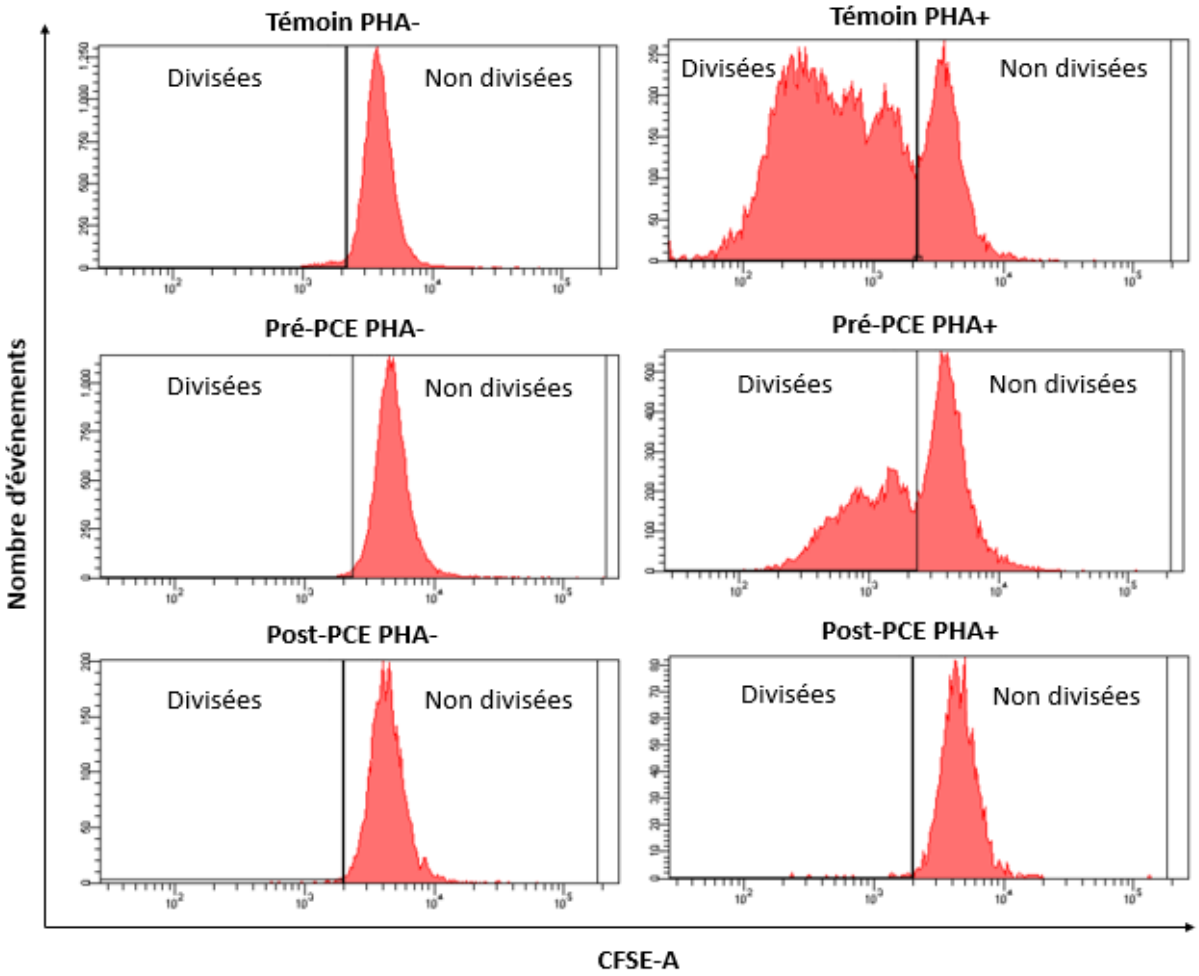


Figure 21 : Intensité de marquage au CFSE pour un témoin et un patient Pré et Post-PCE avec ou sans stimulation par la PHA (Patient BOI). Les cellules qui expriment fortement le CFSE correspondent aux cellules non divisées et celles qui l'expriment faiblement aux cellules divisées

I.1 Validation de méthode

Après évaluation à J3, J4, J5 nous avons décidé de réaliser notre validation de méthode en réalisant la culture cellulaire sur 4 jours.

I.1.1 Influence du CFSE sur la viabilité

Nous avons évalué l'effet du CFSE sur la viabilité cellulaire en comparant la viabilité de cellules marquées ou non au CFSE pour un patient.

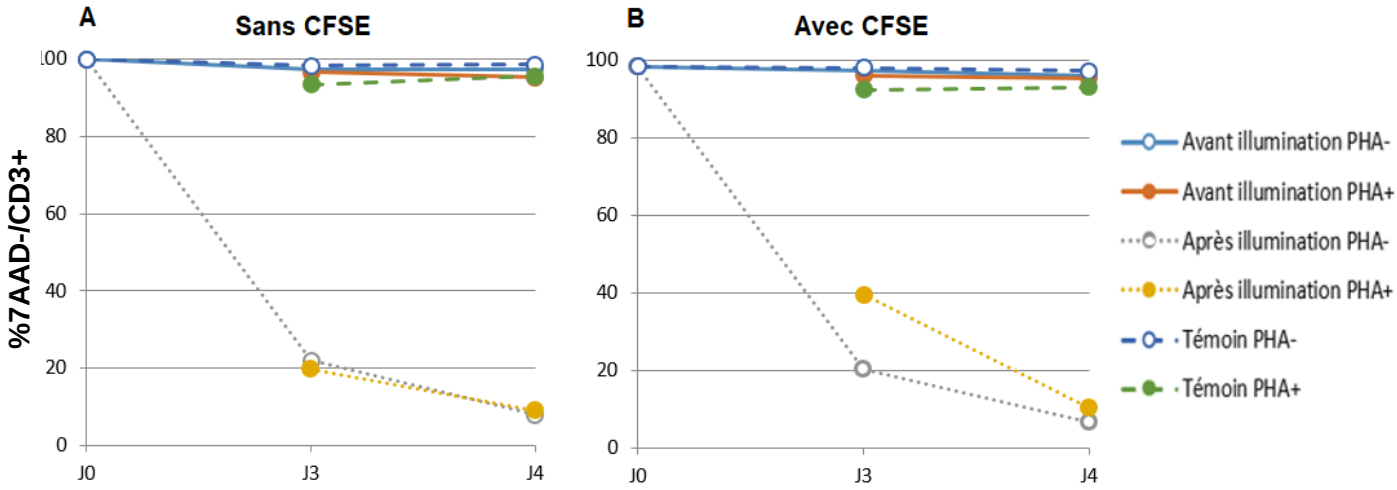


Figure 22 : Viabilité des lymphocytes totaux sans (A) ou avec (B) marquage au CFSE (n=1).

La présence de CFSE ne semble pas influencer la viabilité cellulaire sur 4 jours de culture à la concentration à laquelle nous l'avons utilisé (Figure 22). Les cellules post illumination ont une viabilité qui diminue au cours du temps comme attendu post-PCE.

I.1.2 Détermination de la concentration optimale en PHA

Nous avons utilisé de la PHA provenant de deux lots différents du même fabriquant, nous avons donc dû déterminer la concentration à laquelle nous allions l'utiliser. Pour cela, nous avons effectué un test de dose réponse. Le premier lot avait été testé en triplicat avec l'incorporation de thymidine tritiée et la concentration optimale avait été déterminée à 20 µg.ml^{-1} (données non montrées).

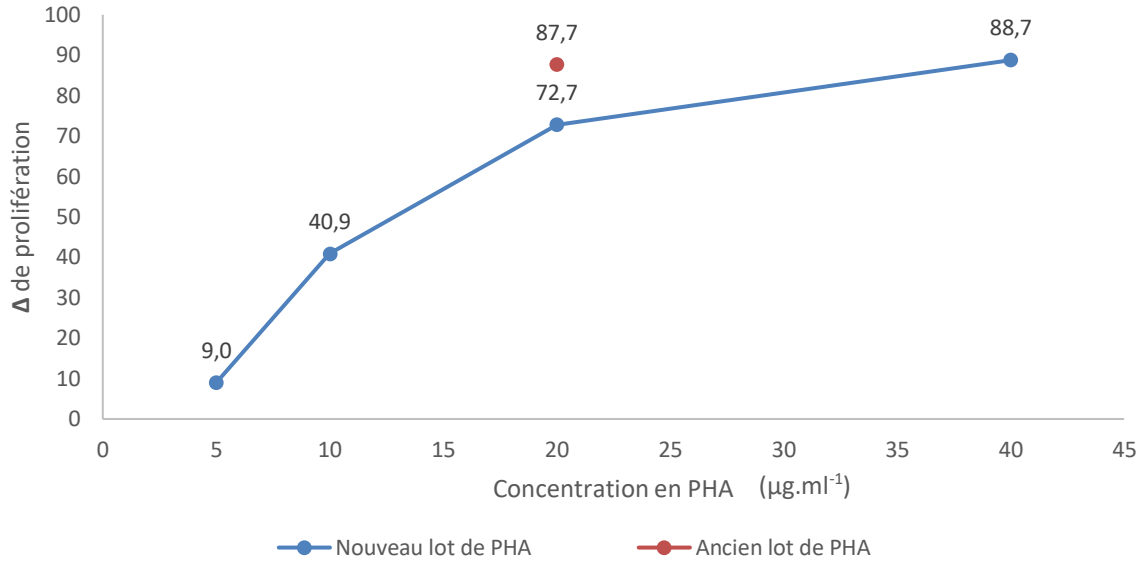


Figure 23 : Détermination de la concentration optimale du nouveau lot de PHA déterminée par la prolifération à 4 jours.

Nous avons donc choisi d'utiliser le nouveau lot de PHA à la concentration de 40µg.ml^{-1} car il permettait une réponse proliférative équivalente à l'ancien lot utilisé à la concentration de 20 µg.ml^{-1} (Figure 23).

I.1.3 Effet de la méthode d'isolement des PBMC

Afin de diminuer le temps de préparation, nous avons testé la lyse des globules rouges par chlorure d'ammonium pour les produits d'aphérèse et nous l'avons comparée à la séparation des PBMC par centrifugation sur gradient de Ficoll (Tableau 6). Les résultats pour un patient montrent que le chlorure d'ammonium n'altère pas la prolifération des lymphocytes T pré-PCE (Figure 24). Post-PCE, il n'y a pas de différence de prolifération entre les deux techniques. De plus, le pourcentage d'inhibition obtenu est quasiment identique (Tableau 6). A la suite de cet essai, nous avons donc choisi le chlorure d'ammonium pour éliminer les globules rouges des produits d'aphérèse

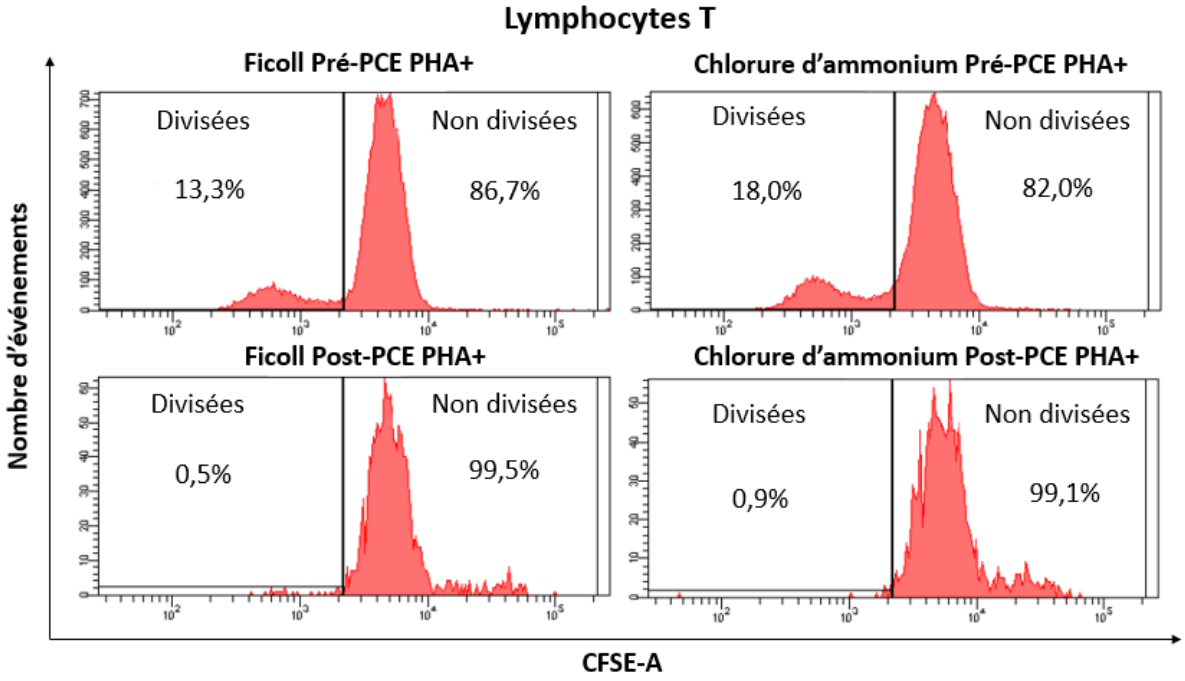


Figure 24 : Intensité de marquage au CFSE obtenue à partir de PBMC isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll ou par chlorure d'ammonium après stimulation par la PHA (patient DUR). Résultats pré et post-PCE en présence de PHA.

		Sans stimulation			PHA				
Patient		**Cellules CD3+ non divisées**	**Cellules CD3+ prolif**	**% de Division**	**Cellules CD3+ non divisées**	**Cellules CD3+ prolif**	**% de Division**	**Δ**	**% Inhibition**
Témoin		15289	15	0,1	3130	14619	82,4	82,3	
DUR Ficoll	Pré-PCE	15042	5	0,0	14663	2252	13,3	13,3	
	Post-PCE	1095	0	0,0	615	3	0,5	0,5	96,3
DUR Chlorure d'ammonium	Pré-PCE	15266	100	0,5	14878	3297	18,0	17 ,5	
	Post-PCE	1081	5	0,5	1384	12	0,9	0,4	97,2

Tableau 6 : Comparaison des résultats obtenus à partir de PBMC isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll ou par chlorure d'ammonium (patient DUR).

I.1.4 Détermination des valeurs de références

Sur les 13 témoins qui ont été testés sur 4 expériences, 4 issus d'une même expérience ont été éliminés car ils ne satisfaisaient pas les critères d'acceptabilité.

Le pourcentage de division sans stimulation à 4 jours pour les témoins varie entre [0,2 ; 3,2%] avec une médiane à 1,5% (Tableau 7). Ce résultat est en accord avec le seuil de 3% définit [138].

La prolifération (Δ) des témoins est comprise dans la fourchette [45,0 ; 93,9%] avec une médiane de 72,5%.

	Sans stimulation			PHA			
n=9	Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ divisées	% de Division	Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ divisées	% de Division	Δ
Témoin A	19662	173	0,9	2956	17369	85,5	84,6
Témoin B	19816	302	1,5	2205	17763	89,0	87,5
Témoin C	20644	275	1,3	6217	14396	69,8	68,5
Témoin D	20551	183	0,9	5438	15026	73,4	72,5
Témoin E	19163	346	1,8	4782	15885	76,9	75,1
Témoin F	19545	602	3,0	7392	13110	63,9	60,9
Témoin G	19791	323	1,6	10956	9558	46,6	45,0
Témoin H	19605	648	3,2	4986	15367	75,5	72,3
Témoin I	20774	47	0,2	3237	52606	94,1	93,9

Tableau 7 : Résultats des témoins : nombre d'événements, pourcentage de division, Δ : calcul de prolifération

I.1.5 Répétabilité

Pour déterminer la répétabilité, le TPL a été effectué 5 fois le même jour avec 5 marquages indépendants pour un donneur. La prolifération sur les 5 marquages était comprise entre [68,9 ; 73,8%] (Tableau 8). Nous avons calculé un coefficient de variation (CV=moyenne/écart type) de 2,9%.

	Sans stimulation			PHA			
	Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ divisées	% de Division	Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ divisées	% de Division	Δ
1	19758	187	0,9	5296	15663	74,7	73,8
2	19799	251	1,3	5507	15237	73,5	72,2
3	19774	273	1,4	5666	15140	72,8	71,4
4	199793	229	0,1	6352	14362	69,3	69,2
5	19775	269	1,3	6134	14557	70,4	68,9

Tableau 8 : Répétabilité du TPL effectué 5 fois avec 5 marquages indépendants pour un donneur

I.1.6 Reproductibilité (fidélité intermédiaire)

La reproductibilité a été déterminée en utilisant un donneur sain servant sur 10 expériences réalisées par le même opérateur dans les conditions environnementales

usuelles du laboratoire. La prolifération a été comprise entre [33,3 ; 87,7%] avec une moyenne de 63.8% (Tableau 9) et avec un CV de 31,1%.

Dans un second temps, la reproductibilité a aussi été déterminée avec des PBMC congelées provenant d'une même poche de sang d'un témoin. Sur 7 expériences réalisées, le CV de reproductibilité est plus faible (17,7%).

Itération	Δ prolifération (%) Témoin frais	Δ prolifération (%) PBMC congelées
1	82,3	65,7
2	33,3	93,6
3	68,5	67,1
4	75,5	71,1
5	72,3	90,9
6	32,2	91,9
7	44,5	63,4
8	87,7	
9	67,6	
10	68,3	
Moyenne	63,2	77,7
Ecart type	19,7	13,7
CV (%)	31,1	17,7

Tableau 9 : Reproductibilité du TPL effectuée sur des PBMC fraîchement isolées d'un même témoin (n=10) ou sur des PBMC congelées issues d'une même poche de sang d'un témoin (n=7).

A partir de cette valeur de fidélité intermédiaire, nous avons approximé la valeur de l'incertitude de mesure par la méthode GUM : Incertitude de mesure = 2 x CV de la reproductibilité

Nous avons donc obtenu comme incertitude de mesure 62,2% ou 35,4% en utilisant respectivement du sang total ou des PBMC congelées.

I.1.7 Stabilité des produits d'aphérèse sur 24h

Sur deux expériences, pour deux patients, nous avons effectué le test de prolifération sur un même échantillon de produits d'aphérèse directement après le prélèvement et après 24h de conservation.

Une ampoule de PBMC congelées témoin a été décongelée pour chacune des expériences.

Avant la mise en culture, nous avons compté les cellules. A 24h, le comptage montre une perte sur les échantillons pré-PCE de 55% et post-PCE de 45% pour le patient LEC et de respectivement 24,5% et 17% pour le patient FER.

Patient		Sans stimulation			PHA				
		Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ prolif	% de Division	Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ prolif	% de Division	Δ	Ratio Δ patient /témoin (%)
LEC H0	Témoin	19773	342	1,7	999	19088	95,0	93,3	
	Pré-PCE	9669	275	2,7	3520	10144	74,2	71,5	76,4
	Post-PCE	98	1	1,0	280	14	4,8	3,8	N.C
LEC 24H	Témoin	19597	323	1,6	6367	13975	68,7	67,1	
	Pré-PCE	9669	275	2,77	6312	7070	53,1	50.3	75,0
	Post-PCE	9	0	0	N.I	N.I	N.I	N.I	N.C
FER H0	Témoin	19520	244	1,2	1431	19442	93,1	91,9	
	Pré-PCE	19769	33	0,2	6434	14677	69,5	69,3	75,4
	Post-PCE	6635	137	2,0	1807	50	2,7	0,7	N.C
FER 24H	Témoin	19921	244	1,2	7172	13122	64,7	63,5	
	Pré-PCE	19909	61	0,3	17958	2805	13,5	13,2	20,8
	Post-PCE	3141	28	0,9	1645	21	1,3	0,4	N.C

Tableau 10 : Mesure de la stabilité après conservation 24h avant culture (n=2). Les résultats non interprétables sont surlignés en bleu. N.I : non interprétable ; N.C : non calculé

Pour le patient LEC, le nombre de cellules post-PCE était insuffisant pour interpréter l'analyse à H0 et à 24h (Tableau 10).

Pour le patient FER, l'analyse était interprétable pour l'échantillon conservé à 24h mais le nombre de cellules disponibles post-PCE était beaucoup plus important sur l'échantillon H0 (pour le même nombre de cellules mises en culture). On observe une diminution très forte du pourcentage de prolifération pré-PCE pour l'échantillon conservé 24h en comparaison de celui à H0. Une diminution a également été observée chez le témoin en moindre proportion (Tableau 10).

I.2 Résultats des patients

I.2.1 Evaluation de la prolifération des cellules pré et post-PCE

		Sans stimulation			PHA				
Patient		**Cellules CD3+ non divisées**	**Cellules CD3+ prolif**	**% de Division**	**Cellules CD3+ non divisées**	**Cellules CD3+ prolif**	**% de Division**	**Δ**	**% Inhibition**
HEI*	Témoin	20774	47	0,2	3237	52606	94.1	93.9	
	Pré-PCE	22833	36	0,2	22234	1427	6.0.	5,8	
	Post-PCE	3995	4	0,1	4498	9	0.2	0,1	98.3
DUR*	Témoin	15289	15	0,1	3130	14619	82,4	82,3	
	Pré-PCE	15042	5	0,0	14663	2252	13,3	13,3	
	Post-PCE	1095	0	0,0	615	3	0,5	0,5	96,3
BOI*	Témoin	19605	648	3,2	4986	15367	75.5	72,3	
	Pré-PCE	20042	96	0,5	11303	9094	44.6	44,1	
	Post-PCE	4263	15	0,4	1952	36	1.8	1,4	96.7
BIN**	Témoin	20644	275	1.3	6217	14396	69.8	68,5	
	Pré-PCE	1946	10	0,5	1124	90	7.4	6,9	
	Post-PCE	**136**	**1**	0,7	**120**	**1**	0.8	0,1	98.6
BES**	Témoin	19952	207	1	11631	9673	45.2	44,2	
	Pré-PCE	19792	488	2,4	19451	1500	7.2	4,8	
	Post-PCE	5552	51	0,9	18172	162	0.9	0	100
VAN**	Témoin	19899	141	0,7	10821	8940	45,2	44,5	
	Pré-PCE	4621	19	0,4	2743	272	9,0	8,6	
	Post-PCE	1000	7	0,7	969	12	1,2	0,5	93,9
REN**	Témoin	19308	435	2,2	12959	6792	34,4	32,2	
	Pré-PCE	8038	103	1,3	7252	1558	17,7	16,4	
	Post-PCE	4707	78	1,6	5684	183	3,1	1,5	90,9
LEC**	Témoin	19773	342	1,7	999	19088	95,0	93,3	
	Pré-PCE	9669	275	2,7	3520	10144	74,2	71.5	
	Post-PCE	**98**	**1**	1,0	**280**	**14**	4,8	3,8	94,8
DEW**	Témoin	19416	244	1.2	1801	18018	90,9	89,7	
	Pré-PCE	19255	623	3,1	10417	3358	24,4	21,3	
	Post-PCE	**301**	**5**	1,6	**379**	**23**	5,7	4,1	80,8
FER**	Témoin	19520	244	1,2	1431	19442	93,1	91,9	
	Pré-PCE	19769	33	0,2	6434	14677	69,5	69,3	
	Post-PCE	6635	137	2	1807	50	2,7	0,7	99,0

Tableau 11 : Pourcentages de prolifération pré/post PCE et pourcentages d'inhibition après 4 jours de culture. Les résultats non interprétables sont surlignés en bleu. **Lymphome de Sézary ; **GVH*

Nous avons effectué le test pour 10 patients âgés entre 35 et 84 ans (médiane = 54 ans) (Tableau 11).

Nous n'avons pas pu interpréter les données post-PCE pour les patients BIN, LEC et DEW à cause du trop faible nombre de cellules disponibles analysables à 4 jours. La prolifération cellulaire est interprétable pour 7 des 10 patients.

Pour les 7 expériences interprétables (Figure 25), la prolifération des cellules des témoins après stimulation par la PHA est assez importante [34,4 ; 94,1%] avec une médiane de 75,5%. La prolifération des cellules des patients avant illumination, après stimulation par la PHA, est plus faible que celle des témoins avec une médiane de 13,3% mais avec des écarts importants [6,0 ; 69,5%] (Tableau 11). La variabilité dans la réponse proliférative des patients est observée quelle que soit l'indication pour laquelle la PCE est utilisée.

Chez tous les patients, est observée une diminution importante du nombre de cellules après illumination, cela s'explique par l'entrée en apoptose des lymphocytes. Cela rend l'interprétation des résultats parfois impossible car le nombre de cellules pour pouvoir valider la technique n'est pas toujours atteint. De ce fait, les résultats des patient BIN, LEC et DEW sont ininterprétables. Pour pallier ce problème, nous avons modifié notre protocole de culture après le patient BIN et avons doublé le nombre de cellules pré-PCE mises en culture (soit 400 000 cellules) et quadruplé le nombre de cellules post-PCE (800 000 cellules).

Pour tous ces patients que nous avons testés, nous avons constaté des pourcentages d'inhibition > 90%, au-dessus du seuil défini par Evrard et par l'ANSM qui permettent de valider l'efficacité de la PCE (Figure 26).

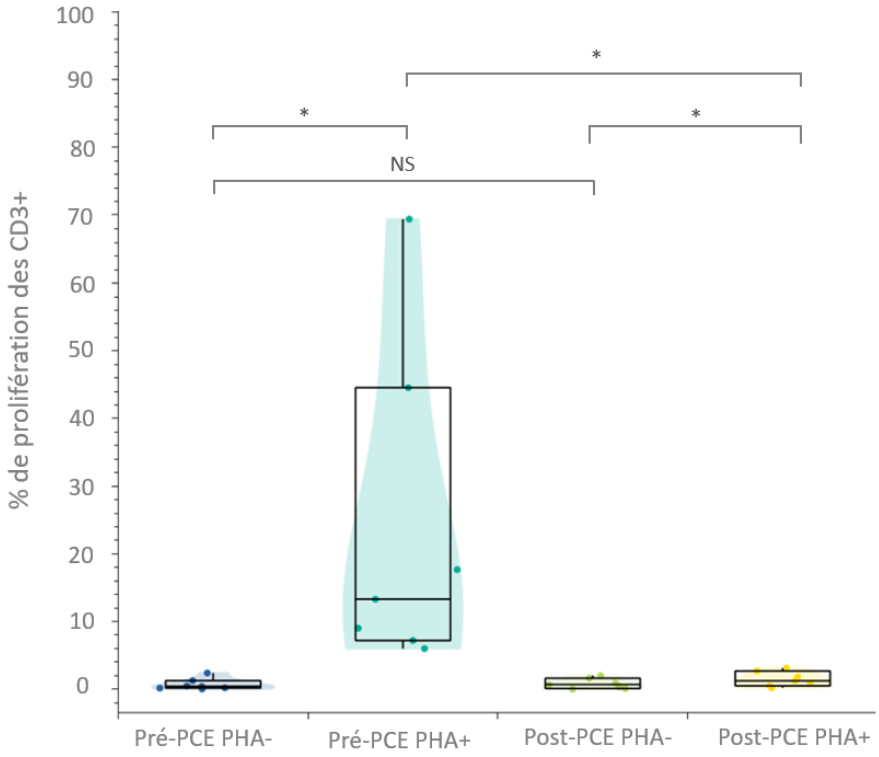


Figure 25 : Inhibition de la prolifération des lymphocytes T par la PCE après 4 jours de culture (n=7). Le trait central dans la boîte à moustache représente la médiane, les lignes supérieures et inférieures représentent les valeurs maximum et minimum. La représentation a été obtenue grâce au logiciel Ellistat. Les comparaisons ont été réalisées grâce à des tests de Wilcoxon pour séries appariées ; * $p < 0.05$

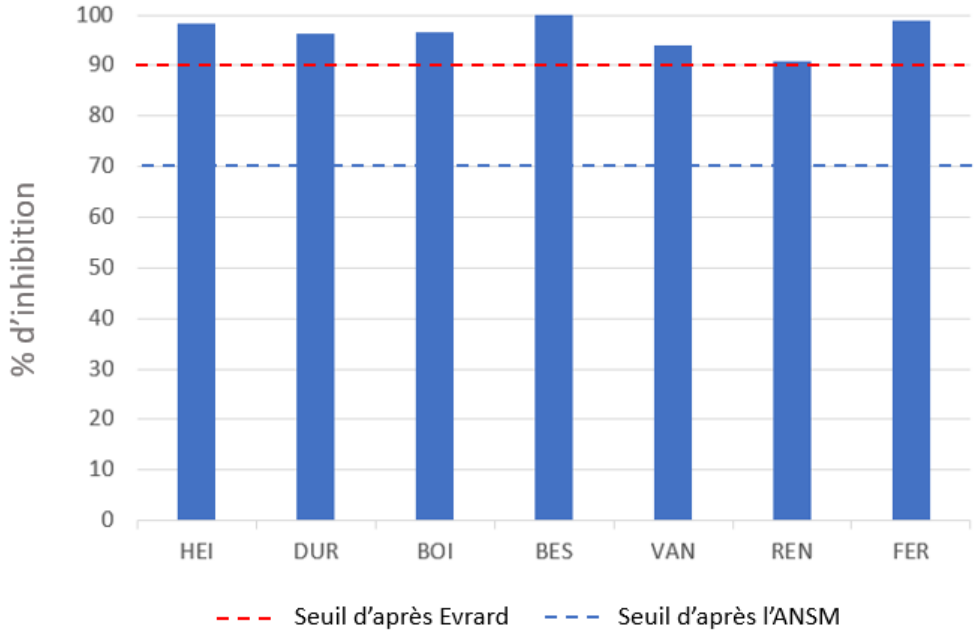


Figure 26 : Pourcentages d'inhibition de la prolifération des cellules post-PCE. Comparaison aux seuils pour valider la PCE (n=7). Seuil de 70% d'après Evrard *[138]* ; seuil de 70% d'après l'ANSM

I.2.2 Détermination de la viabilité cellulaire

Comme nous pouvons le constater en Figure 27, la proportion de cellules CD3+, 7AAD- qui correspond aux lymphocytes T viables est moins importante post-PCE que pré-PCE et chez le témoin. La présence de PHA semble entraîner une prolifération qui compense partiellement l'apoptose des cellules post-PCE.

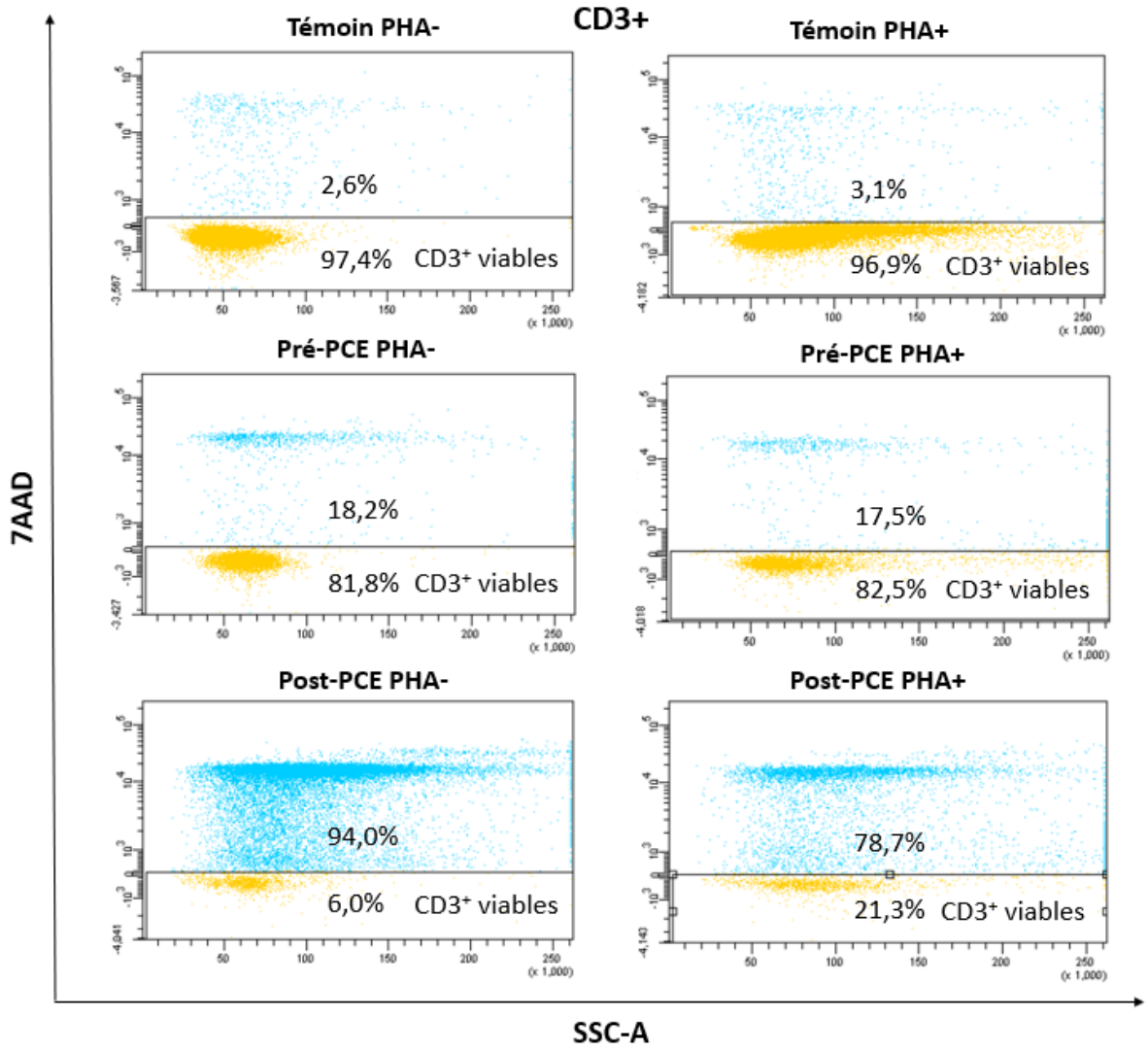


Figure 27 : Proportion de cellules CD3+, 7AAD- correspondant aux lymphocytes T viables pour un témoin et un patient Pré et Post-PCE avec ou sans stimulation par la PHA après 4 jours de culture (Patient VAN).

		Sans stimulation			PHA		
Patient		**Cellules 7AAD-/CD3+**	**Cellules 7AAD+/CD3+**	**% 7AAD-/CD3+**	**Cellules 7AAD-/CD3+**	**Cellules 7AAD+/CD3+**	**% 7AAD-/CD3+**
HEI	Témoin	20016	242	98,8	112865	5167	95,6
	Pré-PCE	21087	255	98,8	21086	690	96,8
	Post-PCE	8695	9436	48	10236	4942	67,4
DUR	Témoin	15720	450	97,2	1910	1339	93,1
	Pré-PCE	15216	614	96,1	17498	842	95,4
	Post-PCE	1212	16951	6,7	872	7557	10,3
BIN	Témoin	20107	166	99,2	21520	572	97,4
	Pré-PCE	1474	223	86,9	1626	589	73,4
	Post-PCE	**7**	**45**	13,5	**144**	**853**	14,4
BOI	Témoin	20540	524	97,5	20611	2253	90,1
	Pré-PCE	20158	1375	93,6	22083	2992	88,1
	Post-PCE	5718	22846	20	4066	12919	23,9
BES	Témoin	20260	462	97,8	22294	682	97
	Pré-PCE	20356	423	98	19259	1610	92,3
	Post-PCE	2132	66208	3,1	5603	52402	9,7
VAN	Témoin	20365	536	97,4	20346	644	96,9
	Pré-PCE	4751	1055	81,8	3313	705	82,5
	Post-PCE	1230	19290	6	1263	4658	21,3
REN	Témoin	19898	405	98	20318	852	96
	Pré-PCE	8417	100	98,8	9717	861	91,9
	Post-PCE	5394	5517	49,4	6569	2660	71,2
LEC	Témoin	20291	340	98,4	20585	5855	77,9
	Pré-PCE	9941	711	93,3	14556	3069	82,6
	Post-PCE	334	24633	1,3	1498	27523	5,2
DEW	Témoin	20301	554	97.3	20720	5563	78.8
	Pré-PCE	21511	5413	79.9	17018	6186	73.3
	Post-PCE	6802	6802	6.8	3613	71384	4.8
FER	Témoin	19777	529	97,4	29702	6726	77,4
	Pré-PCE	20805	2091	90,9	36585	10064	72,5
	Post-PCE	51580	246359	17,3	211651	187712	11,3

Tableau 12 : Comparaison de la viabilité des cellules pré/post PCE après culture avec ou sans stimulation par la PHA. Les résultats non interprétables sont surlignés en bleu.

Pour le patient BIN, les données ne sont toujours pas analysables post-PCE avec cette méthode du fait du trop faible nombre de cellules analysables après 4 jours de culture. La viabilité cellulaire est cependant interprétable pour 9 des 10 patients.

Pour les neuf patients avec des données analysables après 4 jours de culture (Figure 28), la viabilité des cellules est satisfaisante avant illumination avec ou sans stimulation par la PHA, [72,5 ; 98,8] avec une médiane de 92,1%. La viabilité des

cellules après illumination chute de façon significative, [1,3 ; 49,4%] avec une médiane de 6,8% sans stimulation et [4,8 ; 71,2%] avec une médiane de 11,3% avec stimulation par la PHA (Tableau 12). La différence de viabilité des cellules post illumination est significativement supérieure après stimulation par la PHA..

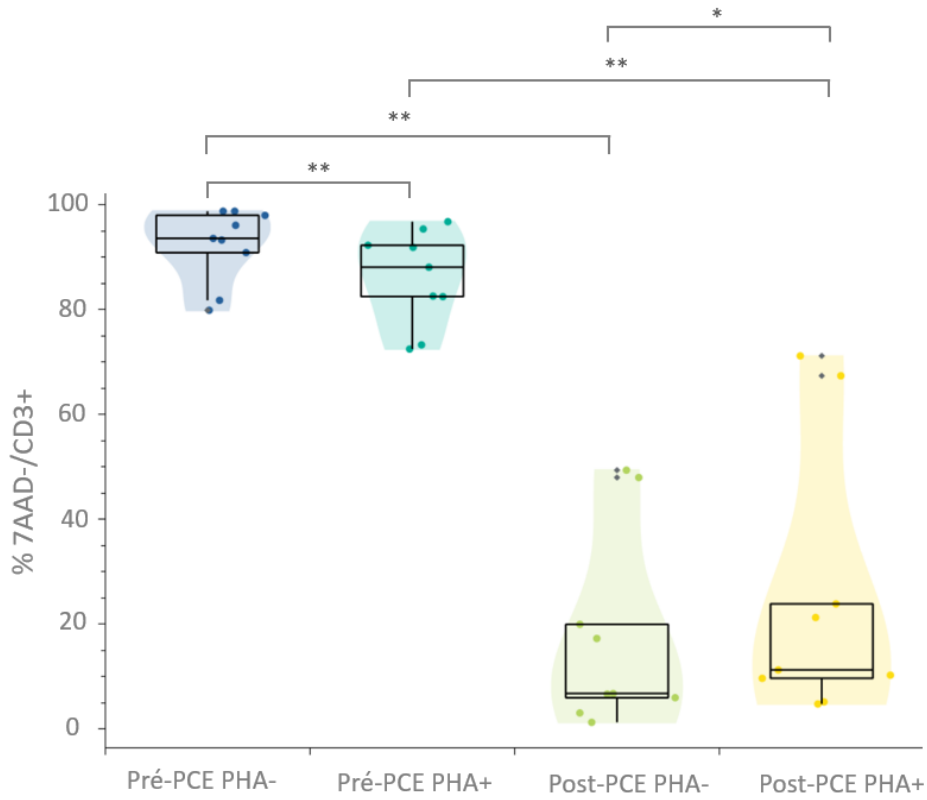


Figure 28 : Diminution de la viabilité des lymphocytes T par la PCE à J4 (n=9). Le trait central dans la boîte à moustache représente la médiane, les lignes supérieures et inférieures représentent les valeurs maximum et minimum. La représentation a été obtenue grâce au logiciel Ellistat®. Les comparaisons ont été réalisées grâce à des tests de Wilcoxon pour séries appariées ; * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$

II Réponse *in vitro* au liquide amniotique de vache

II.1 Test de prolifération lymphocytaire

Conditions de culture	Cellules CD3+ non divisées	Cellules CD3+ prolif	% de Division	Index de stimulation (SI)
Témoin + SAB 10%	12939	151	1.2	
Témoin + SAB 10% + PHA (J4)	12832	7796	37,8	NC
Témoin + SVF 10%	19591	576	2,9	2,4
Témoins + SVF10% + PHA (J4)	6465	13942	68,3	N.C
Témoin + SAB + LAV 0,3 g.l^{-1}	18626	1094	5,6	4,6*
Témoin + SAB + LAV 0,03 g.l^{-1}	1981	248	1,2	1
Témoin + SAB + LAV 0,003 g.l^{-1}	19811	228	1,1	0,9
Témoin + SAB + LAV 0,0003 g.l^{-1}	19819	273	1,4	1,3
Patient + SAB 10%	10447	111	1,1	
Patient + SAB 10% + PHA (J4)	12642	7707	37,9	N.C
Patient + SVF 10%	15386	5274	25,6	23,2*
Patient + SVF 10% + PHA (J4)	3969	16413	80,3	N.C
Patient + SAB + LAV 0,3 g.l^{-1}	13454	6804	33,6	30,5*
Patient + SAB + LAV 0,03 g.l^{-1}	12156	171	1,4	1,2
Patient + SAB + LAV 0,003 g.l^{-1}	15003	340	2,2	2,0
Patient + SAB + LAV 0,0003 g.l^{-1}	9821	98	1,0	0,9

Tableau 13 : Résultats du test de prolifération lymphocytaire pour le patient, culture réalisée sur 7 jours ou 4 jours pour les conditions avec stimulation par la PHA. LAV : liquide amniotique de vache ; SVF : sérum de veau fœtal ; *Résultats positifs avec un SI >3 ; N.C : non calculé

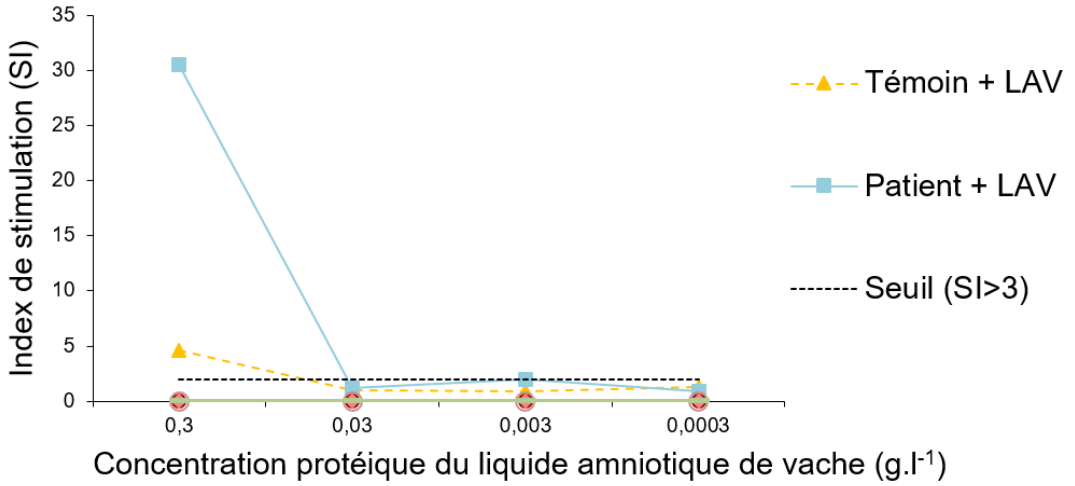


Figure 29 : Index de stimulation en fonction de la concentration protéique de liquide amniotique de vache (LAV). SI : Index de stimulation

Le patient présente une prolifération significative pour le liquide amniotique à la concentration protéique de 0,3 g.l^{-1} et pour le SVF à 10%. Le patient a proliféré environ 7 fois plus que le témoin en présence de liquide amniotique à 0,3 g.l^{-1} et environ 10 fois plus en présence de SVF à 10% (Figure 29, Tableau 13).

II.2 Résultats du test d'activation des basophiles

	% de basophiles CD63^{+}
Contrôles	
Contrôle négatif (tampon de stimulation)	0,8
Contrôle positif anti-FcεRI	92
Contrôle positif fMLP	34,7
Liquide amniotique de vache	
Liquide amniotique de vache 0,3 g.l^{-1}	1,5
Liquide amniotique de vache 0,03 g.l^{-1}	0,5
Liquide amniotique de vache 0,003 g.l^{-1}	0,5
Liquide amniotique de vache 0,0003 g.l^{-1}	0,7

Tableau 14 : Résultats du test d'activation des basophiles. Polynucléaires basophiles (PNB) mis en contact avec 4 concentrations protéiques de liquide amniotique de vache

Les contrôles positifs sont supérieurs au seuil de 10% à partir duquel les résultats sont considérés comme interprétables par le fournisseur.

Le seuil de positivité fourni par le fournisseur était de 15% pour les protéines [144], il n'y a donc pas eu de réactivité détectable (Tableau 14, Figure 29). Il n'y a pas de sujets positifs connus donc la gamme de dilution n'est pas validée.

Discussion

Dans le contexte d'évolution des méthodes d'exploration de la réponse proliférative des lymphocytes T avec le développement de techniques « froides » pour remplacer les techniques radioactives, nous avons choisi d'utiliser l'analyse de la prolifération cellulaire des lymphocytes T par cytométrie en flux grâce à la mesure de la dilution du CFSE.

Une partie de la validation de méthode a déjà été effectuée (Tableau 15) et la rédaction d'un dossier d'accréditation en portée B selon la norme ISO15189 est envisagée.

Validation de méthode et accréditation selon la norme ISO15189 :

Eléments à vérifier	Avancée
Répétabilité	Réalisé
Fidélité intermédiaire	Réalisé
Variabilité inter-opérateur	En projet
Justesse	Absence de CIQ externalisés
Exactitude	Absence d'EEQ disponibles mais échanges inter-laboratoire en projet
Sensibilité et spécificité analytique	[137]
Incertitudes	Réalisé
Etendue de mesure	Non applicable
Comparaison de méthode	[137]
Robustesse et fiabilité des réactifs	[137]
Intervalle de référence	Non applicable

Tableau 15 : Description et avancée du processus de validation de méthode selon le document SH FORM 43

Ce travail a permis de montrer l'efficacité de la méthode sur des PBMC de sujets sains. Selon les critères définis dans le SH Form 43 du COFRAC, nous avons effectué

les tests de répétabilité (n=5). Nous avons calculé la fidélité intermédiaire, celle-ci est meilleure en utilisant des PBMC congelées provenant d'une même poche de sang (n=6). L'incertitude de mesure a été déterminée en utilisant la méthode GUM.

Nous n'avons pas pu réaliser de comparaison de méthode avec la méthode de référence utilisant la thymidine car le CHU de Caen ne dispose plus de compteur β. Cependant, celle-ci a déjà été évaluée par Faivre et al qui donne à la technique une sensibilité de 100% et une spécificité de 89% en comparaison de la technique de référence utilisant la thymidine [137].

La robustesse des réactifs n'a pas été évaluée mais toujours d'après Faivre et al. les faibles variations de concentrations des cellules mises en culture, de PHA et de CFSE ne font pas varier le pourcentage de prolifération final [137]. Nous nous sommes basés également sur cette étude pour définir la stabilité des réactifs qui est de 6 mois à -20°C pour la PHA et un an à -20°C pour le CFSE [137]. Nous avons suivi les recommandations fournisseurs pour les autres réactifs.

Il n'existe pas de programme d'EEQ disponible mais un programme d'échange inter-laboratoires a déjà été initié par l'assistance publique des hôpitaux de Marseille. Il n'a pas été relancé depuis que nous avons développé la technique au CHU de Caen. En attente de la reprise de ce programme et en l'absence d'EEQ et de CIQ externalisés, nous ne pouvons donc pas calculer l'exactitude et la justesse de la technique. Enfin, une estimation de la variabilité inter-opérateur sera effectuée dès que nous aurons habilité d'autres membres du personnel du laboratoire à cette technique.

Nous avons testé la stabilité des produits d'aphérèse dans le but de pouvoir récupérer des échantillons venant d'autres centres ou de pouvoir externaliser l'analyse si besoin. Nous en avons conclu que pour le moment, cette analyse est difficilement externalisable. En effet, même si nous n'avons testé que deux patients dans notre étude de stabilité des échantillons de produit d'aphérèse, il semblerait que celle-ci soit limitée et dépendante de facteurs que nous ne maîtrisons pas (température, conditions d'acheminement…). D'autant plus que les échantillons ont été conservé dans des conditions plus favorables (milieu de culture) que dans des conditions de transport classiques. Il faudrait, pour compléter cette évaluation, refaire le test sur plus d'échantillons, en mettant plus de cellules en culture. Il faudrait potentiellement évaluer les conditions de transport, les milieux de conservation des cellules pourraient être

améliorés. Pour le moment, il est préférable de prendre en charge les échantillons directement après le prélèvement.

Suivi des produits d'aphérèse dans la PCE :

La PCE est approuvée dans le traitement des lymphomes cutanés et utilisée en seconde intention dans la maladie du greffon contre l'hôte [110]. Le choix d'un procédé d'illumination externe par l'EFS de Caen et le cadre réglementaire entourant cette pratique a nécessité l'élaboration de contrôles immunologiques par un laboratoire indépendant. Ces derniers servent à s'assurer de la qualité des lots de 8-MOP et de la bonne irradiation des cellules.

Ce travail a permis de montrer l'efficacité de la méthode sur des produits d'aphérèse et a permis de valider l'inhibition de la prolifération des cellules post irradiation.

Nous avons testé des patients pour les deux principales pathologies pour lesquelles la PCE a une indication (Lymphome de Sézary et GVH).

Concernant les patients Sézary, bien que la prolifération soit faible pré-PCE pour 2 des 3 patients, la présence de cellules de Sézary n'a pas rendu l'exploration par cette technique difficile comme cela a pu être décrit dans la littérature [137]. En effet, les cellules de Sézary CD3+ ne semblent pas proliférer en réponse à la PHA [137]. Ce phénomène est possiblement lié à une perte de la capacité de division des cellules anormales [138].

Pour les patients GVH, la prolifération pré-PCE est également plutôt faible (<20%) chez 4 des 7 des patients. Cependant, la différence de prolifération pré et post-PCE reste significative pour tous les patients ayant des résultats exploitables.

Nous avons observé qu'il restait peu de cellules post-PCE disponibles pour l'analyse après culture. Pour un tiers des patients, cela a rendu l'interprétation de l'analyse impossible. Bien que nous ayons augmenté le nombre de cellules mises en culture, cela n'a pas entièrement résolu le problème et il faudrait probablement en mettre encore davantage en culture ce qui est réalisable au regard du matériel disponible.

Pour ces cas ininterprétables, une absence de synthèse de l'ADN peut être objectivée grâce à la technique de référence utilisant la thymidine tritiée. Cependant, cette absence de synthèse de l'ADN est potentiellement due uniquement à la mortalité cellulaire et non à une diminution de la prolifération. En effet, contrairement à la

technique que nous avons utilisée, la thymidine tritiée ne donne pas d'informations quant à la viabilité des cellules.

Dans son étude, Evrard soulignait déjà les limites des contrôles immunologiques basés uniquement sur l'inhibition de la prolifération cellulaire post-PCE et soulignait l'intérêt de développer un test qui prenne en compte l'apoptose des cellules irradiées.

Nous avons quantifié la diminution de la viabilité des lymphocytes T post-PCE grâce à un marquage 7AAD [145]. Nos résultats montrent qu'il y a une diminution significative de la viabilité cellulaire pour les échantillons post-PCE. Pour les 7 patients analysables en viabilité et en prolifération, les résultats aboutissent à la même interprétation. Pour deux patients (LEC et DEW), seule l'analyse par la viabilité permet de rendre un résultat. Cette méthode peut donc être utilisée indépendamment ou en complément de la méthode classique évaluant la prolifération.

Exploration d'une dermite de contact au liquide amniotique de vache :

Pour ce patient, les tests cutanés étaient négatifs sauf pour le patch dodécyle gallate, un excipient faisant partie de la batterie excipient, cosmétique, qui était douteux, mais son imputabilité est peu probable. Les explorations biologiques de l'hypersensibilité immédiate (dosage des IgE spécifiques, TAB) étaient négatives. Cependant, pour la vache nous n'avons testé que les IgE spécifiques vache (poils et squames), l'albumine sérique et l'α-Gal. Il serait intéressant de tester les IgE dirigées contre les protéines du lait de vache. D'autres allergènes de l'épithélium et des phanères de bovins ont été identifiés dans la littérature tels que Bos d 1, Bos d 2 (lipocaline), Bos d 3 (Ca-binding homologue), Bos d 4 (α-lactalbumine), Bos d 5 (β-lactoglobuline), Bos d 7 (immunoglobuline) et Bos d 8 (caséine) [120]. Il serait intéressant de les tester en « recherche ». D'autre part, nous avons utilisé pour le TAB les concentrations recommandées par le fournisseur pour des protéines animales telles que le blanc d'œuf ou le lait mais au vu des résultats, elles pourraient être optimisées pour objectiver ce type de réaction avec un autre produit biologique. Il est donc prévu de refaire un TAB avec des concentrations plus élevées en liquide amniotique de l'ordre de celles utilisées pour le TPL ou bien encore en réponse à du SVF. Pour ce type d'allergène, la valeur seuil du fournisseur fixée à 15% de cellules exprimant le $CD63^+$ pourrait également être discutée. En effet, cette valeur est

optimale pour les protéines telles que les phospholipases des venins d'hyménoptères ou la caséine du lait mais pas forcément pour d'autres liquides biologiques.

La réalisation du TPL à titre expérimental nous a permis de constater que pour ce patient ce test semble être un bon test diagnostique. En effet, les pourcentages de prolifération après culture avec du liquide amniotique de vache à 0,3 $g.l^{-1}$ de protéines ou dans un milieu avec 10% de SVF étaient bien supérieurs aux pourcentages de prolifération observés avec les cellules d'un témoin. Les cellules du témoin avaient toutefois faiblement proliféré en réponse à la même concentration de liquide amniotique, bien que 5 fois moins que pour le patient, et n'avaient pas proliféré en réponse au SVF. Ces différences obtenues entre le patient exposé au liquide amniotique de vache et le témoin démontrent une réactivité plus importante des cellules du patient. La prolifération des cellules du témoin peut s'expliquer par une certaine forme de xénoréactivité.

Il faudrait optimiser la gamme de dilution du liquide amniotique en réalisant à nouveau le test avec des concentrations proches de celle pour laquelle nous avons observé une réaction (0,3 $g.l^{-1}$ de protéines) pour pouvoir observer une relation entre la dose et la réponse proliférative.

Afin de confirmer la spécificité de la réaction vis-à-vis de la vache, il serait intéressant de refaire le test avec des liquides amniotiques provenant d'autres espèces (ex : jument) pour lesquelles le patient ne présente pas de réaction.

Concernant les applications du TPL pour d'autres cas cliniques similaires, le résultat positif que nous avons obtenu avec le SVF à 10% suggère qu'il pourrait remplacer un liquide protéique d'origine bovine (sang, liquide amniotique, salive) pour des explorations visant à objectiver une HSR aux protéines bovines. Son accessibilité en laboratoire en fait un substitut intéressant s'il n'est pas possible d'avoir le liquide biologique suspect.

Conclusion et perspectives

La mise au point de tests qui explorent la réponse proliférative T *in vitro* permet des investigations approfondies autant pour le diagnostic des déficits immunitaires que de l'excès d'immunité. L'approche que nous avons choisie avec la mise au point du TPL au sein du laboratoire d'immunologie et immunopathologie du CHU de Caen a le mérite de fournir un outil avec des applications diversifiées : diagnostiques et de contrôle qualité. Ainsi, dans un premier temps, cette mise en place de technique a permis d'évaluer la qualité de la préparation des produits d'aphérèse destinés aux patients traités par PCE. Dans un second temps, elle a servi de test diagnostique permettant d'objectiver une hypersensibilité chez un patient atteint de dermatite de contact aux protéines du liquide amniotique de vache.

Concernant le suivi des produits d'aphérèse de PCE, ce travail s'est orienté sur la mise en place d'une méthode non radioactive de contrôle qualité mais l'existence d'un test en cytométrie ouvre d'autres perspectives. En plus d'être moins contraignante en termes de sûreté, la cytométrie et l'utilisation du CFSE apportent plus d'informations que la méthode de référence utilisant la thymidine tritiée. Il serait ainsi possible d'identifier et d'étudier les lymphocytes survivants parmi la grande majorité de lymphocytes apoptotiques incapables de se diviser. Cela pourrait permettre d'étudier les modifications des cellules qui sont réinjectées au patient et qui jouent, sans doute, un rôle dans le mode d'action *in vivo* de la PCE.

Sur le versant allergie, il est possible d'élargir ce travail et de démontrer l'efficacité du test dans le diagnostic des HSR, il nous faudra pour cela constituer une cohorte de patients positifs en tests cutanés pour des réactions d'HSR puis former des groupes appariés pour leurs manifestations cliniques respectives (exanthème maculo-papuleux, syndrome d'hypersensibilité médicamenteuse, toxidermie nécrosante…) et élargir les allergènes identifiés, protéines, médicaments (pénicillines, IPP, anticonvulsivants, allopurinol, antituberculeux, AINS). Il serait également intéressant de développer d'autres techniques telles que l'ELISpot pour le dosage des cytokines produites lors de la culture dans le but d'augmenter la sensibilité globale.

Le TPL a également sa place dans le diagnostic des déficits immunitaires en complément des tests déjà réalisés au laboratoire (dosage des immunoglobulines sériques et leurs sous-classes, phénotypage lymphocytaire étendu, sérologies vaccinales, dosage du complément) bien qu'il soit de moins en moins utilisé avec l'avènement de techniques telles que le phénotypage lymphocytaire étendu et le séquençage génétique. Le développement de la technique pour cette application et son utilisation en routine au laboratoire est en projet.

Pour conclure, les techniques d'exploration de la réponse T *in vitro* et plus particulièrement le TPL sont des techniques qui, bien qu'utilisées fréquemment en recherche, demeurent peu développées dans le diagnostic en routine hospitalière.

Il est nécessaire d'améliorer les échanges et collaborations entre laboratoires réalisant ces techniques pour une standardisation des pratiques.

Bibliographie

1 Gell PGH, Coombs RRA. *Clinical Aspects of Immunology.* Blackwell Science Ltd 1963.

2 Rojo J, Portolés P. A symmetrical view of the T-cell receptor-CD3 complex. *Immunol Today* 1991;**12**:377–8.

3 Chien Y, Bonneville M. Gamma delta T cell receptors. *Cell Mol Life Sci* 2006;**63**:2089–94.

4 Zarnitsyna V, Evavold B, Schoettle L, *et al.* Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire. *Front Immunol* 2013;**4**.

5 Klein J, Sato A. The HLA system. *N Engl J Med* 2000;**343**:702–9.

6 Res P, Martinez-Caceres E, Cristina Jaleco A, *et al.* CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood* 1996;**87**:5196–206.

7 Lind EF, Prockop SE, Porritt HE, *et al.* Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* 2001;**194**:127–34.

8 Ciofani M, Zúñiga-Pflücker JC. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;**23**:463–93.

9 Spits H. Development of αβ T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**:760–72.

10 Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, *et al.* Selection of the T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:829–74.

11 Picker LJ. Physiological and molécular mechanisms of lymphocyte homing. *Annual Reviews Inc* 1992;**10**:561–91.

12 Wawryk SO, Novotny JR, Wicks IP, *et al.* The Role of the LFA-1/ICAM-1 Interaction in Human Leukocyte Homing and Adhesion. *Immunol Rev* 1989;**108**:135–61.

13 Benczik M, Gaffen SL. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest* 2004;**33**:109–42.

14 Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol Rev* 2008;**225**:226–43.

15 Bevan MJ. Cross-priming. *Nat Immunol* 2006;**7**:363–5.

16 Huppa JB, Davis MM. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:973–83.

17 Dustin ML. The Immunological Synapse. *Cancer Immunol Res* 2014;**2**:1023–33.

18 Bouchet J, Alcover A. La synapse immunologique - Une plate-forme de signalisation dynamique pour l'activation des lymphocytes T. *Med Sci* 2014;**30**:665–70.

19 Janeway CA. The T Cell Receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992;**10**:645–74.

20 Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, *et al.* Ligand recognition by αβ T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;**16**:523–44.

21 Bridgeman JS, Sewell AK, Miles JJ, *et al.* Structural and biophysical determinants of αβ T-cell antigen recognition. *Immunology* 2012;**135**:9–18.

22 Cole DK, Pumphrey NJ, Boulter JM, *et al.* Human TCR-binding affinity is governed by MHC class restriction. *J Immunol* 2007;**178**:5727–34.

23 Saunders AE, Johnson P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cell Signal* 2010;**22**:339–48.

24 Harder T. Lipid raft domains and protein networks in T-cell receptor signal transduction. *Curr Opin Immunol* 2004;**16**:353–9.

25 Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, *et al.* T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 2009;**228**:9–22.

26 Wardenburg JB, Pappu R, Bu J-Y, *et al.* Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity* 1998;**9**:607–16.

27 Delves P, Marin S, Burton D, *et al. Roitt's essential Immunology, eleventh edition*. 2010.

28 Mou D, Espinosa J, Lo DJ, *et al.* CD28 negative T cells: is their loss our gain? *Am J Transplant* 2014;**14**:2460–6.

29 Harding FA, McArthur JG, Gross JA, *et al.* CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 1992;**356**:607–9.

30 Sharpe AH, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;**2**:116–26.

31 Jenkins MK, Taylor PS, Norton SD, *et al.* CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 1991;**147**:2461–6.

32 Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, *et al.* Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* 2013;**4**:82.

33 Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, *et al.* Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2006;**18**:206–13.

34 Sunshine J, Taube JM. PD-1/PD-L1 inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2015;**23**:32–8.

35 Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003;**193**:70–81.

36 Sprent J. T and B memory cells. *Cell* 1994;**76**:315–22.

37 Michie CA, McLean A, Alcock C, *et al.* Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 1992;**360**:264–5.

38 Valujskikh A, Li XC. Frontiers in Nephrology: T Cell Memory as a Barrier to Transplant Tolerance. *J Am Soc Nephrol* 2007;**18**:2252–61.

39 Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:269–79.

40 Caccamo N, Joosten SA, Ottenhoff THM, *et al.* Atypical human effector/memory CD4+ T cells with a naive-like phenotype. *Front Immunol* 2018;**9**:2832.

41 Sallusto F, Lenig D, Förster R, *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;**401**:708–12.

42 Ariotti S, Haanen JB, Schumacher TN. *Behavior and function of tissue-resident memory T cells*. Academic Press 2012.

43 Mahnke YD, Brodie TM, Sallusto F, *et al.* The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;**43**:2797–809.

44 Russ BE, Prier JE, Rao S, *et al.* T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front Genet* 2013;**4**:218.

45 Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999;**5**:285–94.

46 Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 2003;**19**:641–4.

47 Usui T, Nishikomori R, Kitani A, *et al.* GATA-3 Suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rβ2 chain or T-bet. *Immunity* 2003;**18**:415–28.

48 Kaplan MH. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* 2013;**252**:104–15.

49 Kaplan MH, Hufford MM, Olson MR. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol* 2015;**15**:295–307.

50 Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol* 2011;**186**:3283–8.

51 Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, *et al.* The orphan nuclear receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 2006;**126**:1121–33.

52 Crome SQ, Wang AY, Levings MK. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol* 2010;**159**:109–19.

53 Laan M, Cui Z-H, Hoshino H, *et al.* Neutrophil recruitment by human IL-17 cia C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 1999;**162**:2347–52.

54 Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 2011;**332**:65–8.

55 Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, *et al.* Type 17 T helper cells—origins, features and possible roles in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2009;**5**:325–31.

56 Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, *et al.* Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J Immunol* 2011;**187**:5615–26.

57 Reinhardt RL, Liang H-E, Locksley RM. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* 2009;**10**:385–93.

58 Liu X, Yan X, Zhong B, *et al.* Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J Exp Med* 2012;**209**:1841–52.

59 Crotty S. T Follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014;**41**:529–42.

60 Kerfoot SM, Yaari G, Patel JR, *et al.* Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 2011;**34**:947–60.

61 Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, *et al.* Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T H -17, T H 1 and T H 2 cells. *Nat Immunol* 2009;**10**:864–71.

62 Ramirez J-M, Brembilla NC, Sorg O, *et al.* Activation of the aryl hydrocarbon receptor reveals distinct requirements for IL-22 and IL-17 production by human T helper cells. *Eur J Immunol* 2010;**40**:2450–9.

63 Yssel H, Bensussan A. Existe-t-il dans la peau une nouvelle population lymphocytaire Th22 distincte des lymphocytes Th17 ? *Med Sci* 2010;**26**:12–4.

64 Fujita H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *J Dermatol Sci* 2013;**72**:3–8.

65 Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;**22**:531–62.

66 Singh AM, Dahlberg P, Burmeister K, *et al.* Inhaled corticosteroid use is associated with increased circulating T regulatory cells in children with asthma. *Clin Mol Allergy* 2013;**11**:1.

67 Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-β–induced Foxp3+CD4+ CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008;**29**:429–35.

68 Jamin C, Achour A, Youinou P, *et al.* Les lymphocytes régulateurs : une nouvelle coopération entre cellules T et B pour un contrôle plus efficace de la réponse immunitaire. *Presse Med* 2014;**43**:18–26.

69 Palomares O, Martín-Fontecha M, Lauener R, *et al.* Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-β. *Genes Immun* 2014;**15**:511–20.

70 Law RHP, Lukoyanova N, Voskoboinik I, *et al.* The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. *Nature* 2010;**468**:447–51.

71 Trapani JA. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ* 2012;**19**:21–7.

72 Lopez JA, Jenkins MR, Rudd-Schmidt JA, *et al.* Rapid and unidirectional perforin pore delivery at the cytotoxic immune synapse. *J Immunol* 2013;**191**:2328–34.

73 Peña SV, Hanson DA, Carr BA, *et al.* Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 1997;**158**:2680–8.

74 Kägi D, Ledermann B, Bürki K, *et al.* Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol* 1996;**14**:207–32.

75 Karupiah G, Xie QW, Buller RM, *et al.* Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 1993;**261**:1445–8.

76 Zhou F. Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol* 2009;**28**:239–60.

77 Plickert G, Kroiher M. Proliferation kinetics and cell lineages can be studied in whole mounts and macerates by means of BrdU/anti-BrdU technique. *Development* 1988;**103**:791–4.

78 Sun X, Zhang C, Jin H, *et al.* Flow cytometric analysis of T lymphocyte proliferation in vivo by EdU incorporation. *Int Immunopharmacol* 2016;**41**:56–65.

79 Buck SB, Bradford J, Gee KR, *et al.* Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2′-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2′-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques* 2008;**44**:927–9.

80 Notice d'uitilisation du kit EdU Click-iT™, Thermofischer sicentific®.

81 Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994;**171**:131–7.

82 Parish C. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 1999;**77**:499–508.

83 Mardiney M, Brown MR, Fleisher TA. Measurement of T-cell CD69 expression: A rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry* 1996;**26**:305–10.

84 Soares A, Govender L, Hughes J, *et al.* Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods* 2010;**362**:43–50.

85 Bitar M, Boldt A, Freitag M-T, *et al.* Evaluating STAT5 phosphorylation as a mean to assess T cell proliferation. *Front Immunol* 2019;**10**:722.

86 Czerkinsky CC, Nilsson L-Å, Nygren H, *et al.* A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983;**65**:109–21.

87 Jung T, Schauer U, Heusser C, *et al.* Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;**159**:197–207.

88 Vignali DAA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods* 2000;**243**:243–55.

89 Dabitao D, Margolick JB, Lopez J, *et al.* Multiplex measurement of proinflammatory cytokines in human serum: comparison of the meso scale discovery electrochemiluminescence assay and the cytometric bead array. *J Immunol Methods* 2011;**372**:71–7.

90 Yeung D, Ciotti S, Purushothama S, *et al.* Evaluation of highly sensitive immunoassay technologies for quantitative measurements of sub-pg/mL levels of cytokines in human serum. *J Immunol Methods* 2016;**437**:53–63.

91 Mahlaoui N, Jais J-P, Brosselin P, *et al.* Prevalence of primary immunodeficiencies in France is underestimated. *J Allergy Clin Immunol* 2017;**140**:1731–3.

92 Miot C, Poli C, Beauvillain C, *et al.* Diagnostic biologique des déficits immunitaires primitifs. *Rev Francoph Lab* 2018;**2018**:74–80.

93 Carcelain G, Labalette M. Tests in vitro de prolifération lymphocytaire. *EMC-Biol Médicale* 2019;**14**:1–5.

94 Shearer WT, Dunn E, Notarangelo LD, *et al.* Establishing diagnostic criteria for severe combined immunodeficiency disease (SCID), leaky SCID, and Omenn syndrome: the primary immune deficiency treatment consortium experience. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**133**:1092–8.

95 Elder ME. SCID due to ZAP-70 deficiency. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997;**19**:546–550.

96 Español T, Mancebo E. *CD8 Deficiency*. Oxford University Press 2009.

97 Kavadas FD, Giliani S, Gu Y, *et al.* Variability of clinical and laboratory features among patients with ribonuclease mitochondrial RNA processing endoribonuclease gene mutations. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:1178–84.

98 Pannicke U, Baumann B, Fuchs S, *et al.* Deficiency of innate and acquired immunity caused by an IKBKB mutation. *N Engl J Med* 2013;**369**:2504–14.

99 Nielsen C, Jakobsen MA, Larsen MJ, *et al.* Immunodeficiency Associated with a Nonsense Mutation of IKBKB. *J Clin Immunol* 2014;**34**:916–21.

100 Turvey SE, Durandy A, Fischer A, *et al.* The CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) signalosome complex: Stepping into the limelight of human primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**134**:276–84.

101 Serwas NK, Cagdas D, Ban SA, *et al.* Identification of ITK deficiency as a novel genetic cause of idiopathic CD4+ T-cell lymphopenia. *Blood* 2014;**124**:655–7.

102 Picard C, McCarl CA, Papolos A, *et al.* STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 2009;**360**:1971–80.

103 Somech R, Lev A, Simon AJ, *et al.* T- and B-cell defects in a novel purine nucleoside phosphorylase mutation. *J Allergy Clin Immunol* 2012;**130**:539–42.

104 Reith W, Picard C, Fischer A. *Molecular basis of major histocompatibility complex class II deficiency*. Oxford University Press 2013.

105 Pignata C, Fusco A, Amorosi S. *Deficiency of FOXN1*. Oxford University Press 2009.

106 Shiow LR, Paris K, Puck JM. *Severe combined immunodeficiency due to absent coronin-1A*. Oxford University Press 2013.

107 Notarangelo LD, Giliani S, Plebani A. *CD40 and CD40 Ligand Deficiencies*. Oxford University Press 2009.

108 CEREDIH. Tests de prolifération lymphocytaire: indications et prescription. https://www.ceredih.fr/uploads/CEREDIH_RECOS_TTL_20161219.pdf

109 Edelson R, Berger C, Gasparro F, *et al.* Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med* 1987;**316**:297–303.

110 Vanheste S, Vereecken P, Lambermont M, *et al.* Extracorporeal photochemotherapy: Review of its mechanisms of action and clinical applications. *Rev Médicale Brux* 2007;**28**:445–51.

111 Compte-rendu de la Commission de Thérapie Génique et Cellulaire, réunion du 14 Fev 2012.

112 McKenna KE, Whittaker S, Rhodes LE, *et al.* Evidence-based practice of photopheresis 1987-2001: a report of a workshop of the British Photodermatology Group and the U.K. Skin Lymphoma Group. *Br J Dermatol* 2006;**154**:7–20.

113 Hannani D, Gabert F, Chaperot L, *et al.* La photochimiothérapie extracorporelle ou l'immunothérapie par cellules modifiées par photochimie. *Rev Med Interne* 2010;**31**:321–4.

114 Bladon J, Taylor P. Extracorporeal photopheresis: a focus on apoptosis and cytokines. *J Dermatol Sci* 2006;**43**:85–94.

115 Bladon J, Taylor P. The down-regulation of IL1α and IL6, in monocytes exposed to extracorporeal photopheresis (ECP)-treated lymphocytes, is not dependent on lymphocyte phosphatidylserine externalization. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant* 2006;**19**:319–24.

116 Wei BM, Hanlon D, Khalil D, *et al.* Extracorporeal photochemotherapy: mechanistic insights driving recent advances and future directions. *Yale J Biol Med* 2020;**93**:145–59.

117 Gorgun G, Miller KB, Foss FM. Immunologic mechanisms of extracorporeal photochemotherapy in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2002;**100**:941–7.

118 Hequet O, Nosbaum A, Guironnet-Paquet A, *et al.* CD8+ T cells mediate ultraviolet A-induced immunomodulation in a model of extracorporeal photochemotherapy. *Eur J Immunol* 2020;**50**:725–35.

119 Milovanova T. Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;**72B**:265–75.

120 Crépy MN. Dermatites de contact professionnelles chez les vétérinaires et les personnels de soins aux animaux. *Dermatol Prof* 2016.

121 Goossens A. Dermatite de contact aux protéines. *Rev Fr Allergol* 2009;**49**:125–8.

122 Barbaud A, Poreaux C, Penven E, *et al.* Occupational protein contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 2015;**25**:527–34.

123 Bulcke DM, Devos SA. Hand and forearm dermatoses among veterinarians. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;**21**:360–3.

124 Degreff H, Bourgeois M, Naert C, *et al.* Protein contact dermatitis with positive RAST caused by bovine blood and amniotic fluid. *Contact Dermatitis* 1984;**11**:129–30.

125 Prahl P, Roed-petersen J. Type I allergy from cows in veterinary surgeons. *Contact Dermatitis* 1979;**5**:33–8.

126 Roger A, Guspi R, Garci-patos V, *et al.* Occupational protein contact dermatitis in a veterinary surgeon. *Occup Protein Contact Dermat Vet Surg* 1995;**32**:248–9.

127 Hjorth N, Roed-petersen J. Allergic contact dermatitis in veterinary surgeons. *Contact Dermatitis*;**6**:27–9.

128 Schmidt H. Contact urticaria. *Contact Dermatitis* 1978;:230–2.

129 Kalveram K, Kästner H, Forck G. Detection of specific IgE antibodies in veterinarians with contact urticaria. *Z Hautkr* 1986;**61**:75–81.

130 Valsecchi R, Leghissa P, Cortinovis R. Occupational contact dermatitis and contact urticaria in veterinarians. *Contact Dermatitis* 2003;**49**:167–8.

131 Nuñez-Orjales R, Martin-Lazaro J, Lopez-Freire S, *et al.* Bovine amniotic fluid: a new and occupational source of galactose-α-1,3-galactose. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2017;**27**:313–4.

132 Raison-Peyron N. Méthodologie des patch-tests : supports et allergènes. *Ann Dermatol Vénéréologie* 2009;**136**:585–91.

133 Vigan M. Lecture des tests épicutanés. *Ann Dermatol Vénéréologie* 2009;**136**:606–9.

134 Popple A, Williams J, Maxwell G, *et al.* The lymphocyte transformation test in allergic contact dermatitis: New opportunities. *J Immunotoxicol* 2016;**13**:84–91.

135 Ständer S, Oppel E, Thomas P, *et al.* Evaluation of lymphocyte transformation tests as compared with patch tests in nickel allergy diagnosis. *Contact Dermatitis* 2017;**76**:228–34.

136 Bharadwaj M, Mifsud N, McCluskey J. Detection and characterisation of alloreactive T cells. *Methods Mol Biol* 2012;**882**:309–37.

137 Faivre L, Lecouflet L, Liu W-Q, *et al.* Quality control of extracorporeal photochemotherapy: Proliferation assay using CFSE validated according to ISO 15189:2007 standards. *Cytometry B Clin Cytom* 2015;**88**:30–9.

138 Evrard B, Dosgilbert A, Jacquemot N, *et al.* CFSE flow cytometric quantification of lymphocytic proliferation in extracorporeal photopheresis: Use for quality control. *Transfus Apher Sci* 2010;**42**:11–9.

139 Richard MM-J, Olivero MS, Joussemet MM, *et al.* Compte-rendu de la commission de thérapie génique et cellulaire.

140 Levy FS, Bircher AJ, Büchner SA. Delayed-type hypersensitivity to cow's milk protein in Melkersson-Rosenthal syndrome: coincidence or pathogenetic role? *Dermatology* 1996;**192**:99–102.

141 Sainte-Laudy J, Vallon C, Guérin JC. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg Immunol* 1994;**26**:211–4.

142 Sanz ML, Gamboa PM, Antépara I, *et al.* Flow cytometric basophil activation test by detection of CD63 expression in patients with immediate-type reactions to betalactam antibiotics. *Clin Exp Allergy* 2002;**32**:277–86.

143 Uguccioni M, Mackay CR, Ochensberger B, *et al.* High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 1997;**100**:1137–43.

144 Bühlmann®. Notice Cast® Allergens Bühlmann.

145 Schmid D, Grabmer C, Streif D, *et al.* T-Cell death, phosphatidylserine exposure and reduced proliferation rate to validate extracorporeal photochemotherapy. *Vox Sang* 2015;**108**:82–8.

VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

Année de soutenance
2020

TITRE

EXPLORATION IN VITRO DE LA REPONSE PROLIFERATIVE DES LYMPHOCYTES T : MISE EN PLACE DE METHODE ET ANALYSE DE LA REPONSE ANTIGENE SPECIFIQUE

Résumé

Les lymphocytes T sont des cellules majeures du système immunitaire adaptatif dont les actions de coordination ou de cytotoxicité en font les acteurs clés de la réponse spécifique vis-à-vis d'un antigène. L'activation par l'antigène induit la prolifération lymphocytaire ou la production de cytokines. Ces réponses prolifératives et fonctionnelles peuvent être objectivées in vitro par le test de prolifération lymphocytaire (TPL). Nous avons mis en place la technique utilisant une méthode de cytométrie en flux par mesure de la dilution du CFSE au CHU de Caen. Le développement de cette technique a permis de répondre à deux objectifs. Premièrement, celui d'effectuer le contrôle qualité des poches d'aphérèse utilisées chez les patients traités par photochimiothérapie extracorporelle (PCE) à l'Etablissement Français du Sang de Caen. Nos résultats valident le processus d'irradiation en montrant la diminution de la prolifération des lymphocytes T ainsi que la diminution de leur viabilité post-PCE. Deuxièmement, la technique permet de contribuer au diagnostic des hypersensibilités retardées. Nous avons exploré un cas de dermatite de contact aux protéines de liquide amniotique de vache et nous avons ainsi pu confirmer le mécanisme allergique chez ce patient.

Mots-clés

Test de prolifération lymphocytaire ; CFSE ; Lymphocyte T ; Photochimiothérapie extracorporelle ; Hypersensibilité retardée ; Dermatite de contact

Nom et Prénom de l'auteur : Julien SERRIER

Année de soutenance
2020

TITLE

IN VITRO EXPLORATION OF IN VITRO T LYMPHOCYTE PROLIFERATION: METHOD IMPLEMENTATION AND ANALYSIS OF ANTIGEN SPECIFIC RESPONSE

Summary

T cells are major cells of the adaptive immune system whose coordination or cytotoxicity actions render them key players in the antigen specific response. Activation by the antigen induces lymphocyte proliferation or cytokine production. These proliferative and functional responses can be analyzed in vitro by the lymphocyte proliferation test (LPT). We implemented this technique at Caen University Hospital using a flow cytometry method by measuring the dilution of the CFSE. The development of this technique met two objectives. Firstly, to carry out quality controls of the apheresis bags used for patients treated with extracorporeal photochemotherapy (ECP) at Caen Etablissement Français du Sang. Our results validate the irradiation process by showing the decrease in the proliferation of T lymphocytes as well as the decrease in their post-ECP viability. Secondly, this technique can contribute to the diagnosis of delayed hypersensitivity. We explored a cow's amniotic fluid proteins contact dermatitis case and we were able to confirm the allergic mechanism for this patient.

Keywords

Lymphocyte proliferation test; CFSE; T lymphocyte; Extracorporeal photochemotherapy; Delayed hypersensitivity; Contact dermatitis

Nom et Prénom de l'auteur : Julien SERRIER