

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS
UNIVERSITÉ DE TOURS
FACULTÉ DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2025-2026

N°70

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Clara BRIGHT

DÉVELOPPEMENT D'UN PANEL D'IMMUNOPHÉNOTYPAGE
EN ROUTINE HOSPITALIÈRE : VALIDATION ANALYTIQUE
ET APPLICATION AU LUPUS SYSTÉMIQUE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 26
SEPTEMBRE 2025

Président du jury : Professeur Claire POUPLARD, pharmacien,
Laboratoire Hématologie-Hémostase – CHRU Tours

Membres du jury :
Docteur Yanis RAMDANI, médecin, Laboratoire Immunologie – CHRU Tours
Docteur Pierre BOULARD, pharmacien, Laboratoire Immunologie – CHRU Tours
Docteur Clémence GRANIER, pharmacien, Laboratoire Hématologie-Immunologie – CHU Orléans

Thèse dirigée par Docteur Yanis RAMDANI

ANNEE : 2024 - 2025

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAudeau, Mme Claire POUPLARD, Mme Audrey OUDIN, Mme GERMON Stéphanie

ENSEIGNANTS

16 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE
THIBault	Gilles	IMMUNOLOGIE

33 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE & TOXICOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphane	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE

DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
LAJOIE	Laurie	IMMUNOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SIEROCKI	Pierre	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
VERCOILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUE & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 MAST

CAMUS GABRIEL	Mathilde	Filière Officine
---------------	----------	------------------

5 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE
POUPIN	Pierre	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUE & ÉPIDÉMIOLOGIE
VEYRAT DUREBEX	Charlotte	BIOCHIMIE CLINIQUE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

BOULARD	Pierre	IMMUNOLOGIE
DOUEZ	Emmanuel	PHARMACIE GALENIQUE
TULOUP	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

GERBIER	Soledad	ANGLAIS
---------	---------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

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

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

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

Date : 26 septembre 2025

L'étudiant

Clara BRIGHT _____

Le Doyen de la Faculté

Professeur Denys BRAND

REMERCIEMENTS

Au Professeur Claire Pouplard, merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et de juger ce travail.

Au Docteur Yanis Ramdani, directeur de cette thèse, merci d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail et de m'avoir proposé un sujet intéressant et formateur en CMF. Un grand merci pour ton implication, ta disponibilité, ta patience et pour toutes ces relectures et corrections précieuses (sans parler des horaires de tes mails qui ont su égayer mes réveils matinaux à quelques reprises).

Au Docteur Clémence Granier et au **Docteur Pierre Boulard**, merci à vous d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et merci pour votre gentillesse et votre disponibilité, rendant le travail avec vous toujours agréable et instructif.

Aux équipes des laboratoires d'Immunologie des CHU de Tours et d'Orléans, auprès de qui j'ai eu la chance de me former dans une ambiance plus qu'agréable. J'ai hâte de renouveler ces semestres auprès de vos deux laboratoires. A **Valérie**, je te remercie pour ta participation à l'encadrement de ce travail ainsi que pour tes conseils et connaissances débordantes partagées lors de mon semestre au laboratoire d'immuno de Tours.

À l'équipe de l'EFS d'Orléans, merci pour l'accueil que vous m'avez réservé en tant que première interne à venir se former chez vous. J'ai adoré découvrir l'immuno-hématologie et la qualité de l'équipe, sa bonne humeur et sa gentillesse, y ont grandement participé ! Un grand merci à **Wissem**, pour tous les conseils et l'apprentissage que tu as su me partager durant ce semestre, ça a été très agréable de travailler ensemble.

À ma famille,

À Maman, pour avoir cru en mes capacités plus que moi-même et toujours soutenue. Merci d'avoir toujours fait en sorte pour que j'ai les meilleures conditions pour réussir. **A Rémy**, qui m'a toujours inspirée à faire comme lui et a grandement participé à me faire aimer les sciences. Mes capacités désastreuses en statistiques pour ce travail m'ont cependant confirmé que j'aurais fait une grosse erreur à continuer de vouloir faire comme toi en post-bac...

À mes amis,

À Léa, Pauline, Patricia, Selma, Solène pour ces années partagées à la fac de pharma et pour votre présence qui a largement adouci la préparation du concours de l'internat. Et mention spéciale à Léa pour le trajet mythique jusqu'à Rungis... J'ai hâte de revenir fêter ça auprès de vous !

Aux co-internes tourangeaux, Julie, Pauline et Susu, la team synergie négative, pour avoir rendu ce premier semestre d'internat inoubliable et pour s'être tirés vers le bas comme il se doit ! Merci Julie d'avoir renouvelé en venant en immuno avec moi, malheureusement je ne saurai jamais dépasser ton niveau d'expertise en auto-immunité car je suis trop bête...

À Julie et Aline pour avoir rendu beaucoup plus chouettes mes stages de bactériologie et de biochimie, j'aurais aimé partager d'autres semestres avec vous ! Et **à Lou-Ann**, avec qui j'ai seulement partagé râleries et potins à défaut d'avoir pu partager un semestre (Mais bon on aurait presque un doute vu comment j'ai squatté le bureau de biochimie avec toi...).

À mon Nanate, pour l'amour, le soutien et la joie que tu m'apportes au quotidien. Au-delà des heures sacrifiées à essayer de rattraper mon incompetence en informatique (désolée), ces mois de travail n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ta présence et pour tout ce qu'on a déjà pu partager ensemble, j'ai hâte de découvrir la suite. Je t'aime.

(Et **à Baguette**, qui doit en connaître plus en sciences pharmaceutiques que moi après avoir autant assisté à mes cours, révisions et finalement à la rédaction de ma thèse.)

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ANNEXES	11
 I. INTRODUCTION	13
 A. ÉPIDEMIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DU LUPUS SYSTEMIQUE	13
B. FORMES CLINIQUES ET PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	14
1. FORMES CUTANÉES ET CUTANEO-ARTICULAIRES	14
2. FORMES SYSTEMIQUES.....	15
C. DIAGNOSTIC ET SUIVI DE LA MALADIE LUPIQUE	15
1. CRITERES DIAGNOSTIQUES ET DE CLASSIFICATION.....	15
2. FORCES ET FAIBLESSES DES CRITERES BIOLOGIQUES DE LUPUS SYSTEMIQUE.....	17
3. PLACE DES SCORES D’EVALUATION DE L’ACTIVITE DE LA MALADIE	18
D. POPULATIONS CELLULAIRES CANDIDATES EN TANT QUE BIOMARQUEURS DANS LE LUPUS SYSTEMIQUE	20
1. LYMPHOCYTES T ACTIVES	20
2. LYMPHOCYTES T CD4+ FOLLICULAIRES AUXILIAIRES.....	21
2.1. Phénotype circulant.....	21
2.2. Interaction avec lymphocytes B	21
2.3. Implication dans le lupus systémique.....	22
3. MONOCYTES ET MARQUEURS FONCTIONNELS.....	22
3.1. Sous-populations monocytaires	22
3.2. Implication dans le lupus systémique.....	23
E. OBJECTIFS DE CE TRAVAIL	24
 II. MATERIELS ET METHODES.....	25
 A. ORIGINE DES PRELEVEMENTS SANGUINS	25
1. TEMOINS SAINS.....	25
2. PATIENTS LUPIQUES	25
B. RECEPTION ET PREPARATION DES PRELEVEMENT SANGUINS.....	25
1. RESPECT DES REGLES PRE-ANALYTIQUES DE LA ROUTINE HOSPITALIERE	25
2. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LE MARQUAGE MEMBRANAIRE.....	25

3.	PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LE MARQUAGE INTRA-CELLULAIRE	26
C.	ANALYSE EN CYTOMETRIE EN FLUX	26
1.	MARQUAGE DE SURFACE DES DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES D'INTERET	26
1.1.	Panel « activation lymphocytaire »	26
1.2.	Panel T folliculaire auxiliaire	27
1.3.	Panel monocytaire	27
2.	MARQUAGE INTRA-CELLULAIRE	27
D.	METHODES D'ANALYSE	29
1.	ANALYSES DES DONNEES DE CYTOMETRIE	29
2.	ANALYSES STATISTIQUES	29
III.	RESULTATS	30
A.	ADAPTATION DU MARQUAGE A LA ROUTINE HOSPITALIERE	30
1.	INTEGRATION D'UN MARQUEUR DE VIABILITE CELLULAIRE DANS LE PROTOCOLE	30
2.	CHOIX DE LA LYSE CELLULAIRE	30
3.	CHOIX DES PANELS ET STRATEGIE DE FENETRAGE	31
3.1.	Panel « activation lymphocytaire »	32
3.2.	Panel T folliculaire auxiliaire	32
3.3.	Panel monocytaire	35
B.	APPLICATION A UNE POPULATION DE PATIENTS LUPIQUES	37
1.	CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES DES PATIENTS INCLUS	37
2.	APPLICATION DES PANELS AUX PATIENTS LUPIQUES : VALIDATION DES MARQUAGES EN SITUATION PATHOLOGIQUE ET COMPARAISON AUX TEMOINS SAINS	39
2.1.	Répartition des différentes populations et sous-populations cellulaires	39
2.1.1.	Répartition des sous-populations lymphocytaires T par rapport aux témoins sains	39
2.1.2.	Répartition des sous-populations monocytaires par rapport aux témoins sains	40
2.2.	Expression des FcγR : CD64, CD32 et CD16	40
2.2.1.	Présence des FcγR sur les sous-populations monocytaires	40
2.2.2.	Analyse quantitative de l'expression des FcγR	40
2.3.	Activation lymphocytaire	41
2.3.1.	CD69	41
2.3.2.	CD25	41
2.3.3.	PD1 et ICOS	41
2.4.	Prolifération lymphocytaire (Ki67)	42
2.5.	Marqueurs de régulation lymphocytaire (CTLA-4, CD28) et de migration (CD62L)	42
2.5.1.	CTLA-4	42

2.5.2.	CD28 et CD62L.....	42
2.6.	Marqueurs de régulation monocytaire (CD163 et CD1d)	43
3.	ÉVALUATION DES PANELS DANS LA DISCRIMINATION DES PATIENTS ATTEINTS DE NEPHROPATHIE LUIQUE.....	44
3.1.	Déséquilibre des sous-populations T en lien avec la néphropathie lupique.....	44
3.2.	Activation monocytaire accrue chez les patients atteints de néphropathie lupique.....	44
3.3.	Altération des voies de régulation immunitaire T et récepteurs monocytaires.....	45
IV.	DISCUSSION	47
V.	CONCLUSION.....	54
VI.	BIBLIOGRAPHIE	55
VII.	ANNEXES	60

LISTE DES ABREVIATIONS

AAN : anticorps anti-nucléaires

ACR : American College of Rheumatology

ADNdb : ADN double brin

AHAI : anémie hémolytique auto-immune

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

BILAG : British Isles Lupus Assessment Group

CG : centre germinatif

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMF : cytométrie en flux

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigènes

DN : double négatifs

DP : double positifs

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

EFS : Établissement français du sang

EULAR : European League Against Rheumatism

FcRn : récepteur néonatal à la portion Fc des IgG

FcγR : récepteur à la portion Fc des IgG

FSC-A : forward scatter-area

HCQ : hydroxychloroquine

IFI : immunofluorescence indirecte

IFN γ : Interféron gamma

IMF : intensité moyenne de fluorescence

iNKT : lymphocytes T natural killer exprimant un récepteur T invariant

LS : lupus systémique

LT : lymphocytes T

LTfh : lymphocytes T folliculaires auxiliaires

MAI : maladie auto-immune

NL : néphropathie lupique

PBS : phosphate buffered saline

PFA : paraformaldéhyde

PGA : Physician Global Assessment

SAPL : syndrome des antiphospholipides

SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Activity Index

Sm : Smith

SSC-A : side scatter-area

SVF : sérum de veau fœtal

TA : température ambiante

TCR : T-cell receptor

TLRs : récepteurs Toll-like

uCD163s : CD163 urinaire libre

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. CRITERES DE CLASSIFICATION DU LUPUS SYSTEMIQUE SELON L'ACR/EULAR 2019.....	16
FIGURE 2. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS SELON L'AGENT DE LYSE CELLULAIRE UTILISE.....	31
FIGURE 3. STRATEGIE DE FENETRAGE DES POPULATIONS D'INTERET PARMI LES LYMPHOCYTES T	33
FIGURE 4. STRATEGIE DE FENETRAGE POUR L'ANALYSE DES LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES AUXILIAIRES (LTfh) ET DE LEURS SOUS-POPULATIONS.....	34
FIGURE 5. STRATEGIE DE FENETRAGE DES DIFFERENTES POPULATIONS D'INTERET PARMI LES MONOCYTES	36
FIGURE 6. ANALYSE EN CYTOMETRIE EN FLUX DES SOUS POPULATIONS AU SEIN DES LYMPHOCYTES T (LT) ET DES LT FOLLICULAIRES AUXILIAIRES (LTfh) CHEZ LES TEMOINS (GRIS CLAIR) ET CHEZ LES PATIENTS LUPIQUES (GRIS FONCE).....	39
FIGURE 7. REPARTITION DES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS (GRIS CLAIR) ET CHEZ LES PATIENTS LUPIQUES (GRIS FONCE).	40
FIGURE 8. INTENSITE MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DES FC GAMMA RECEPTEURS A LA SURFACE DES MONOCYTES TOTAUX CHEZ LES TEMOINS (GRIS CLAIR) ET CHEZ LES PATIENTS LUPIQUES (GRIS FONCE).....	41
FIGURE 9. EXPRESSION DE CD62L PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T CHEZ LES TEMOINS (GRIS CLAIR) ET CHEZ LES PATIENTS LUPIQUES (GRIS FONCE).....	43
FIGURE 10. EXPRESSION DU CD163 ET DU CD1d A LA SURFACE DES SOUS POPULATIONS MONOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS (GRIS CLAIR) ET CHEZ LES PATIENTS LUPIQUES (GRIS FONCE).	43
FIGURE 11. ANALYSE EN CYTOMETRIE EN FLUX DES SOUS POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES T (LT) DES PATIENTS SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) (ROSE FONCE) OU SON ABSENCE (ROSE CLAIR).	44
FIGURE 12. EXPRESSION DU CD86, EN POURCENTAGE, SUR LES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES DES PATIENTS SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) (ROSE FONCE) OU SON ABSENCE (ROSE CLAIR).	45
FIGURE 13. INTENSITE MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DES FC GAMMA RECEPTEURS SUR LES MONOCYTES TOTAUX DES PATIENTS SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) (ROSE FONCE) OU SON ABSENCE (ROSE CLAIR).	45
FIGURE 14. INTENSITE MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DU CD1d SUR LES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES DES PATIENTS SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) (ROSE FONCE) OU SON ABSENCE (ROSE CLAIR).....	46

LISTE DES TABLEAUX

TABEAU 1. CRITERES DU SCORE SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX (SLEDAI).....	19
TABEAU 2. LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LES ANALYSES DE CYTOMETRIE EN FLUX	28
TABEAU 3. CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES DES PATIENTS INCLUS	38

LISTE DES ANNEXES

TABEAU 4. REPARTITION DES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES AUXILIAIRES (LTfH) CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	60
TABEAU 5. RATIOS DES INTENSITES MOYENNES DE FLUORESCENCE (IMF) DES FC GAMMA RECEPTEURS (FCyR) SUR LES MONOCYTES TOTAUX CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS.....	60
TABEAU 6. EXPRESSION DE CD25 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	60
TABEAU 7. EXPRESSION DE PD1 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	60
TABEAU 8. CO-EXPRESSION DE PD1 ET ICOS PAR LES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES AUXILIAIRES (LTfH) CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	61
TABEAU 9. EXPRESSION DE Ki67 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	61
TABEAU 10. EXPRESSION DE CTLA-4 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	61
TABEAU 11. EXPRESSION DE CD28 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	61
TABEAU 12. EXPRESSION DE CD62L PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	61
TABEAU 13. EXPRESSION DE CD86 PAR LES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	62
TABEAU 14. EXPRESSION DE CD163 PAR LES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	62
TABEAU 15. INTENSITES MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DU CD1d SUR LES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES CHEZ LES TEMOINS ET LES PATIENTS	62
TABEAU 16. REPARTITION DES SOUS-POPULATIONS DE LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES AUXILIAIRES (LTfH) SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS.....	62
TABEAU 17. REPARTITION DES SOUS-POPULATIONS MONOCYTAIRES SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS.....	63
TABEAU 18. EXPRESSION DE CD69 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS	63

TABLEAU 19. EXPRESSION DE CD25 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS	63
TABLEAU 20. EXPRESSION DE PD1 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS	63
TABLEAU 21. EXPRESSION DE CTLA-4 PAR LES SOUS-POPULATIONS LYMPHOCYTAIRES SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS	64
TABLEAU 22. INTENSITE MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DES Fc GAMMA RECEPTEURS (FCyR) SUR LES MONOCYTES TOTAUX SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS.....	64
TABLEAU 23. EXPRESSION DE CD163 PAR LES MONOCYTES TOTAUX SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS.....	64
TABLEAU 24. INTENSITE MOYENNE DE FLUORESCENCE (IMF) DU CD1d SUR LES MONOCYTES TOTAUX SELON LA PRESENCE D'UNE NEPHROPATHIE LUPIQUE (NL) CHEZ LES PATIENTS.....	64

I. Introduction

A. Épidémiologie et physiopathologie du lupus systémique

Le lupus systémique (LS) est une maladie auto-immune (MAI) chronique, non spécifique d'organe, caractérisée par la production d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires. Elle touche préférentiellement les femmes jeunes avec un sex-ratio d'environ 9 femmes pour 1 homme et présente un pic d'incidence entre 30 et 40 ans (1). La prévalence est estimée, en France, à 47 pour 100 000 personnes avec une incidence de 4 pour 100 000 personnes par an et 400 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année dans le monde (2,3). Ces données en font une des MAI les plus fréquentes, bien que le LS reste une maladie rare. Certaines populations, notamment d'origine afro-américaine ou asiatique, présentent une prévalence plus élevée ainsi que des formes plus sévères que la population européenne (4). Le LS résulte de l'interaction entre facteurs génétiques (susceptibilité polygénique, déficits du complément, voies de l'interféron), environnementaux (UV, stress, tabac, médicaments, exposition à la silice), hormonaux (contraception, grossesse) et infectieux (Epstein Barr virus, cytomégalovirus, parvovirus B19). Ces virus peuvent induire une activation de l'immunité innée et favoriser la production d'auto-anticorps via mimétisme moléculaire (5).

Sur le plan immunologique, des anomalies de l'apoptose ou de la clairance des corps apoptotiques conduisent à l'accumulation de matériel nucléaire dans le milieu extracellulaire (6). Ce phénomène entraîne une perte de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi, avec activation aberrante des cellules dendritiques via leurs récepteurs Toll-like (TLRs), notamment TLR7 et TLR9. Ces cellules produisent en réponse des cytokines pro-inflammatoires et de l'interféron de type I, participant à l'activation de cellules T et B auto-réactives, et elles agissent en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPA) auprès de ces mêmes populations cellulaires (7).

Les lymphocytes T (LT) CD4⁺ auto-réactifs ainsi activés vont, en partie, se différencier en lymphocytes T folliculaires auxiliaires (LTfh). Ces cellules jouent un rôle crucial dans le LS par leur implication dans le développement du centre germinatif (CG) et, ainsi, dans la différenciation des lymphocytes B, à l'origine d'auto-anticorps. Les LT CD8⁺ contribuent aux lésions tissulaires via leur action cytotoxique au sein des tissus infiltrés, notamment lors de néphropathie lupique (NL), tandis que les LT CD4⁺CD8⁻, dits double négatifs (DN), soutiennent ces mécanismes par la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-17 (8,9).

Parallèlement, les monocytes entretiennent eux aussi le processus auto-immun par le biais de cytokines pro-inflammatoires ainsi que par infiltration tissulaire, sous la forme différenciée de macrophages, participant aux lésions d'organes (10). L'accumulation d'auto-antigènes et la réponse anticorps des LB aboutit à la formation de complexes immuns dont le dépôt dans les tissus initie les premières lésions

tissulaires, entretenues ensuite par l'activation du complément par les complexes immuns, à l'origine d'un afflux cellulaire local par le biais de facteurs chimiotactiques, créant ainsi une boucle inflammatoire délétère (1,7).

B. Formes cliniques et prise en charge thérapeutique

Le LS évolue par poussées entrecoupées de phases de rémissions, sans guérison possible. Cliniquement, une distinction artificielle est faite entre l'atteinte cutanée et/ou cutané-articulaire et les atteintes systémiques d'organes, les plus graves étant représentées par la NL et le neurolupus. Cette hétérogénéité clinique, d'évolution imprévisible, justifie une adaptation régulière de la stratégie thérapeutique qui est initialement centrée sur l'hydroxychloroquine (HCQ), traitement de fond de tous les patients hors contre-indication (11,12).

1. Formes cutanées et cutané-articulaires

La clinique comporte souvent un érythème du visage, dit « en masque de loup » ou en vesperilio, pour les formes typiques qui correspondent à des lésions de lupus aigu, plus ou moins associé à des arthralgies et autres atteintes dermatologiques (livedo, urticaire, alopécie, lésions des muqueuses...). Ce type d'atteinte est présent chez la majorité des patients et est très évocateur de la maladie, sans pour autant être un critère de sévérité. Le lupus subaigu, quant à lui, se verra plutôt sur le tronc et en réponse à une exposition solaire mais la distinction entre ces différentes formes est difficile et parfois impossible en clinique. D'autres manifestations cutanées plus sévères peuvent également être observées. Parmi elles, le lupus discoïde est caractérisé par des macules circulaires inflammatoires, touchant le cou, la tête et pouvant provoquer une alopécie. Cette forme est une indication à débiter un traitement rapidement car les lésions peuvent laisser des préjudices esthétiques et fonctionnels majeurs en touchant en général le visage (3).

L'atteinte articulaire du LS est caractérisée par une absence de destruction de l'articulation et une atteinte principalement ligamentaire (luxation) (3). Ces formes justifient une prise en charge symptomatique, associant l'HCQ en traitement de fond et, en fonction de la sévérité, des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), corticoïdes à faible dose ou un immunomodulateur comme le méthotrexate. Plus récemment, le belimumab (anti-BAFF) et l'anifrolumab (anti-récepteur de l'interféron de type I) ont obtenu une autorisation de mise sur le marché dans cette indication (11).

2. Formes systémiques

L'atteinte rénale concerne 30 à 40 % des patients dont 10 % évolueront vers l'insuffisance rénale terminale en 10 ans. Le début silencieux de la NL implique de la dépister systématiquement à chaque consultation (par la réalisation d'une bandelette urinaire) (12). L'atteinte rénale est, avec les complications cardiovasculaires (de la maladie, des traitements ou liées au mode de vie), parmi les causes principales de mortalité des patients lupiques. La prise en charge repose sur une trithérapie associant HCQ, corticoïdes intraveineux en phase aiguë et immunosuppresseur (mycophénolate mofétil ou cyclophosphamide) selon le profil histologique, parfois en association au belimumab (11).

Une autre atteinte remarquable par sa sévérité et sa difficulté diagnostique est le neurolupus, atteinte du système nerveux central et/ou périphérique, qui touche 25 à 30 % des patients. Les manifestations du neurolupus sont totalement aspécifiques avec une prédominance de manifestations psychiatriques pouvant retarder le diagnostic et mettre en jeu le pronostic vital des patients (13). Le traitement repose sur des principes analogues à ceux de l'atteinte rénale, excepté le traitement par belimumab. L'atteinte cardiaque, et plus spécifiquement la péricardite, concerne jusqu'à 25 % des patients lupiques (14). Les atteintes hématologiques (anémie hémolytique auto-immune (AHAI), thrombopénie immune, syndrome d'Evans) sont fréquentes, parfois associées à un syndrome des antiphospholipides (SAPL) à l'origine de manifestations thrombotiques et de fausses couches chez la femme (3,15). Les autres MAI fréquemment associées au LS sont les dysthyroïdies et le syndrome de Sjögren.

Les traitements immunosuppresseurs actuellement utilisés exposent les patients à un risque accru d'infections graves, principale cause de morbi-mortalité, ainsi qu'à un risque augmenté de néoplasies, liées à leur toxicité cumulative (16,17). Disposer de marqueurs fiables permettant de suivre avec précision l'évolution de la maladie et d'anticiper les poussées serait un atout majeur, permettant non seulement d'évaluer la réponse aux traitements mais aussi d'adapter la thérapeutique afin d'éviter une immunosuppression excessive.

C. Diagnostic et suivi de la maladie lupique

1. Critères diagnostiques et de classification

Il n'existe pas un marqueur biologique permettant d'affirmer le diagnostic avec certitude, justifiant la mise en place de critères de classification. Ceux de l'European League Against Rheumatism (EULAR) et l'American College of Rheumatology (ACR) de 2019 permettent de poser un diagnostic avec plus de spécificité en intégrant à la fois les manifestations cliniques et les anomalies immunologiques (18). Toutefois, ils ont été conçus pour uniformiser la recherche clinique et non pour guider la pratique hospitalière. Un nombre de points obtenus supérieur à 10 associés à un titre

d'anticorps anti-nucléaires (AAN) supérieur à 1/80 et comprenant au moins un critère clinique permettent de classer l'atteinte en LS. Les critères sont détaillés dans la **figure 1** ci-dessous.

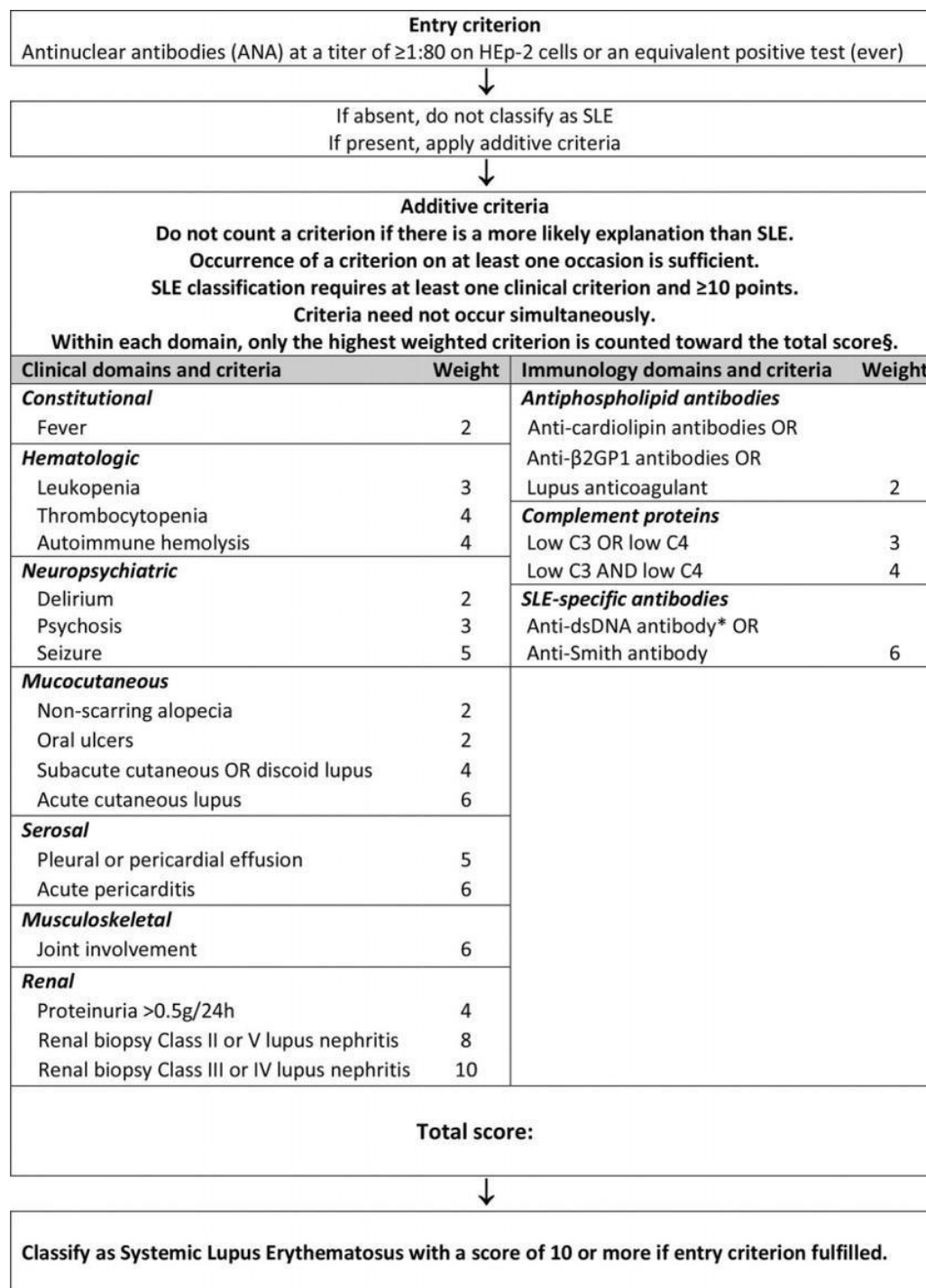


Figure 1. Critères de classification du lupus systémique selon l'ACR/EULAR 2019.

2. Forces et faiblesses des critères biologiques de lupus systémique

Parmi les marqueurs biologiques utiles au diagnostic, la recherche d'AAN est systématique pour dépister une atteinte auto-immune. Elle est réalisée par immunofluorescence indirecte (IFI) sur cellules Hep-2. Un titre d'AAN supérieur à 1/80 constitue justement le critère d'entrée pour la classification du LS selon l'ACR/EULAR (**Figure 1**). La présence d'AAN est un critère diagnostique de LS et leur absence permettra d'exclure le diagnostic du fait de la grande sensibilité de ce marqueur. Cependant, les AAN sont insuffisants à eux seuls pour poser le diagnostic à cause de leur manque de spécificité. En effet, ils peuvent être retrouvés à faible titre dans la population générale, dans diverses MAI ou même dans certaines infections et cancers (19). De plus, il peut exister un intervalle libre entre l'apparition des auto-anticorps et les premières manifestations cliniques de la maladie allant de plusieurs mois à plusieurs années (20). Ainsi, la présence d'AAN est un critère nécessaire pour évoquer le diagnostic de LS mais ne permet pas de le poser à lui seul, ni de suivre l'évolution de la maladie par la suite.

Un dépistage d'AAN positif a donc besoin d'être complété par des méthodes de dosage permettant l'identification de la spécificité des auto-anticorps et leur quantification. Parmi eux, les anti-ADN doubles brins (anti-ADNdb) sont les plus courants et les anti-Smith (anti-Sm), plus rarement retrouvés, sont les plus spécifiques du LS (21). Bien que les anti-ADNdb présentent une spécificité bien supérieure à celle des AAN, leur positivité à un taux faible peut être présente chez des individus atteints d'autres affections auto-immunes et/ou infectieuses (22). Le contrôle de leur taux est réalisé lors du suivi des patients lupiques, où ils participent au calcul du score Systemic Lupus Erythematosus Activity Index (SLEDAI) (**Tableau 1**, page 14), mais il n'est pas toujours correctement corrélé à la clinique : certains patients conservent une maladie quiescente malgré des anti-ADNdb encore positifs tandis que d'autres ont, au contraire, des taux d'anti-ADNdb faibles ou qui se négativent malgré la persistance d'une maladie active.

Le dosage du complément vient compléter les examens biologiques immunologiques à réaliser au diagnostic et lors du suivi, puisqu'une diminution des fractions C3, principalement, et C4 est fréquente lors des poussées. Des résultats de complément anormaux sont souvent associés à une atteinte d'organe, notamment rénale ou hématologique, et leur valeur participe au calcul du score d'activité SLEDAI. Une diminution du complément chez les patients lupiques peut être un indicateur de futures poussées (avec une diminution précoce de C4 par rapport à C3), notamment lors d'atteintes rénales où une baisse du C3 sérique est retrouvée (23,24). Cependant, il n'est pas toujours correctement corrélé à l'activité de la maladie ou à la présence d'une atteinte systémique, d'autres facteurs pouvant consommer le complément (contextes inflammatoires par exemple). Son suivi fait donc partie des marqueurs utiles en clinique mais il ne suffit pas non plus à objectiver une poussée ou une nouvelle atteinte d'organe.

La recherche des anticorps anti-C1q, dirigés contre une sous-unité du complexe du complément impliquée dans la clairance des complexes immuns, est parfois réalisée en cas de suspicion de NL. Bien

que ces anticorps soient insuffisamment spécifiques pour un diagnostic de LS, leur présence est corrélée à l'activité de la maladie en cas d'atteinte rénale. Leur titre varie avec l'évolution clinique, mais leur absence n'exclut pas la NL et leur apparition est souvent tardive, limitant leur valeur prédictive et leur utilisation en pratique courante (25).

Finalement, divers examens biologiques non spécifiques sont également réalisés au diagnostic et au suivi à la recherche de répercussions hématologiques, rénales ou thrombotiques notamment.

3. Place des scores d'évaluation de l'activité de la maladie

Plusieurs scores ont été créés afin d'évaluer l'activité de la maladie et suivre son évolution. Parmi eux, le SLEDAI est largement utilisé. Il évalue 24 items cliniques et biologiques de façon binaire (présence ou absence) sur les 10 derniers jours permettant d'obtenir un score global d'activité. La maladie est considérée comme active pour un score supérieur ou égal à 4 (**Tableau 1**). Ce score est rapide et reproductible, facile à faire en consultation ou au lit du malade. Cependant, il ne permet ni l'analyse fine de l'atteinte au niveau d'un organe précis, ni le suivi de la dynamique clinico-biologique du patient (26).

Items	Points
Convulsions <i>Apparition récente, exclusion des causes métaboliques, infectieuses ou médicamenteuses.</i>	8
Psychose <i>Perturbation de l'activité normale en rapport avec une altération sévère de la perception de la réalité. Comprend : hallucinations, incohérence, appauvrissement du contenu de la pensée, raisonnement illogique, comportement bizarre, désorganisé ou catatonique. Exclusion d'une insuffisance rénale ou d'une cause médicamenteuse.</i>	8
Atteinte cérébrale <i>Altération des fonctions mentales avec troubles de l'orientation, de la mémoire ou autre d'apparition brutale et d'évolution fluctuante. Comprend : troubles de la conscience avec réduction des capacités de concentration, incapacité à rester attentif avec en plus 2 au moins des manifestations suivantes : troubles perceptifs, discours incohérent, insomnie ou somnolence diurne, augmentation ou diminution de l'activité psychomotrice.</i>	8
Troubles visuels <i>Atteinte rétinienne du lupus. Comprend : nodules dysoriques, hémorragies rétiniennes, exsudats séreux ou hémorragies choroïdiennes, névrite optique. Exclusion d'une cause hypertensive, infectieuse ou médicamenteuse.</i>	8
Atteinte des nerfs crâniens <i>Neuropathie sensitive ou motrice d'apparition récente touchant un nerf crânien.</i>	8
Céphalées <i>Céphalées sévères et persistantes, pouvant être migraineuses mais résistant aux antalgiques majeurs.</i>	8
Accident vasculaire cérébral <i>Accident vasculaire cérébral d'apparition récente. Artériosclérose exclue.</i>	8
Vascularite <i>Ulcérations, gangrène, nodules digitaux douloureux, infarctus péri-unguéaux ou preuve histologique ou artériographie de vascularite.</i>	8
Arthrites <i>Plus de 2 articulations douloureuses avec des signes inflammatoires locaux (douleur, tuméfaction ou épanchement articulaire).</i>	4

Myosite <i>Douleur/faiblesse musculaire proximale associée à une élévation des CPK et/ou aldolases ou à des modifications électromyographiques ou à une biopsie montrant des signes de vascularite.</i>	4
Cylindres urinaires <i>Cylindres de globules rouges.</i>	4
Hématurie <i>> 5 GR / champ en l'absence de lithiase, d'infection ou d'une autre cause.</i>	4
Protéinurie <i>>0,5 g/24h. Apparition récente ou majoration récente de plus de 0,5g/24h.</i>	4
Pyurie <i>> 5 GB/champ en l'absence d'infection.</i>	4
Alopécie <i>Apparition récente ou récurrence d'une alopécie en plaque ou diffuse.</i>	2
Ulcères muqueux <i>Apparition récente ou récurrence d'ulcérations orales ou nasales.</i>	2
Pleurésie <i>Douleur thoracique d'origine pleurale avec frottement ou épanchement ou épaississement pleural.</i>	2
Péricardite <i>Douleur péricardique avec au moins l'une des manifestations suivantes : frottement, épanchement ou confirmation électrographique ou échographique.</i>	2
Complément <i>Diminution du CH50, du C3 ou du C4 inférieure à la normale inférieure du laboratoire.</i>	2
Anti-ADNdb <i>Positivité > 25% par le test de Farr ou taux supérieur à la normale du laboratoire.</i>	2
Fièvre <i>>38° en l'absence de cause infectieuse.</i>	1
Thrombopénie <i>< 100 000 plaquettes/mm³.</i>	1
Leucopénie <i>< 3 000 GB/mm³ en l'absence de cause médicamenteuse.</i>	1

Tableau 1. Critères du score Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI).

Adapté de Bombardier et al., Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on Prognosis Studies in SLE (27).

D'autres outils ont été proposés, comme le score BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) qui évalue chaque atteinte d'organe de manière indépendante en fonction du traitement requis. Ce score reflète mieux la réalité clinique du LS, notamment pour les formes multiviscérales, mais sa complexité de cotation et le temps nécessaire à son calcul limitent son utilisation en pratique courante, en dehors des essais cliniques (26). Le PGA (Physician Global Assessment), quant à lui, offre une approche globale plus rapide mais reste subjectif et dépend fortement de l'expérience du clinicien (28). En pratique, c'est donc le SLEDAI qui demeure l'outil de référence le plus utilisé, en raison de sa simplicité, de sa reproductibilité et de son intégration dans le suivi standardisé des patients.

D. Populations cellulaires candidates en tant que biomarqueurs dans le lupus systémique

Malgré la multiplicité des scores d'évaluation et des marqueurs biologiques, aucun d'eux n'allie, seul ou combiné, finesse d'évaluation clinique et praticité en routine hospitalière. Dans cette perspective, la cytométrie en flux (CMF) apparaît comme un allié de choix pour évaluer de manière rapide et peu invasive le compartiment immunitaire circulant des patients lupiques. Ce travail s'intéresse à trois populations cellulaires qui sont impliquées dans la physiopathologie du LS et dont la mesure régulière pourrait participer à suivre l'activité de la maladie à l'aide d'un simple prélèvement sanguin : les LT activés, les LTfh auxiliaires et les monocytes.

1. Lymphocytes T activés

Les LT jouent un rôle central dans l'orchestration de la réponse auto-immune. En situation normale, les LT naïfs transitent dans les organes lymphoïdes secondaires via le récepteur CCR7 et la L-sélectine CD62L. Leur activation débute par la reconnaissance d'un complexe formé du peptide antigénique et du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), présenté par une CPA, via le T-cell receptor (TCR) suivie d'une co-stimulation par CD28 induisant notamment l'expression des marqueurs d'activation CD25 et CD69 et des molécules inhibitrices telles que CTLA-4 et PD1 afin d'éviter une activation incontrôlée. En aval, l'activation de la voie mTOR permet la prolifération, la différenciation et la production d'IL-2 (29). L'implication des LT dans la physiopathologie du LS est largement documentée. Des anomalies de signalisation, notamment au niveau du complexe TCR/CD3, ont été décrites chez les patients lupiques, conférant à ces cellules une hyperréactivité à des antigènes normalement tolérés (30). Cette hypersensibilité favorise l'activation de clones T auto-réactifs qui participent à l'auto-immunité persistante.

Dans les phases actives de la maladie, les LT présentent un phénotype activé. Parmi eux, les LT CD8⁺ sont particulièrement impliqués dans les lésions tissulaires et dans l'entretien du processus auto-immun par le biais de leur activité cytotoxique (1). Leur augmentation, ainsi que celle de la production de granzyme B et de perforine, molécules impliquées dans leur cytotoxicité, sont corrélées à l'activité clinique du lupus (mesurée selon le score SLEDAI) (31). Ce profil est absent chez les patients en rémission, suggérant un intérêt potentiel de la quantification de cette population pour évaluer l'activité de la maladie. Des études ont également mis en évidence la présence accrue de LT CD8⁺, accompagnée d'un ratio CD4⁺/CD8⁺ diminué, dans les urines de patients atteints de NL, renforçant ainsi le lien entre cette population lymphocytaire et les atteintes viscérales (32).

En parallèle, les LT CD4⁺ contribuent à la pathogénèse via leur différenciation en sous-populations pro-inflammatoires, comprenant notamment les LTfh (décrits ci-dessous en **I. D. 2.**) et les Th17 (1). Ils amplifient la réponse auto-immune en soutenant la production d'auto-anticorps et en sécrétant diverses cytokines. Parmi elles, l'IL-17, cytokine pro-inflammatoire, participe aux lésions tissulaires et au recrutement cellulaire local, et l'IL-21 soutient les Th17 et stimule l'activation des LB, leur différenciation et production d'auto-anticorps (33,34). Conjointement à la polarisation vers un phénotype pro-inflammatoire des LT CD4⁺, certaines études suggèrent une diminution quantitative et/ou fonctionnelle des LT CD4⁺ régulateurs chez les patients lupiques, de façon corrélée avec l'activité de la maladie, entraînant une absence de régulation adéquate du processus inflammatoire (9).

Une autre population lymphocytaire impliquée est celle des LT DN, en particulier ceux exprimant le TCR $\gamma\delta$, qui contribuent à la production d'IL-17 et participent à la présentation antigénique et au soutien de la réponse B auto-réactive (9). Leur implication dans les lésions de NL par ces mécanismes est décrite dans la littérature (35).

Ainsi, dans le LS, l'équilibre entre cellules T effectrices et régulatrices est profondément altéré. Le suivi dynamique des marqueurs d'activation et de régulation lymphocytaire (CD25, CD69, PD1, CTLA-4) pourrait offrir une évaluation plus fine du déséquilibre immunitaire. Leur mesure par CMF représente une approche prometteuse pour anticiper les poussées et mieux personnaliser la prise en charge thérapeutique.

2. Lymphocytes T CD4⁺ folliculaires auxiliaires

2.1. Phénotype circulant

Les LTfh font partie des LT CD4⁺ et siègent principalement dans le CG des organes lymphoïdes secondaires tandis qu'une faible partie se trouve dans le sang circulant (36).

Ils sont identifiables dans la circulation par l'expression du marqueur CXCR5, récepteur de chimiokine leur permettant de migrer vers les follicules des CG, et de l'absence de CD45RA, marqueur des LT naïfs (37). Ils sont différenciés en 3 sous-types selon l'expression des marqueurs de surface CXCR3 et CCR6 : LTfh1 (CXCR3⁺CCR6⁻), LTfh2 (CXCR3⁻CCR6⁻) et LTfh17 (CXCR3⁻CCR6⁺) (36).

2.2. Interaction avec lymphocytes B

Les LTfh exercent un rôle central dans l'activation et la différenciation des LB au sein des organes lymphoïdes secondaires où ils sont nécessaires à la formation et au maintien du CG. En interagissant directement avec les LB via trois couples moléculaires (ICOS/ICOS-L, CD40/CD40L et TCR/CMH II) et en produisant l'IL-21, cytokine clé de la réponse humorale, ils favorisent leur survie et leur différenciation en plasmocytes, contribuant à la production d'anticorps de haute affinité. Les LTfh sont

composés des sous-populations LTfh1, LTfh2 et LTfh17 qui se distinguent par leurs profils de cytokines et leur impact fonctionnel : les LTfh1 sont associés à la production d'IgG mais ont une capacité d'aide aux B relativement limitée ; les LTfh2 induisent plus efficacement la production d'IgG et d'IgE ; les LTfh17 favorisent quant à eux la production d'IgA et participent à une réponse inflammatoire accrue (37). Ces spécificités les impliquent dans la régulation de la réponse humorale tant en situation physiologique (réponse vaccinale ou infectieuse) que pathologique (auto-immunité, allergies et cancers).

2.3. Implication dans le lupus systémique

De nombreuses études ont montré que les LTfh jouent un rôle important dans la physiopathologie du LS. Chez les patients lupiques, une augmentation de ces cellules dans le sang circulant est retrouvée, souvent accompagnée d'une modification de la répartition de leurs sous-types. En effet, certains travaux suggèrent une hausse des sous-populations LTfh2 et LTfh17 au détriment des LTfh1 chez les patients atteints d'un LS actif (38). De plus, les LTfh présentent une expression augmentée de PD-1 et ICOS, dont la co-expression sur les LTfh témoigne d'un état d'activation cellulaire, spécifiquement chez les patients ayant une maladie active (37,39).

Ainsi, ces cellules participent activement à la pathogénèse du LS en soutenant l'activation et la différenciation de LB auto-réactifs au sein des CG. L'analyse de ces sous-populations activées dans le sang périphérique pourrait représenter un outil complémentaire dans le suivi des patients atteints de LS.

3. Monocytes et marqueurs fonctionnels

3.1. Sous-populations monocytaires

Les monocytes participent à la réponse immunitaire innée par leur capacité de présentation antigénique, de phagocytose et de production de cytokines inflammatoires. Ils sont différenciés en 3 sous-populations en fonction des expressions membranaires de CD14 et de CD16, récepteur à la portion Fc des IgG (FcγR) de faible affinité (FcγRIII). On distingue ainsi les monocytes classiques (CD14⁺⁺CD16⁻), non classiques (CD14⁻CD16⁺⁺) et intermédiaires (CD14⁺CD16⁺).

Les monocytes classiques sont majoritaires et représentent environ 90 % des monocytes totaux en situation physiologique. Ils assurent principalement des fonctions de phagocytose. Ils circulent dans le sang périphérique et peuvent migrer dans les tissus par chimiotactisme où ils se différencient en macrophages, cellules dendritiques ou parfois en monocytes non-classiques. Les monocytes non-classiques présentent une faible capacité de phagocytose mais sont principalement impliqués dans la production de fortes quantités de cytokines pro-inflammatoires. Les monocytes intermédiaires sont, quant à eux, plus difficiles à caractériser fonctionnellement et combinent les fonctions des deux autres

sous-types en ayant une activité de phagocytose et en communiquant avec les LT en tant que CPA, favorisant leur prolifération (40).

Une fois dans les tissus, les monocytes peuvent se différencier en macrophages M1, de profil pro-inflammatoire, ou en macrophages M2, de profil anti-inflammatoire, impliqués dans la réparation tissulaire et la résolution de l'inflammation. Ce basculement phénotypique dépend du micro-environnement et reste réversible, jouant ainsi un rôle clé dans le maintien ou la résolution de l'inflammation chronique observée dans le LS (41).

3.2. Implication dans le lupus systémique

Sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires, les monocytes peuvent agir en tant que CPA. Ils expriment à leur surface des molécules comme CD86 qui reflète un état d'activation et participe à l'activation des LT via le second signal de co-stimulation, renforçant ainsi l'activation de LT auto-réactifs. L'expression de CD86 est stimulée par l'interféron gamma (IFN γ), cytokine dont la production est augmentée au cours de la maladie lupique et en particulier lors de poussées (42).

Les monocytes interagissent également avec les lymphocytes Natural Killer exprimant un récepteur T invariant (iNKT), via le marqueur CD1d impliqué dans la présentation d'antigènes glycolipidiques (43). Les iNKT peuvent produire de grandes quantités de cytokines et moduler les réponses immunitaires, jouant un rôle potentiel dans les phénomènes d'activation incontrôlée et d'auto-immunité du LS. Bien que moins étudié que d'autres, CD1d constitue un marqueur d'intérêt pour évaluer les capacités de présentation antigénique des monocytes à ces cellules (44).

Par ailleurs, les récepteurs CD64 (Fc γ RI) et CD32 (Fc γ RII), interviennent dans la phagocytose et la réponse inflammatoire via la reconnaissance des complexes immuns. Leur expression est modulée dans diverses situations pathologiques, y compris le LS, et participe à amplifier la réponse immunitaire. Finalement, la dynamique de polarisation des monocytes vers des macrophages de type M1 ou M2 est également un élément central de l'inflammation chronique dans le LS (45). Les monocytes et macrophages M2 expriment à leur surface le marqueur CD163, impliqué dans la clairance de l'hémoglobine libre et jouant un rôle anti-inflammatoire. Sa forme soluble est retrouvée augmentée dans les urines des patients atteints de NL active, ce qui suggère une implication tissulaire de macrophages M2 non fonctionnels ou en transition vers un phénotype pro-inflammatoire au sein des lésions rénales (46).

Ainsi, bien que de nombreux marqueurs puissent être étudiés dans le LS, ceux décrits ci-dessus représentent à la fois les fonctions classiques des monocytes (activation, présentation antigénique, phagocytose) et leur dynamique de polarisation, appliquée au LS, dans l'inflammation chronique. Leur analyse en CMF dans le suivi de patients lupiques permettrait de conserver une approche compatible avec une application hospitalière de routine.

E. Objectifs de ce travail

Le premier objectif de ce travail de thèse est de réaliser la mise au point d'un protocole de marquage par CMF des populations lymphocytaires et monocytaires, adapté aux contraintes de routine hospitalière du laboratoire d'immunologie. Le protocole ainsi que les anticorps d'intérêt et la combinaison des fluorochromes seront validés sur prélèvements de témoins sains.

Le deuxième objectif est l'application de ces panels à des patients lupiques afin de vérifier leur faisabilité et leur pertinence sur des patients inflammatoires, souvent cytopéniques et sous traitements immunosuppresseurs.

La validation de ces objectifs permettra de faire une première comparaison entre patients lupiques et témoins sains puis entre patients lupiques ayant des profils de maladies différents afin d'évaluer l'intérêt de la CMF dans leur suivi.

II. Matériels et méthodes

A. Origine des prélèvements sanguins

1. Témoins sains

Les prélèvements sanguins de donneurs sains sont prélevés sur tube acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et obtenus dans le cadre de la convention établie entre l'Etablissement Français du Sang (EFS) et le CHRU de Tours (n° CA-REC-2019-188).

2. Patients lupiques

Les prélèvements sanguins des patients lupiques sont issus de la cohorte du protocole FiNK Lupus : « Etude de l'expression de récepteur néonatal au Fc des IgG (FcRn) dans les lymphocytes T Natural Killer exprimant un récepteur T invariant : implication dans la physiopathologie du lupus systémique », validé en juin 2023 par le Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest II (identifiant DR230103/FiNK Lupus) et pour lequel chaque patient a consenti à participer de façon libre et éclairée.

B. Réception et préparation des prélèvement sanguins

1. Respect des règles pré-analytiques de la routine hospitalière

Les règles pré-analytiques appliquées sont similaires à celles des analyses de CMF couramment réalisées au laboratoire : le sang est maintenu à température ambiante (TA) et l'analyse doit être réalisée dans les 24 heures suivant l'heure de prélèvement.

2. Préparation des échantillons pour le marquage membranaire

Deux lavages successifs de 300 µL de sang total sont réalisés dans 10 mL de tampon de cytométrie constitué de phosphate buffered saline (PBS) 1X (Immunoconcepts®), 2mM d'EDTA (Invitrogen, Thermo Fisher scientific®) et de sérum de veau foetal (SVF) à 2%. Cela permet d'éliminer le plasma et de récupérer, après centrifugation, un culot cellulaire constitué d'hématies et de leucocytes.

Le culot est re-suspendu dans 300µL de tampon de cytométrie et réparti entre 3 tubes, correspondant aux 3 panels créés (**Tableau 2**, page 28). Le marquage des populations cellulaires est, ensuite, réalisé selon le protocole décrit ci-dessous (**II. C**, page 26).

Après le marquage membranaire, 1 mL de Versalyse (ref 109777, Beckman Coulter®) est ajouté avant une nouvelle incubation de 15min à TA et à l'obscurité. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues en tampon de cytométrie et celles marquées avec le panel « d'activation monocytaire » (**II. C. 1. 1.3**, page 27) sont analysées.

3. Préparation des échantillons pour le marquage intra-cellulaire

Pour les cellules marquées avec le panel « activation lymphocytaire » décrit ci-dessous (**II. C. 1. 1.1.**), un marquage intra-cellulaire supplémentaire est réalisé. Pour cela, deux étapes de fixation de 15 minutes à 4°C et à l'obscurité sont préalablement réalisées afin de conserver le marquage extracellulaire. Les cellules sont d'abord fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) 4 % (Thermo Fisher scientific) puis une deuxième fixation est réalisée avec le kit FlowX FoxP3/Transcription factor fixation and permeabilisation buffer kit (R&D System®). Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans du tampon de perméabilisation contenant l'anticorps selon le protocole détaillé (**II. C. 2.**, page 27).

C. Analyse en cytométrie en flux

1. Marquage de surface des différentes populations cellulaires d'intérêt

Le marquage est réalisé sur 10^4 cellules. Les cellules sont suspendues dans un tampon de marquage de cytométrie (**II. B. 2.**, page 20) et les différentes étapes sont réalisées à l'obscurité et à 4°C afin de prévenir l'internalisation des cibles membranaires. Les FcγR sont bloqués par ajout de Fc block (Fc Blocking Reagent, humain, 130-059-901, Miltenyi®) afin de prévenir une liaison aspécifique par la région Fc des anticorps couplés aux fluorochromes. Après 15 min d'incubation, un lavage en tampon de marquage de cytométrie est réalisé puis les anticorps des différents panels sont ajoutés pour une incubation de 30 min avant un nouveau lavage.

Un marqueur de viabilité des cellules live/dead VG (Invitrogen, Thermo Fisher scientific®) est également ajouté dans chaque panel afin de s'assurer de la viabilité des cellules analysées.

1.1. Panel « activation lymphocytaire »

Les LT sont identifiés à l'aide de l'anti-CD3 APC (Biolegend®) et les sous-populations sont caractérisées par l'anti-CD4 A700 (Biolegend®) et l'anti-CD8 PE/Cy7 (Biolegend®).

L'activation des lymphocytes est étudiée à l'aide des anticorps anti-CD25 BV605 (BioLegend®) et anti-CD69 APC (BioLegend®). Les mécanismes régulateurs de la réponse T sont analysés grâce aux anticorps anti-CD28 FITC, anti-CTLA-4 PE/V615 et anti-PD1 PE/Cy7 (BioLegend®). Enfin, la capacité de migration des LT a été évaluée grâce à l'anticorps anti-CD62L PerCP (BioLegend®).

1.2. Panel T folliculaire auxiliaire

Les LT sont identifiés à l'aide de l'anti-CD3 APC (Biolegend®) et les sous-populations sont caractérisées par l'anti-CD4 A700 (Biolegend®) et l'anti-CD8 PE/Cy7 (Biolegend®). Les LTfh sont identifiés grâce à l'anti-CXCR5 APC (Biolegend®) et à l'anti-CD45RA PerCP/Cy 5.5 (Biolegend®). Les sous-types de LTfh sont caractérisés grâce aux anticorps anti-CXCR3 PE DAZZLE (Biolegend®) et anti-CCR6 FITC (Biolegend®). L'activation de ces cellules est étudiée grâce au marquage par l'anti-CD278 (ICOS) BV605 (Biolegend®) et l'anti-PD1 PE/Cy7 (Biolegend®).

1.3. Panel monocytaire

Les monocytes sont identifiés à l'aide d'un anticorps anti-CD14 BV421 (Biolegend®) et les sous-populations monocytaires sont caractérisées par l'anti-CD16 A700 (Biolegend®). Les autres FcγR sont étudiés à l'aide de l'anticorps anti-CD32 PC7 (Biolegend®) et l'anti-CD64 PE (Biolegend®). Les LT sont identifiés avec l'anti-CD3 APC (Biolegend®). Le marqueur de costimulation et d'activation CD86 est détecté avec l'anti-CD86 PC5,5 (Biolegend®). Le CD1d est détecté par un anti-CD1d APC (BD Biosciences®) et le CD163 est détecté par un anti-CD163 PE V615 (Miltenyi®).

2. Marquage intra-cellulaire

Un marquage intracellulaire par Ki67 est réalisé pour évaluer la prolifération cellulaire dans les panels « activation lymphocytaire » et T folliculaire auxiliaire. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C et à l'obscurité avec un anticorps anti-Ki67 BV421 (Biolegend®), préalablement dilué au 1/10^{ème} dans du tampon de perméabilisation issu du kit FlowX FoxP3/Transcription Factor Fixation and Permabilisation Buffer kit (R&D System®). Après centrifugation, les cellules sont finalement re-suspendues en tampon de cytométrie pour analyse.

L'ensemble des panels est résumé dans le **tableau 2**.

	Cible	Fluorochrome	Marque	Référence
Panel “activation lymphocytaire”	CD3	APC	Biolegend®	317342
	CD4	Alexa Fluor 700	Biolegend®	317426
	CD8	PE/Cy7	Biolegend®	344712
	CD25	BV605	Biolegend®	302632
	CD69	APC	Biolegend®	310910
	CD62L	PerCP	Biolegend®	304824
	CTLA-4	PE/V615	Biolegend®	369616
	CD28	FITC	Biolegend®	377612
	PD1	PE/Cy7	Biolegend®	621608
	Ki67	BV421	Biolegend®	350506
	LCD	VioGreen	Invitrogen®	L34955
Panel T folliculaire auxiliaire	CD3	APC	Biolegend®	317342
	CD4	Alexa Fluor 700	Biolegend®	317426
	CD8	PE/Cy7	Biolegend®	344712
	CD278 (ICOS)	BV605	Biolegend®	313538
	CD45RA	PerCP/Cy 5.5	Biolegend®	304156
	CXCR5	APC	Biolegend®	356908
	CXCR3	PE DAZZLE	Biolegend®	353736
	CCR6	FITC	Biolegend®	353412
	PD1	PE/Cy7	Biolegend®	621608
	Ki67	BV421	Biolegend®	350506
	LCD	VioGreen	Invitrogen®	L34955
Panel monocytaire	CD14	BV421	Biolegend®	325628
	CD16	A700	Biolegend®	302026
	CD32	PE/Cy7	Biolegend®	303214
	CD64	PE	Biolegend®	305008
	CD86	PE/Cy5.5	Biolegend®	374216
	Cd1d	APC	BD Biosciences®	563505
	CD163	PE-V615	Miltenyi®	033-348
	CD3	APC	Biolegend®	317342
	LCD	VioGreen	Invitrogen®	L34955

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés pour les analyses de cytométrie en flux.

LCD : marqueur de viabilité cellulaire.

D. Méthodes d'analyse

1. Analyses des données de cytométrie

Les échantillons ont été analysés sur l'automate de CMF DxFlex (Beckman Coulter®) composé de 3 lasers permettant la lecture de 10 canaux simultanés. Les données recueillies sont analysées grâce au logiciel Kaluza C version 1.2 (Beckman Coulter®).

2. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism, version 8.0.2.263. Les données sont exprimées sous forme de médiane et intervalle interquartile pour les variables non paramétriques et de moyenne et écart-type pour les variables paramétriques. La normalité de la distribution des variables quantitatives a été évaluée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. En cas de distribution normale, les comparaisons entre groupes ont été effectuées par un test t de Student (variables indépendantes) ou un test t apparié (variables dépendantes). Pour les variables non normalement distribuées, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons entre deux groupes. Un seuil de signification statistique de $p < 0,05$ a été retenu pour toutes les analyses.

Seuls les résultats significatifs ont été signalés, par la présence d'un astérisque, sur les figures présentées dans la partie résultats. Les résultats non significatifs ne sont pas annotés. Certains résultats non significatifs ne sont pas détaillés dans les résultats pour des raisons de clarté ; ils sont disponibles dans les annexes.

III. Résultats

A. Adaptation du marquage à la routine hospitalière

1. Intégration d'un marqueur de viabilité cellulaire dans le protocole

Pour l'adaptation de notre protocole à un usage en routine hospitalière, nous avons choisi d'utiliser les conditions pré-analytiques classiques : prélèvement sur tube EDTA et analyse dans les 24 heures suivant le prélèvement. Afin de confirmer que ces conditions permettent d'obtenir des échantillons majoritairement composés de cellules vivantes, nous avons intégré un marqueur de viabilité cellulaire (LCD) à notre panel.

Un prélèvement conservé 72 heures a été utilisé comme contrôle positif, révélant une proportion attendue de cellules mortes d'environ 50 %. Ce contrôle a ainsi permis de valider que, dans les conditions pré-analytiques classiques, la viabilité cellulaire reste élevée et que le protocole peut être appliqué sans risque majeur de biais liés à la dégradation des échantillons.

L'ajout du LCD n'a pas altéré la mesure des paramètres des panels, notamment les proportions de LT CD4+ et CD8+, qui sont restées comparables entre les échantillons analysés avec et sans LCD : la valeur médiane de LT CD4+ avec LCD était de 5,3 % contre 5,5% sans ($p=0,89$) et la médiane de LT CD8+ avec LCD était de 4,4% contre 4,3% sans ($p=0,9$).

Les prélèvements de huit témoins sains, issus de l'EFS, ont été analysés afin de valider le protocole.

2. Choix de la lyse cellulaire

Deux agents de lyse différents étaient disponibles au laboratoire et ont été testés lors de la mise au point du protocole de marquage : le Versalyse™ et le Versafix™. La lyse induite par le Versafix™ a montré une mauvaise discrimination des populations cellulaires comparativement au Versalyse™ (**Figure 2**). Ce dernier a donc été conservé comme agent de lyse pour la suite des expérimentations.

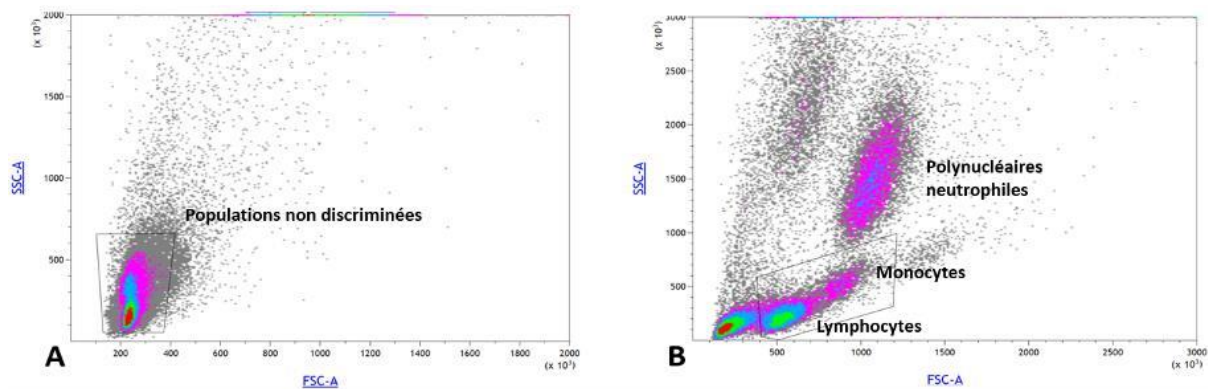


Figure 2. Comparaison des résultats obtenus selon l'agent de lyse cellulaire utilisé.

Analyse en cytométrie en flux des cellules, représentées selon leur structure (ordonnée) et leur taille (abscisse) après **A.** Lyse réalisée à l'aide de l'agent Versafix™ et **B.** Lyse réalisée à l'aide de l'agent Versalyse™. SSC-A : side scatter-area ; FSC-A : forward scatter-area.

3. Choix des panels et stratégie de fenêtrage

Les marqueurs d'activation lymphocytaire, les FcγR et autres marqueurs fonctionnels étudiés ici ne sont pas intégrés aux panels utilisés actuellement en routine hospitalière. Avant d'évaluer leur pertinence dans le contexte de LS, nous avons testé la faisabilité de leur détection directement sur sang total et initialement chez des témoins sains.

Tous les panels discutés ci-dessous reposent sur une stratégie de fenêtrage initiale commune aboutissant à la sélection des cellules vivantes. La première étape est une sélection des cellules selon leur structure (SSC-A) et taille (FSC-A) suivi de la sélection des cellules individuelles (singulets). Ensuite, l'isolement des cellules vivantes est réalisé grâce au marquage de viabilité cellulaire (**étapes A à C des figures 3, 4 et 5 aux pages 28, 29 et 31 respectivement**).

L'ensemble des panels repose sur des marqueurs phénotypiques classiques, choisis afin de privilégier une approche sensible et étendue plutôt qu'un ciblage restreint et hautement spécifique.

3.1. Panel « activation lymphocytaire »

Dans le LS, les altérations lymphocytaires quantitatives et qualitatives participent activement au développement et à l'entretien de la réponse auto-immune. Leur activation prolongée constitue une signature immunologique importante de la maladie.

Les LT sont, tout d'abord, isolés à partir des cellules vivantes exprimant le marqueur CD3. Parmi cette population, les LT CD4⁺, CD8⁺, DN (CD4⁻CD8⁻) et CD4⁺CD8⁺, dits double positifs (DP), sont isolés. Cette première étape permet d'analyser la répartition des grandes sous-populations de LT.

La stratégie de fenêtrage est poursuivie par l'étude de l'expression de marqueurs fonctionnels liés à l'activation, à la co-stimulation, à l'inhibition et à la migration. Les différents marqueurs sont étudiés sur la population totale des LT ainsi que sur chacune des sous-populations. L'expression de CD69 témoigne d'une activation récente, tandis que CD25 reflète une activation plus prolongée ou une appartenance au compartiment régulateur (approchée par la mesure de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF)). PD1 est évalué en tant que marqueur d'activation prolongé (épuisement fonctionnel). L'expression de CTLA-4 et de CD28 est ensuite analysée afin d'évaluer l'équilibre entre signaux de co-stimulation et de régulation. Enfin, l'expression de CD62L est utilisée pour identifier les LT conservant leur capacité de migration vers les organes lymphoïdes secondaires (**Figure 3**).

3.2. Panel T folliculaire auxiliaire

Les LTfh constituent une sous-population spécialisée de LT CD4⁺ impliquée dans l'aide aux lymphocytes B et la formation des CG.

La stratégie de fenêtrage débute par la sélection des cellules LT CD3⁺ vivantes. Parmi cette population, les LT CD4⁺, CD8⁺, DN (CD4⁻CD8⁻) et DP (CD4⁺CD8⁺) sont isolés. Ensuite, les LTfh sont isolés parmi les LT CD4⁺ par l'expression du marqueur CXCR5 et l'absence d'expression du CD45RA (distinguant les cellules naïves CD45RA⁺ des cellules mémoire CD45RA⁻).

Les sous-types fonctionnels des LTfh sont identifiés parmi les cellules CD4⁺CXCR5⁺CD45RA⁻ selon l'expression croisée de CXCR3 et CCR6, permettant de distinguer les profils LTfh1 (CXCR3⁺CCR6⁻), LTfh2 (CXCR3⁻CCR6⁻) et LTfh17 (CXCR3⁻CCR6⁺). Enfin, l'activation des LTfh totaux et de leurs sous-populations est évaluée par la co-expression de ICOS et PD1 ; les cellules double positives ICOS⁺PD1⁺ étant considérées comme activées (**Figure 4**).

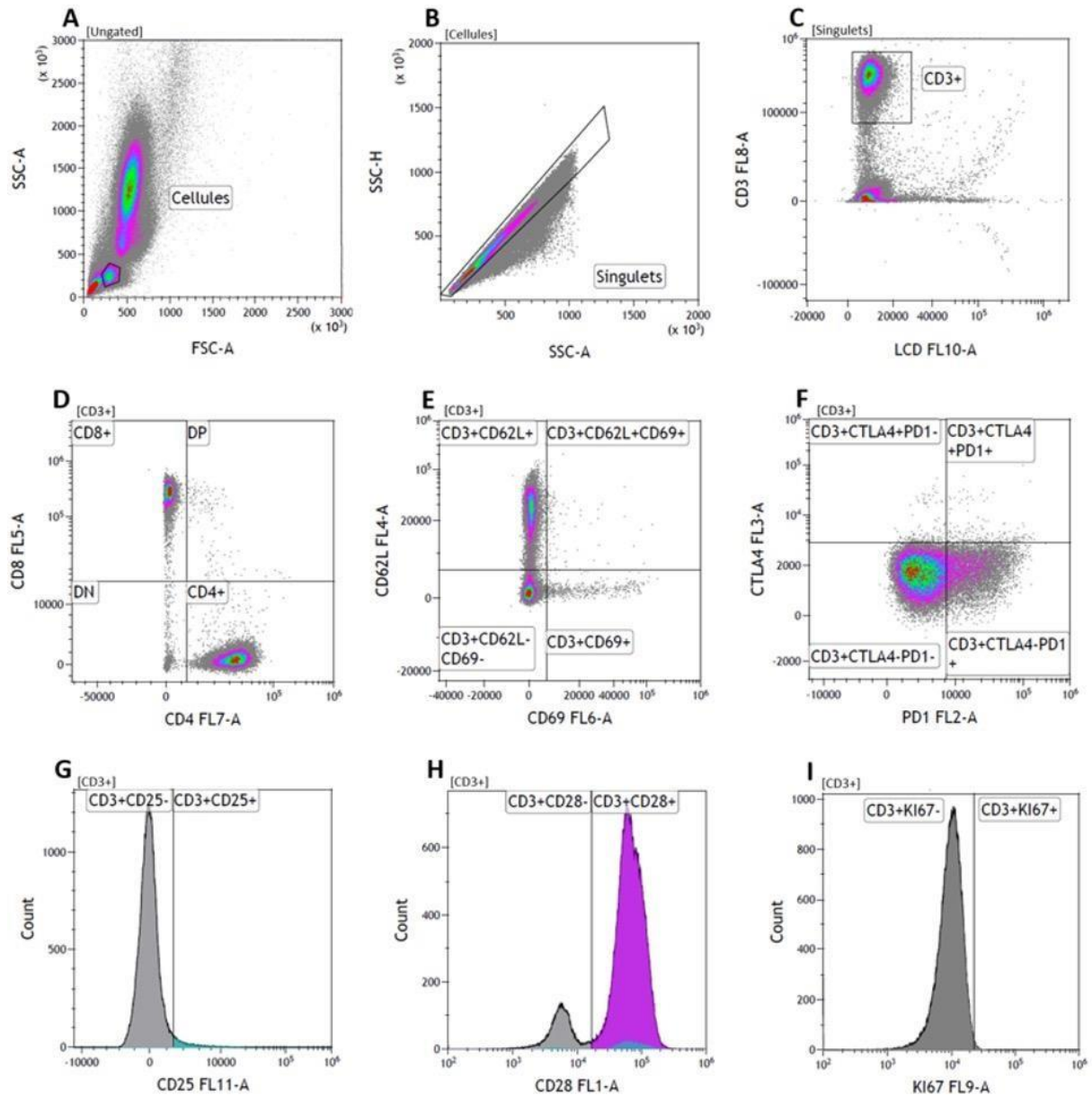


Figure 3. Stratégie de fenêtrage des populations d'intérêt parmi les lymphocytes T.

A. Sélection des lymphocytes sur la base de leur taille (abscisse) et de leur structure (ordonnée). **B.** Sélection des cellules individuelles (singlets) au sein de la fenêtre isolée en A. **C.** Sélection parmi les singlets des cellules exprimant fortement le CD3 (ordonnée) et faiblement le marqueur de viabilité cellulaire (abscisse) permettant d'isoler les populations lymphocytaires T (LT). **D.** Expression du CD8 (ordonnée) et du CD4 (abscisse) dans la population fenêtrée en C, permettant d'isoler les LT CD8⁺ (quadrant supérieur gauche), LT CD4⁺ (quadrant inférieur droit), les doubles positifs (quadrant supérieur droit) et doubles négatifs (quadrant inférieur gauche). **E.** Expression du CD62L (ordonnée) et de CD69 (abscisse) à la surface des LT totaux et sous-populations isolées en D (non montré). **F.** Expression de CTLA-4 (ordonnée) et de PD1 (abscisse) par les LT totaux et sous-populations isolées en D (non montré). **G.** Histogramme évaluant le nombre de cellules exprimant le CD25 à leur surface (fenêtre de droite) en pourcentage et en intensité moyenne de fluorescence (IMF) parmi les LT totaux et sous-populations isolées en D (non montré). **H.** Histogramme évaluant le nombre de cellules exprimant le CD28 à leur surface (fenêtre de droite) en pourcentage et en IMF parmi les LT totaux et sous-populations isolées en D (non montré). **I.** Histogramme évaluant le nombre de cellules exprimant Ki67 (fenêtre de droite) parmi les LT totaux et sous-populations isolées en D (non montré). SSC-A : side scatter-area ; FSC-A : forward scatter-area ; SSC-H : side scatter-height ; LCD : marqueur de viabilité cellulaire.

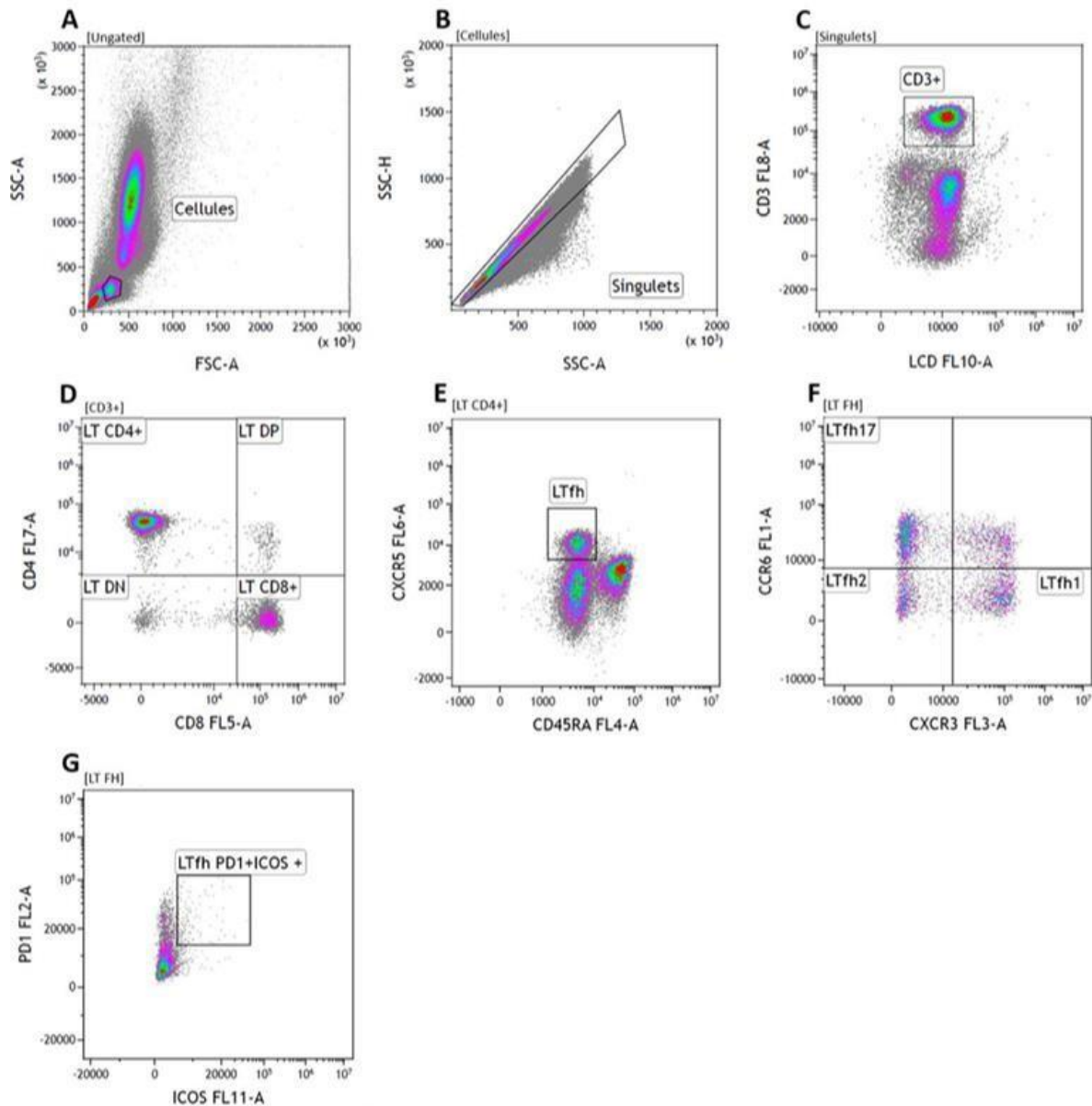


Figure 4. Stratégie de fenêtrage pour l'analyse des lymphocytes T folliculaires auxiliaires (LTfh) et de leurs sous-populations.

A. Sélection des lymphocytes sur la base de leur taille (abscisse) et de leur structure (ordonnée). **B.** Sélection des cellules individuelles (singlets) au sein de la fenêtre isolée en A. **C.** Sélection parmi les singlets des cellules exprimant fortement le CD3 (ordonnée) et faiblement le marqueur de viabilité cellulaire (abscisse) permettant d'isoler les populations lymphocytaires T (LT). **D.** Expression du CD4 (abscisse) et du CD8 (ordonnée) dans la population fenêtrée en C, permettant d'isoler les LT CD4+ (quadrant supérieur gauche), LT CD8+ (quadrant inférieur droit), les doubles positifs (quadrant supérieur droit) et doubles négatifs (quadrant inférieur gauche). **E.** Identification des LTfh, à partir de la population des LT CD4+ isolée en D, par leur forte expression de CXCR5 (ordonnée) et leur absence d'expression de CD45RA (abscisse). **F.** Identification des sous-types de LTfh, fenêtrés en E, selon leur expression de CCR6 (ordonnée) et CXCR3 (abscisse). **G.** Fenêtrage des cellules co-exprimant PD1 et ICOS parmi les LTfh totaux et parmi les sous populations de LTfh isolées en F (non montré). SSC-A : side scatter-area ; FSC-A : forward scatter-area ; SSC-H : side scatter-height ; LTfh : lymphocytes T folliculaires auxiliaires ; LCD : marqueur de viabilité cellulaire.

3.3. Panel monocyttaire

Les monocytes sont des cellules de l'immunité innée capables de phagocytose, de présentation antigénique et de production cytokinique. Dans cette stratégie de fenêtrage, les monocytes sont identifiés au sein des cellules vivantes en fonction de leur structure SSC-A et l'expression de CD14. Ensuite, les sous-populations classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermédiaires ($CD14^{+}CD16^{+}$) et non classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$) sont isolées en fonction de leur expression de CD16. Des marqueurs fonctionnels sont évalués sur l'ensemble des sous populations monocytaires et sur les monocytes totaux.

L'analyse est poursuivie par l'étude des FcγR CD32 et CD64, évalués en fréquence et en IMF. Ces récepteurs de moyenne et forte affinité pour les IgG respectivement, jouent un rôle central dans la prise en charge des complexes immuns et dans l'inflammation. Le marqueur CD86 est également analysé comme marqueur d'activation.

Enfin, CD163 et CD1d sont évalués : CD163 permet d'identifier des sous-population avec un profil plus régulateur tandis que CD1d est inclus pour évaluer les interactions avec certaines cellules lymphocytaires non conventionnelles (**Figure 5**).

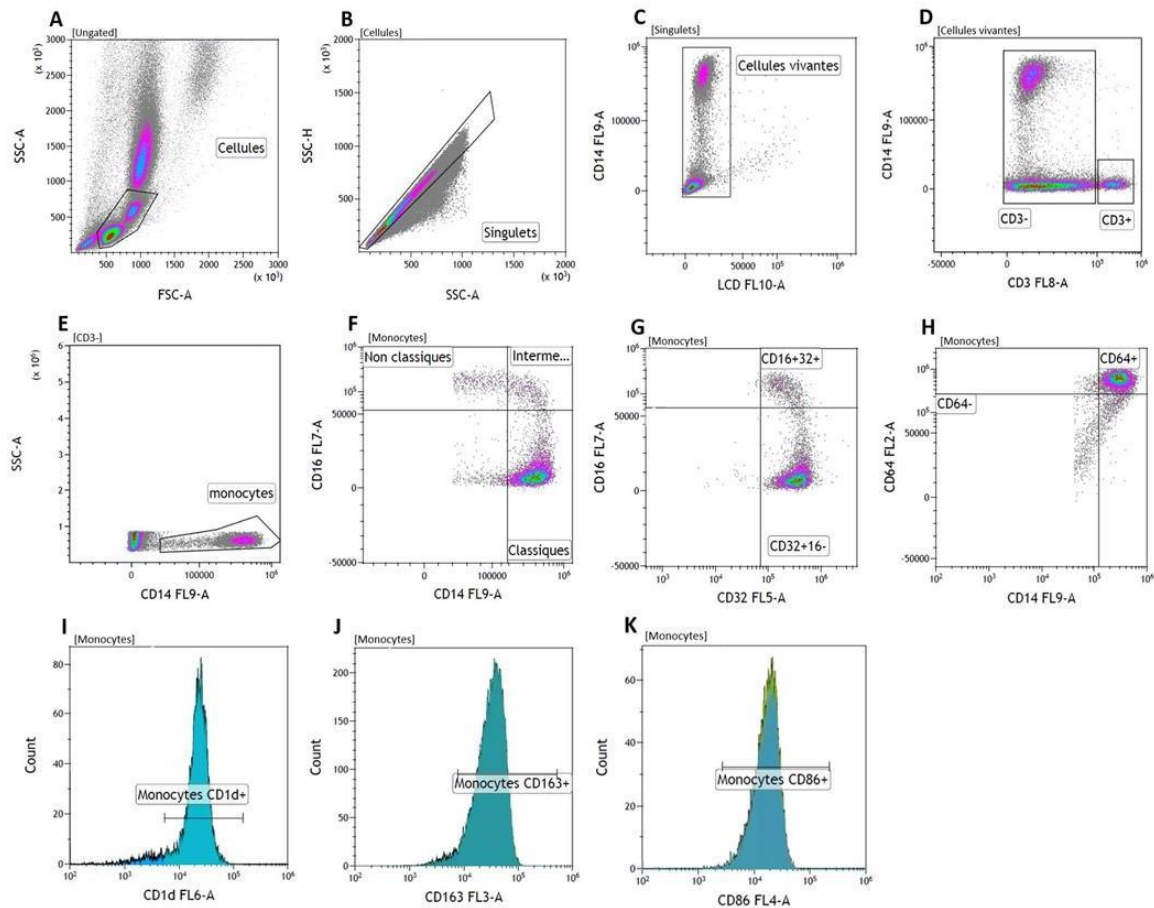


Figure 5. Stratégie de fenêtrage des différentes populations d'intérêt parmi les monocytes.

A. Sélection des lymphocytes et des monocytes sur la base de leur taille (abscisse) et de leur structure (ordonnée). **B.** Sélection des cellules individuelles (singlets) au sein de la fenêtre isolée en A. **C.** Sélection parmi les singlets de l'ensemble des cellules exprimant faiblement le marqueur de viabilité (abscisse). **D.** Identification à partir de la population isolée en C des cellules n'exprimant pas CD3 (CD3-) et des cellules exprimant le CD3 (CD3+). **E.** Isolement à partir de la population CD3- fenêtrée en D des monocytes, exprimant CD14 (abscisse) et de faible structure (ordonnée). **F.** Identification à partir de la population fenêtrée en E et en fonction de leur expression de CD16 (ordonnée) et CD14 (abscisse) des sous-populations monocytaires, avec les monocytes non classiques (quadrant supérieur gauche), les intermédiaires (quadrant supérieur droit) et les classiques (quadrant inférieur droit). **G.** Évaluation, dans la population fenêtrée en E, de l'expression du CD32 (abscisse) en fonction du CD16 (ordonnée) en pourcentage et en intensité moyenne de fluorescence (IMF). **H.** Évaluation, dans la population fenêtrée en E, de l'expression du CD64 (ordonnée) en fonction du CD14 (abscisse) en pourcentage et en IMF. **I.** Histogramme évaluant l'IMF du CD1d dans la population fenêtrée en E (exemple) et dans les sous populations identifiées en F (non montré). **J.** Histogramme évaluant le pourcentage de cellules exprimant le CD163 dans la population fenêtrée en E (exemple) et dans les sous populations identifiées en F (non montré). **K.** Histogramme évaluant le pourcentage de cellules exprimant le CD86 ainsi que son IMF dans la population fenêtrée en E et dans les sous populations identifiées en F (non montré). SSC-A : side scatter-area ; FSC-A : forward scatter-area ; SSC-H : side scatter-height ; LCD : marqueur de viabilité cellulaire.

B. Application à une population de patients lupiques

1. Caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus

Onze patients lupiques ont été inclus, leurs caractéristiques sont détaillées dans le **tableau 3**. Tous ont été inclus lors d'une consultation de suivi de la maladie. L'âge moyen au diagnostic était de 34 ans (21 ; 72) et l'âge moyen à l'inclusion était de 44 ans (27 ; 75). Parmi eux, 9 étaient des femmes (81%).

Parmi les 11 patients inclus, 5 (45,5 %) d'entre eux ont un antécédent d'atteinte rénale dont un associait une atteinte cérébrale et un autre associait un épanchement pleural. Les autres patients ont uniquement des antécédents d'atteintes cutané-articulaires. A l'inclusion, 2 des 11 patients présentaient un score SLEDAI ≥ 4 , témoignant d'une maladie active, sur le plan rénal pour l'un, rénal et neurologique pour le second.

Une MAI était associée chez 7 patients : 4 d'entre eux présentaient un SAPL et l'un d'entre eux présentait aussi un syndrome de Gougerot-Sjögren. Parmi les 3 autres patients, une cryoglobulinémie, un rhumatisme psoriasique et un purpura thrombotique thrombocytopénique étaient retrouvés.

Dix d'entre eux (91 %) étaient sous HCQ. Parmi eux, 5 (50 %) avaient une trithérapie avec des corticoïdes et un immunosuppresseur parmi le méthotrexate, l'acide mycophénolique, l'anifrolumab, l'azathioprine ou le belimumab ; 3 (30 %) avaient une bithérapie associant à l'HCQ un immunosuppresseur parmi ceux précédemment cités et 1 patient avait une bithérapie associant l'HCQ et des corticoïdes. Le seul patient non traité par HCQ était sous méthotrexate et corticoïdes.

Les analyses en CMF des patients lupiques ont été comparées aux résultats des témoins sains utilisés pour valider le protocole.

Patients	n=11
Age moyen	
Au diagnostic	34 (21-72)
A l'inclusion	44 (27-75)
Sexe	
Femme	9 (81,8%)
Homme	2 (18,2%)
Nouveau diagnostic à l'inclusion	0
Activité de la maladie	
SLEDAI < 4	9 (81,8%)
SLEDAI ≥ 4	2 (18,2%)
Traitements	
Hydroxychloroquine	10 (90,9%)
Corticoïdes	7 (63,6%)
Mycophénolate mofétil	4 (36,4%)
Méthotrexate	3 (27,3%)
Belimumab	3 (27,3%)
Azathioprine	1 (9,1%)
Anifrolumab	1 (9,1%)
Rituximab	0
Antécédents d'atteinte clinique	
Articulaire	9 (81,8%)
Cutanée	7 (63,6%)
Rénale	5 (45,5%)
Neurologique	1 (9,1%)
Séreuses	1 (9,1%)
Atteintes cliniques à l'inclusion	
Rénale	2 (18,2%)
Cutanée	1 (9,1%)
Neurologique	1 (9,1%)
Maladie auto-immune associée	
SAPL	4 (36,4%)
Gougerot-sjögren	1 (9,1%)
Rhumatisme psoriasique	1 (9,1%)
PTT	1 (9,1%)
Cryoglobulinémie	1 (9,1%)
Bilan immunologique à l'inclusion	
Anti-nucléaire	8 (72,7%)
Anti-ADNdb	5 (45,5%)
Anti-SSA	3 (27,3%)
Anti-SSB	1 (9,1%)
Anti-RNP	1 (9,1%)
Anti-Sm	0
Consommation du complément à l'inclusion	3 (27,3%)

Tableau 3. Caractéristiques clinico-biologiques des patients inclus.

SLEDAI : Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index ; MAI : maladie auto-immune ; ADNdb : ADN double brins ; SSA : Sjögren Syndrome A ; SSB : Sjögren Syndrome B ; Sm : Smith ; RNP : ribonucléoprotéine.

2. Application des panels aux patients lupiques : validation des marquages en situation pathologique et comparaison aux témoins sains

2.1. Répartition des différentes populations et sous-populations cellulaires

2.1.1. Répartition des sous-populations lymphocytaires T par rapport aux témoins sains

La fréquence des LT CD4⁺ était de 65,7 % [49,2 ; 66,5] chez les patients et de 63,0 % [55,0 ; 65,5] chez les témoins ($p = 0,90$). Celle des LT CD8⁺ était respectivement de 32,3 % [29,5 ; 46,0] et 31,4 % [28,8 ; 36,4] ($p = 0,45$). Aucune différence significative n'était retrouvée pour ces deux sous-populations. La proportion de LT DN était significativement plus faible chez les patients (3,4 % [1,9 ; 4,7]) par rapport aux témoins (5,0 % [4,5 ; 6,7], $p = 0,03$). Les LT DP étaient rares et comparables entre les groupes (0,6 % chez les patients versus 0,5 % chez les témoins, $p = 0,51$).

Les LTfh représentaient 8,6 % [7,4 ; 12,1] des LT CD4⁺ chez les patients et 10,5 % [8,0 ; 13,4] chez les témoins ($p = 0,54$). Les sous-types LTfh1, LTfh2 et LTfh17 étaient répartis sans différence significative entre les groupes (**Figure 6**).

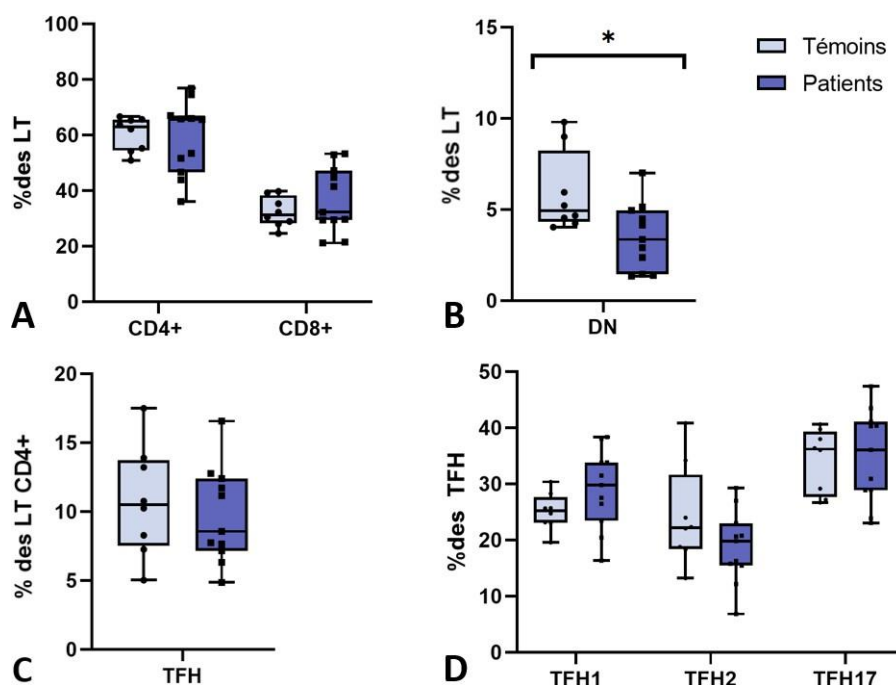


Figure 6. Analyse en cytométrie en flux des sous populations au sein des lymphocytes T (LT) et des LT folliculaires auxiliaires (LTfh) chez les témoins (gris clair) et chez les patients lupiques (gris foncé).

A. Fréquence des sous-populations LT CD4⁺ et CD8⁺ parmi les LT totaux. **B.** Fréquence des LT doubles négatifs parmi les LT totaux. **C.** Fréquence des LT folliculaires auxiliaires (LTfh) parmi les LT CD4⁺. **D.** Fréquence des sous-population de LTfh au sein des LTfh totaux. * = $p < 0,005$

2.1.2. Répartition des sous-populations monocytaires par rapport aux témoins sains

Les monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$) représentaient 91,6 % [84,5 ; 93,1] des monocytes chez les patients et 90,6 % [88,3 ; 91,6] chez les témoins ($p = 0,73$). Les monocytes intermédiaires ($CD14^{+}CD16^{+}$) étaient retrouvés à 3,9 % [2,4 ; 8,1] chez les patients contre 6,4 % [4,9 ; 6,6] chez les témoins ($p = 0,28$). Les monocytes non classiques ($CD14^{-}CD16^{++}$) représentaient 1,7 % [0,9 ; 3,8] chez les patients et 1,9 % [1,7 ; 2,7] chez les témoins ($p = 0,72$) (**Figure 7**). Ainsi, aucune différence de répartition des sous-populations monocytaires n'était retrouvée entre ces deux groupes.

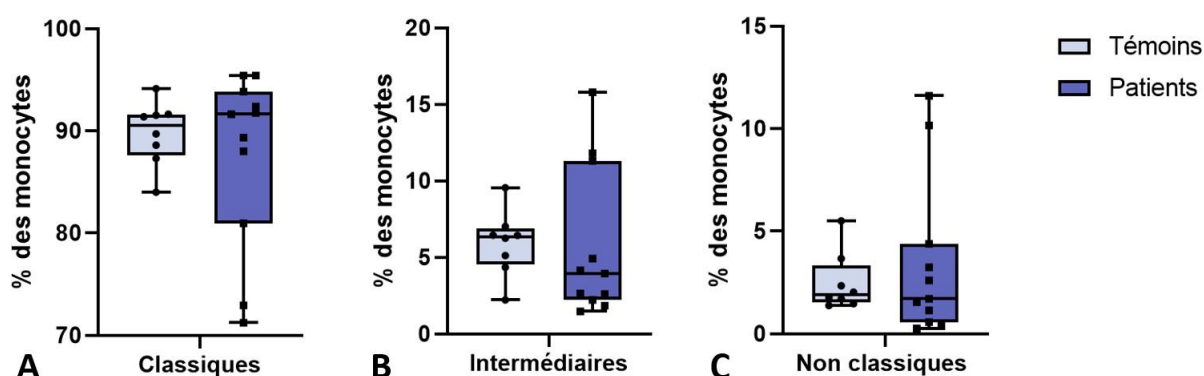


Figure 7. Répartition des sous-populations monocytaires chez les témoins (gris clair) et chez les patients lupiques (gris foncé).

A. Pourcentage de monocytes classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$). **B.** Pourcentage de monocytes intermédiaires ($CD14^{+}CD16^{+}$). **C.** Pourcentage de monocytes non classiques ($CD14^{-}CD16^{++}$).

2.2. Expression des $Fc\gamma R$: CD64, CD32 et CD16

2.2.1. Présence des $Fc\gamma R$ sur les sous-populations monocytaires

Le récepteur CD64 était exprimé par 96,8 % [95,5 ; 97,8] des monocytes classiques chez les patients contre 95,6 % [93,9 ; 97,3] chez les témoins ($p = 0,41$). Sa fréquence était plus faible chez les monocytes intermédiaires et non classiques, sans différence significative. Le CD32 était largement exprimé par toutes les sous-populations monocytaires, avec des fréquences supérieures à 96 % dans chaque sous-type, sans différence entre les groupes. Le CD16 était exprimé principalement par les monocytes intermédiaires et non classiques, sans variation significative de fréquence entre patients et témoins. Il était absent des monocytes classiques.

2.2.2. Analyse quantitative de l'expression des $Fc\gamma R$

Une tendance à l'élévation de l'IMF du CD64 était retrouvée sur les monocytes totaux des patients (586 800 [445 866 ; 630 583]) comparativement aux témoins (414 658 [373 908 ; 502 256], $p = 0,15$). Cette tendance devenait significative si l'on prenait en compte seulement les valeurs des patients en poussée (645 734 [643 705 ; 647 762], $p=0,04$). L'IMF de CD32 était légèrement plus faible chez les patients (330 777 [283 151 ; 367 657]) que chez les témoins (365 953 [328 839 ; 401 031], $p = 0,18$).

L'expression de CD16 était comparable entre les deux groupes ($p = 0,78$) (**Figure 8**). Les ratios CD64/CD16, CD64/CD32 et CD32/CD16 étaient également similaires entre patients et témoins.

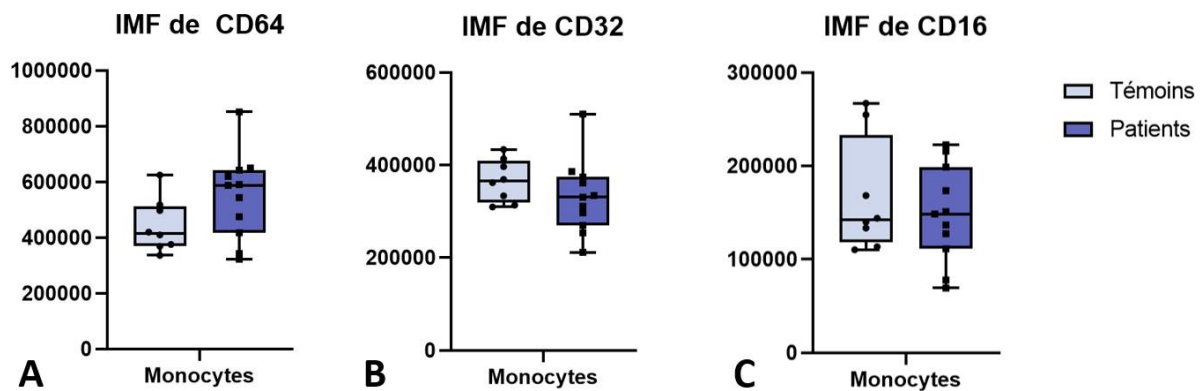


Figure 8. Intensité moyenne de fluorescence (IMF) des Fc gamma récepteurs à la surface des monocytes totaux chez les témoins (gris clair) et chez les patients lupiques (gris foncé).

A. IMF du CD64. B. IMF du CD32. C. IMF du CD16.

2.3. Activation lymphocytaire

2.3.1. CD69

L'analyse de CD69, montrait une diminution significative de la fréquence des LT CD69⁺ chez les patients lupiques (0,9 % [0,5 ; 1,6]) comparativement aux témoins (2,5 % [2,1 ; 3,3], $p = 0,01$). Cette différence n'était pas retrouvée dans les sous-populations LT CD4⁺ (0,3 % [0,25 ; 0,40] chez les témoins vs 0,2 % [0,1 ; 0,4], $p = 0,34$), LT CD8⁺ (2,1 % [1,8 ; 2,2] chez les témoins vs 1,9 % [0,9 ; 3,1], $p = 0,84$), LT DN (3,6 % [2,8 ; 6,9] chez les témoins vs 3,4 % [1,8 ; 7,2], $p = 0,72$) et LT DP (1,6 % [0,6 ; 3,5] chez les témoins vs 2,4 % [1,3 ; 2,8], $p = 0,67$).

2.3.2. CD25

L'expression de CD25, autre marqueur d'activation, était comparable dans les principales sous-populations. Les LT CD4⁺, CD8⁺ et DN présentaient des taux similaires entre patients et témoins. Une différence était, néanmoins, observée au sein des LT DP, dont la proportion de CD25⁺ était significativement réduite chez les patients (1,5 % [0,5 ; 3,6] vs 8,0 % [5,5 ; 14,9], ($p = 0,02$)).

2.3.3. PD1 et ICOS

Concernant PD1, aucune différence d'expression n'était retrouvée dans la population des LT totaux (22,6 % vs 22,5 %, $p = 0,9$) ni dans les sous-populations CD4⁺, CD8⁺, DN et DP.

Parmi les LTfh aucune différence significative n'était observée concernant l'expression conjointe de PD1 et ICOS, utilisée pour identifier les LTfh activés dans le lupus. Les LTfh PD1⁺ICOS⁺ représentaient

17,1 % [14,4 ; 24,7] chez les patients contre 16,8 % [10,8 ; 19,5] chez les témoins ($p = 0,44$). Cette absence de différence se retrouvait dans les trois sous-types LTfh1, LTfh2 et LTfh17.

2.4. Prolifération lymphocytaire (Ki67)

L'expression du marqueur Ki67, témoin de prolifération cellulaire, était globalement faible dans toutes les populations étudiées, sans différence significative entre patients et témoins. Chez les LT totaux, la fréquence des cellules Ki67⁺ était de 0,3 % [0,2 ; 0,6] chez les patients contre 0,28 % [0,1 ; 0,45] chez les témoins, ($p = 0,58$). Aucune variation n'était observée dans les sous-populations CD4⁺, CD8⁺, DN et DP ainsi que dans les LTfh et leurs sous-types.

2.5. Marqueurs de régulation lymphocytaire (CTLA-4, CD28) et de migration (CD62L)

2.5.1. CTLA-4

L'expression globale de CTLA-4, molécule régulatrice exprimée en situation d'activation prolongée ou de signal de co-inhibition, était similaire sur les LT totaux entre patients et témoins (1,0 % [0,9 ; 1,3] vs 1,5 % [1,1 ; 1,8], $p = 0,64$). Cependant, une baisse significative était observée dans la population des LT DP, dont la fréquence d'expression de CTLA-4⁺ était plus faible chez les patients (2,0 % [1,6 ; 5,6]) que chez les témoins (8,9 % [6,0 ; 11,4], $p = 0,02$).

Une diminution de son expression en IMF sur les LT totaux était retrouvée dans le groupe des patients (5 877 [5 407 ; 6 619]) par rapport au groupe des témoins (7 669 [6 828 ; 9 409]), ($p = 0,03$).

2.5.2. CD28 et CD62L

L'expression de CD28, molécule co-stimulatrice des LT, était comparable dans la majorité des sous-populations. Cependant, une baisse significative de l'IMF de CD28 était notée sur les LT CD8⁺ des patients (45 129 [42 173 ; 49 349]) par rapport aux témoins (54 846 [53 172 ; 56 361], $p = 0,01$), suggérant une modulation fonctionnelle plutôt qu'une perte de fréquence.

Enfin, CD62L, impliqué dans la migration lymphocytaire, ne montrait pas de différence d'expression dans les populations étudiées (**Figure 9**).

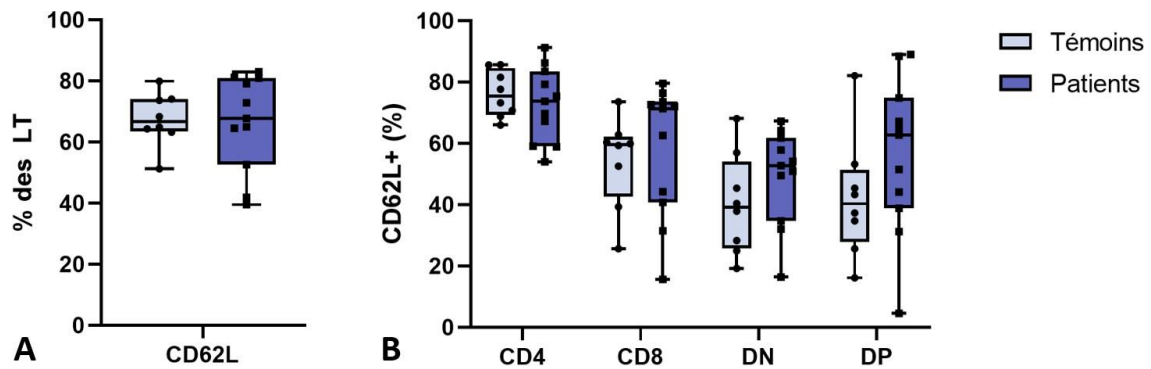


Figure 9. Expression de CD62L par les sous-populations lymphocytaires T chez les témoins (gris clair) et chez les patients lupiques (gris foncé).
A. Pourcentage des LT totaux exprimant CD62L. **B.** Pourcentage d'expression de CD62L par les sous-populations lymphocytaires T.

2.6. Marqueurs de régulation monocytaire (CD163 et CD1d)

L'expression globale du marqueur CD163, associé à un phénotype anti-inflammatoire, ne différait pas entre les deux groupes. Une différence significative était, cependant, retrouvée au sein des monocytes non classiques, dont la proportion de CD163⁺ était plus élevée chez les patients lupiques (49,0 % [32,4 ; 68,5]) comparativement aux témoins (14,3 % [10,1 ; 38,9], $p = 0,04$), suggérant une orientation modulatrice de cette sous-population.

L'expression de CD1d, molécule présentatrice de glycolipides aux cellules iNKT, était globalement comparable. Toutefois, l'IMF de CD1d sur les monocytes non classiques était significativement réduite chez les patients (8 431 [7 783 ; 8 926] vs 9 108 [8 929 ; 10 077] chez les témoins, $p = 0,04$), suggérant une altération de l'interface avec l'immunité innée non conventionnelle (**Figure 10**).

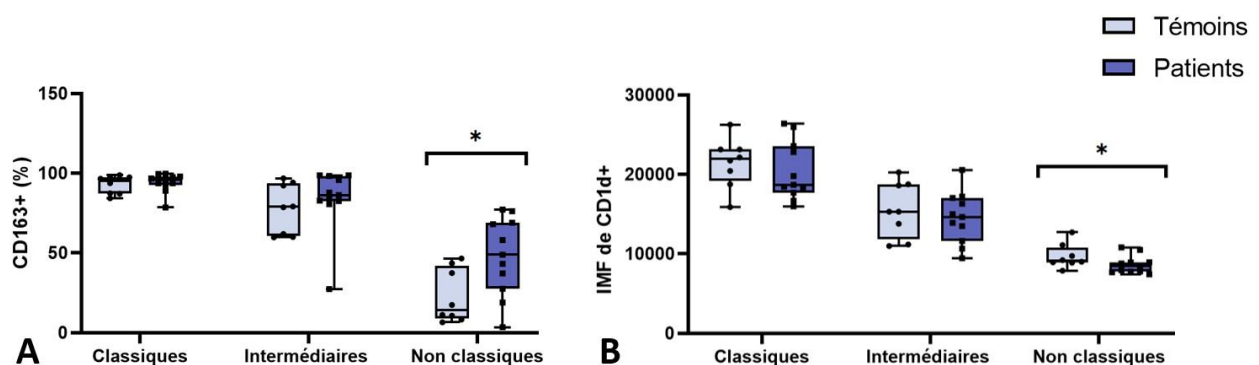


Figure 10. Expression du CD163 et du CD1d à la surface des sous populations monocytaires chez les témoins (gris clair) et chez les patients lupiques (gris foncé).
A. Pourcentage d'expression du CD163 à la surface des populations de monocytes classiques (CD14⁺⁺CD16⁻), intermédiaires (CD14⁺CD16⁺) et non classiques (CD14⁻CD16⁺⁺). **B.** Intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD1d à la surface des populations de monocytes classiques, intermédiaires et non classiques. * = $p < 0,005$

3. Évaluation des panels dans la discrimination des patients atteints de néphropathie lupique

3.1. Déséquilibre des sous-populations T en lien avec la néphropathie lupique

Chez les patients atteints de NL, la proportion de LT CD4⁺ était réduite par rapport aux patients sans atteinte rénale (51,7 % [46,7 ; 53,4] vs 66,5 % [65,9 ; 72,6], $p = 0,05$). Une élévation des LT CD8⁺ était également observée chez les patients avec NL (44,8 % [41,5 ; 47,3]) par rapport aux autres patients (29,5 % [23,5 ; 31,6], $p = 0,08$). Le ratio CD4/CD8 était plus faible chez les patients atteints de NL (1,2 [1,0 ; 1,3]) comparativement à ceux indemnes de NL (2,3 [2,1 ; 3,2], $p = 0,08$). Cette répartition s'accompagnait d'une augmentation des LT DN chez les patients avec NL (5,0 % [4,5 ; 5,2] vs 2,7 % [1,6 ; 3,3], $p = 0,05$) (**Figure 11**).

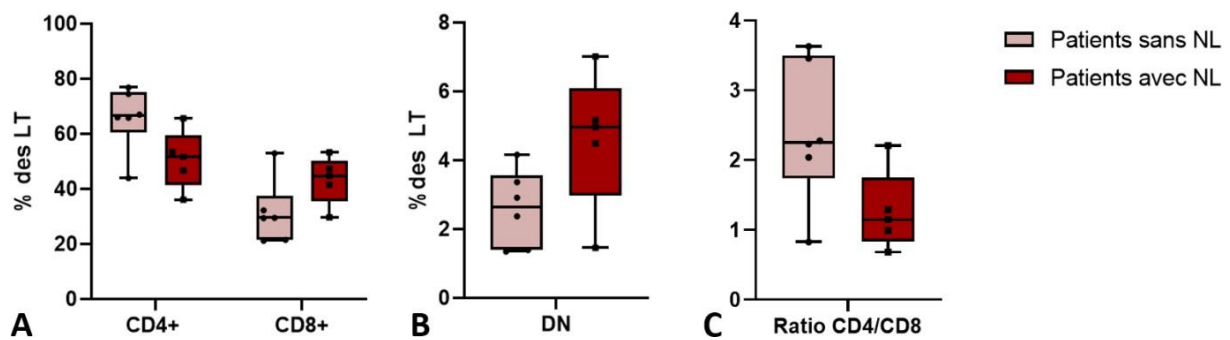


Figure 11. Analyse en cytométrie en flux des sous populations lymphocytaires T (LT) des patients selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) (rose foncé) ou son absence (rose clair).
A. Répartition des sous-populations CD4 et CD8 parmi les LT totaux B. Pourcentage de LT doubles négatifs (DN) parmi les LT totaux. C. Ratio CD4/CD8.

3.2. Activation monocytaire accrue chez les patients atteints de néphropathie lupique

L'expression du marqueur d'activation CD86 était significativement augmentée chez les patients atteints de NL, dans l'ensemble des sous-populations monocytaires, contrairement aux patients indemnes de NL : elle atteignait, sur les monocytes classiques, 98,5 % [94,3 ; 99,2] contre 85,0 % [79,0 ; 89,5] ($p = 0,03$), sur les monocytes intermédiaires, 99,4 % [99,2 ; 99,8] contre 96,5 % [94,3 ; 98,2] ($p = 0,017$), et sur les monocytes non classiques, 100 % [99,8 ; 100] contre 98,3 % [96,6 ; 99,1] ($p = 0,0087$) (**Figure 12**).

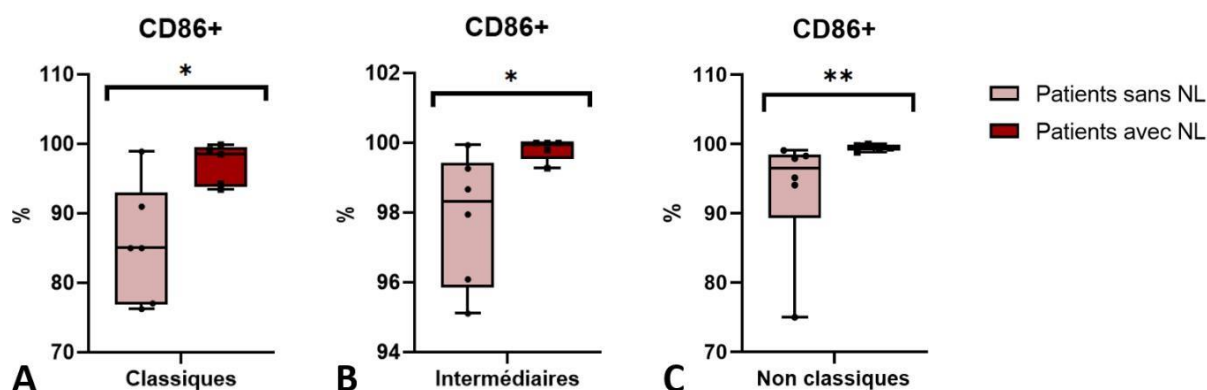


Figure 12. Expression du CD86, en pourcentage, sur les sous-populations monocytaires des patients selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) (rose foncé) ou son absence (rose clair).

A. Expression de CD86 par les monocytes classiques. B. Expression de CD86 par les monocytes intermédiaires. C. Expression de CD86 par les monocytes non classiques. *= $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

3.3. Altération des voies de régulation immunitaire T et récepteurs monocytaires

Il n'était pas retrouvé de différence significative sur l'expression de CTLA-4 et de CD28 selon la présence d'une NL au sein du groupe des patients.

Dans le compartiment monocytaire, l'IMF de CD32 était significativement diminuée chez les patients atteints de NL (269 745 [253 611 ; 296 558]) en comparaison aux patients sans atteinte rénale (367 657 [338 389 ; 383 373], $p = 0,02$) (**Figure 13**).

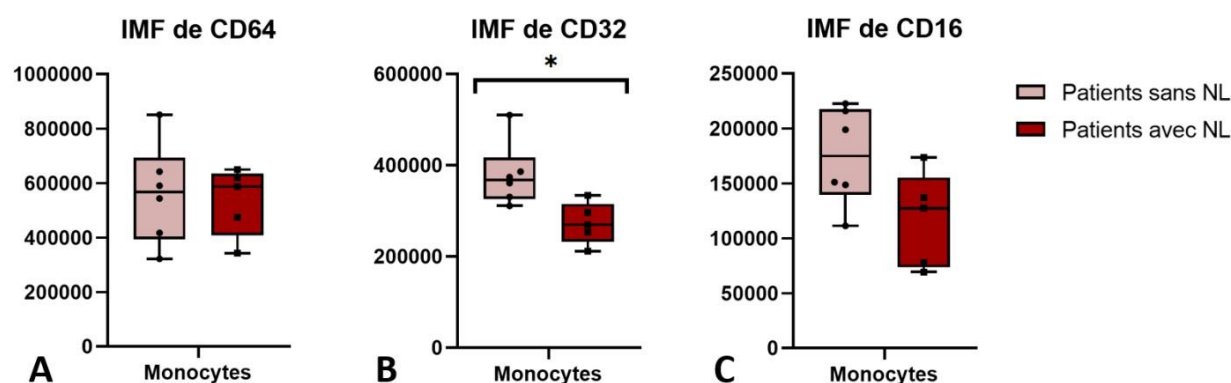


Figure 13. Intensité moyenne de fluorescence (IMF) des Fc gamma récepteurs sur les monocytes totaux des patients selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) (rose foncé) ou son absence (rose clair).

A. IMF du CD64. B. IMF du CD32. C. IMF du CD16. *= $p < 0,005$

Une diminution significative de l'IMF de CD1d était également observée sur les monocytes intermédiaires des patients atteints de NL (11 615 [10 658 ; 13 492]) par rapport aux patients sans NL (16 007 [14 733 ; 17 170]), ($p = 0,03$) (**Figure 14**).

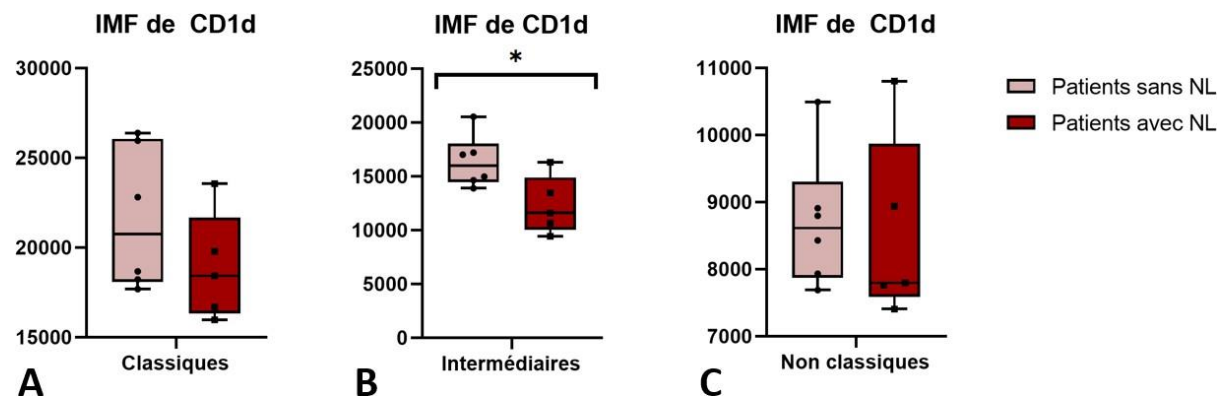


Figure 14. Intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD1d sur les sous-populations monocytaires des patients selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) (rose foncé) ou son absence (rose clair).
A. IMF du CD1d sur les monocytes classiques. **B.** IMF du CD1d sur les monocytes intermédiaires. **C.** IMF du CD1d sur les monocytes non classiques. *= $p < 0,005$

IV. Discussion

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt stratégique de l'utilisation de la CMF dans le suivi des patients lupiques. Cette approche permet une analyse dynamique du phénotype immunitaire des patients, notamment de l'activation cellulaire, au moment du prélèvement. Elle complète l'analyse des marqueurs sérologiques conventionnels comme les anticorps anti-ADNdb et le dosage du complément, renforçant la corrélation à la clinique en y apportant une évaluation fonctionnelle.

Le choix des panels a donc reposé sur des cibles connues pour avoir des modifications de répartition, d'activation et de régulation dans le LS, notamment en poussée. Ils ont été créés pour fonctionner sur un cytomètre hospitalier avec une contrainte de 3 lasers pour 10 canaux. Ce cadre technique a imposé un choix raisonné des marqueurs, à la fois représentatifs de sous-populations et de leur état d'activation ou de régulation. Les fluorochromes ont été sélectionnés pour limiter les interférences et permettre des compensations réalisables par les personnels hospitaliers, les rendant ainsi adaptables à un usage de routine. La construction de la stratégie de fenêtrage a suivi la même logique afin d'être utilisée et manipulée aisément.

Le format retenu limite toutefois l'intégration de certains paramètres fonctionnels en particulier les marqueurs intracellulaires (FoxP3, Bcl-6) ou les cytokines. Cette restriction méthodologique, partagée par d'autres approches hospitalières simplifiées et notamment recommandée par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), constitue une limite en termes de profondeur fonctionnelle mais permet de préserver une bonne reproductibilité inter-opérateurs (47). Ce positionnement contraste avec les protocoles développés dans des cadres expérimentaux, qui mobilisent des panels complexes composés de nombreux paramètres (48).

Les contraintes temporelles hospitalières, notamment la nécessité de marquage et d'acquisition avant 24 heures, ont été validées par des contrôles de la viabilité cellulaire. Les marquages ont été effectués sur sang total afin de limiter la variabilité pré-analytique (49), cette approche étant recommandée en clinique pour favoriser la reproductibilité des profils phénotypiques (50).

Aucune quantification absolue n'a été réalisée, en raison du choix de ne pas utiliser de billes de comptage. Cette absence restreint l'interprétation statistique cependant, le suivi des seules fréquences cellulaires reste pertinent dans des contextes physiopathologiques où les valeurs absolues de référence ne sont pas clairement définies. Cette approche privilégiant une lecture centrée sur l'utilité clinique avait pour but d'identifier des signatures immunologiques cohérentes avec l'activité du lupus, ou de certaines atteintes d'organes, à partir des données de la cohorte.

La cohorte utilisée pour valider les panels était composée de 11 patients dont le profil clinique était similaire à ceux rapportés dans la littérature. Elle comportait 82 % de femmes et les patients étaient

suivis depuis 10 ans en moyenne, en accord avec les données de la littérature retrouvant entre 86 et 93 % de femmes atteintes de lupus depuis une durée moyenne de 7 ans (2,51). Tous les patients de notre cohorte ont été inclus lors d'une consultation de suivi ce qui, associé à l'ancienneté de leur lupus, pouvait expliquer la forte proportion de formes cliniquement stables (82%). En effet, ce chiffre est proche des données de *Kasitanon et al.* rapportant jusqu'à 70 % de patients stables au bout de 1 an de suivi parmi 95 patients lupiques (51). Cependant, il faut prendre en compte que cette stabilité clinique est souvent temporaire car les patients lupiques suivent pour la plupart un schéma d'alternance entre rémissions et rechutes, notamment mis en évidence par l'étude de *Tselios et al.* qui retrouvaient, au sein d'une cohorte de 267 patients atteints de LS, 70 % des patients en schémas d'alternance rémission/rechute contre seulement 10 % en rémission prolongée (52).

Concernant les atteintes d'organes, 5 patients (46 %) de notre cohorte étaient atteints de NL, un chiffre proche de la prévalence rapportée par *Siegel et al.* (38 %) (3). Les atteintes cutanées et articulaires concernaient respectivement 64 % et 82 % des patients, comparables également aux fréquences observées dans la même étude. L'ensemble des patients recevait un traitement conforme aux recommandations actuelles, basé sur l'HCQ de manière systématique (en l'absence de contre-indications), plus ou moins associée à des immunosuppresseurs en fonction des atteintes (11,53).

La cohorte présentait donc un profil comparable avec celui décrit dans les séries de la littérature, constituant un support approprié pour tester la complémentarité des 3 panels et leur cohérence.

L'analyse de la répartition des sous populations lymphocytaires T ne révélait pas de différence notable entre patients et témoins à l'exception d'une diminution des LT DN chez les patients. Ce groupe est majoritairement constitué de LT $\gamma\delta$, dont l'implication dans les réponses inflammatoires et la production de cytokines comme l'IL-17 est bien décrite dans le lupus actif (54). Dans ce contexte, leur diminution pourrait refléter un état peu inflammatoire, cohérent avec l'activité clinique stable des patients. Cette interprétation est appuyée par les travaux de *Crispin et al.* et d'*Alexander et al.*, qui rapportaient une augmentation de la population des LT DN chez les patients en poussée, notamment en cas de NL (54,55). Cependant, cette population n'est pas complètement homogène : elle peut inclure non seulement des cellules avec un TCR $\gamma\delta$, mais aussi des LT classiques (possédant un TCR $\alpha\beta$) anergiques, activés de façon chronique, ainsi que des cellules T non conventionnelles (56). L'absence de marquage spécifique du TCR ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$) dans notre panel ne permet pas de discriminer précisément l'origine de la baisse observée, ce qui limite l'interprétation fonctionnelle.

En parallèle, l'analyse des LTfh et des monocytes ne montrait pas de différence significative entre les 2 groupes en termes de fréquence. Ces données sont en accord avec celles de *Le Coz et al.* qui retrouvaient une modification significative de la répartition des sous populations de LTfh (hausse des LTfh2 et baisse parallèle des LTfh1) uniquement lors des poussées (38). Sur le versant monocyttaire, *Y. Li et al.* ne retrouvaient pas non plus de modifications dans la répartition des sous populations chez les patients

stables (57). La fréquence de répartition cellulaire des principales populations et sous populations explorées dans nos panels était donc en accord avec le statut clinique des patients au moment de l'inclusion.

L'étude des marqueurs d'activation précoce et de régulation confirmait l'absence de signal inflammatoire actif au sein des LT. Une diminution significative de CD69 sur les LT totaux était observée, sans modification notable au sein des sous-populations, ce qui suggère un contrôle satisfaisant de la maladie. Ces résultats sont en accord avec ceux de *Crispin et al.* et de *Zeidi et al.*, qui rapportaient une surexpression de CD69 dans les formes actives, absente en contexte de rémission (58,59).

Dans le même sens, la diminution significative de CD25, observée de façon sélective sur les LT DP, reste difficile à interpréter en raison des limites techniques liées à cette population, mais ce résultat va également dans le sens d'une absence d'activation lymphocytaire (60). L'expression basale de CTLA-4 apparaissait, elle aussi, diminuée sur les LT totaux. Ce marqueur, faiblement exprimé en contexte non inflammatoire et normalement induit lors de l'activation T pour assurer un rétrocontrôle (61), est déjà rapporté comme diminué chez les patients lupiques indépendamment de l'activité (62,63). Sa baisse relative pourrait refléter à la fois un défaut de rétrocontrôle et/ou une stabilité immunologique. Enfin, la diminution de CD28 sur les LT CD8⁺, classiquement associée à une activation chronique ou à une différenciation terminale dans le LS, pourrait dans notre cohorte témoigner d'un état d'activation désormais contrôlé par le traitement (64,65). En parallèle, l'expression de CD62L, impliquée dans la migration des LT naïfs vers les organes lymphoïdes secondaires et connue pour diminuer après activation, restait comparable entre patients et témoins (66). Sa stabilité renforce l'idée d'un équilibre préservé entre cellules naïves et activées. Pris ensemble, ces résultats montrent que les marqueurs fonctionnels (CD69, CD25, CTLA-4, CD28, CD62L) apportent une information convergente avec celle de la répartition des sous populations lymphocytaires T. Ce profil non inflammatoire, observé de façon homogène sur les différents sous-types lymphocytaires, témoigne du bon contrôle de la maladie sous traitement. Il souligne également les limites potentielles du compartiment lymphoïde pour détecter des variations discrètes ou infra-cliniques de la pathologie, et justifie l'intérêt d'intégrer un panel myéloïde pour compléter l'analyse.

En contraste avec le compartiment lymphoïde, resté globalement quiescent dans notre cohorte, les monocytes montraient une légère tendance, non significative, à l'élévation de l'IMF du CD64 chez les patients, sans différence de fréquence ni d'expression d'autres marqueurs comme le CD86. Cependant, en prenant en compte l'état d'activité ou de stabilité des patients de la cohorte, cette hausse de CD64 IMF est retrouvée, de façon significative, spécifiquement chez les patients avec maladie active par rapport aux patients stables et aux témoins. Dans la littérature, *Li et al.*, et plus récemment *Jiang et al.*, rapportaient une hausse significative de CD64 chez les patients lupiques, corrélée avec le score d'activité SLEDAI, suggérant un rôle de ce marqueur comme reflet d'une activation myéloïde inflammatoire, ce qui conforte les résultats retrouvés ici chez des patients en poussée (57,67).

Cette hypothèse est renforcée par l'analyse du CD32, dont l'expression était stable en fréquence mais associée à une légère diminution de son IMF chez les patients. Une baisse de CD32 peut témoigner d'un déficit de gestion des complexes immuns, comme rapporté par *Hepburn et al.* chez les patients atteints de lupus (68). Toutefois, l'interprétation de ce résultat reste limitée par le fait que notre panel ne distingue pas les isoformes CD32a et CD32b, dont les fonctions sont opposées : CD32a participe à la phagocytose et à la production de cytokines pro-inflammatoires, tandis que CD32b est un régulateur négatif, freinant l'activation immune (69). Par ailleurs, des polymorphismes de CD32b, à l'origine d'une baisse d'expression ou d'une altération fonctionnelle, sont décrits dans la littérature chez certains patients lupiques où ils peuvent ainsi favoriser une activation monocytaire prolongée (70). L'absence de modification nette de l'expression totale de CD32 pourrait donc masquer des déséquilibres isoformes-spécifiques, présents de manière infra-clinique chez les patients stables. Ces observations soulignent l'intérêt d'intégrer, dans les panels à visée fonctionnelle, des anticorps capables de discriminer les isoformes CD32a et CD32b afin de mieux caractériser l'état de régulation myéloïde.

Ces éléments renforcent l'idée que les monocytes pourraient être plus sensibles dans l'analyse du profil phénotypique des patients LS et que l'intégration de marqueurs comme CD64 pourrait améliorer la détection d'une inflammation infra-clinique évolutive.

En raison du faible nombre de patients en poussée, il n'a pas été possible d'évaluer de manière robuste la capacité des panels à refléter l'activité clinique. En revanche, l'absence d'activation cellulaire artificielle due aux manipulations permet de souligner leur intérêt pour caractériser un état immunologique stable chez des patients sous traitement.

Compte tenu de l'hétérogénéité pronostique du lupus, nous avons exploré l'intérêt d'une stratification par type d'atteinte. Cette approche visait à déterminer si certains marqueurs pouvaient se révéler utiles, en suivi ou en diagnostic, dans des sous-groupes de patients. Le groupe le plus représenté étant celui des patients avec atteinte rénale, l'analyse s'est finalement centrée sur ce profil.

Chez les patients présentant une néphrite lupique, le profil lymphocytaire observé témoigne d'un rééquilibrage du compartiment T vers une réponse cytotoxique, accompagné de signes d'expansion de sous-populations T potentiellement impliquées dans la pathogénie rénale. La diminution des LT CD4⁺, parallèlement à une augmentation des CD8⁺, se traduit par une réduction significative du ratio CD4/CD8. Ce déséquilibre peut refléter une activation préférentielle des cellules T cytotoxiques ou une déplétion relative du compartiment helper, possiblement liée à un recrutement cellulaire vers les tissus rénaux ou à une régulation périphérique modifiée (par exemple via un axe IL-2/CD25 altéré). Ce basculement en faveur des CD8⁺ est cohérent avec les travaux ayant mis en évidence leur infiltration dans les lésions glomérulaires actives de néphrite lupique, mais pourrait également traduire une empreinte persistante chez des patients en rémission (71).

En parallèle, l'élévation des LT DN renforce l'hypothèse d'un mécanisme propre au LS où leur expansion chez des patients atteints de NL, même en contexte de stabilité clinique, suggère la persistance d'un déséquilibre du compartiment T favorisant potentiellement les rechutes ou l'entretien d'une inflammation infra-clinique. Étant donné que l'analyse en sous-groupe mélange des patients en poussée et des patients stables, ces variations doivent être interprétées avec prudence. Ce profil mixte pourrait constituer une signature lymphocytaire associée à la néphrite lupique, mais nécessiterait une validation sur une cohorte plus importante et stratifiée selon l'activité clinique pour distinguer les modifications phénotypiques liées à l'atteinte rénale spécifique de celles liées au contexte inflammatoire ou aux traitements.

Sur le versant monocytaire, le profil des patients atteints de néphrite lupique met en évidence des modifications cohérentes avec une activation inflammatoire du compartiment myéloïde, bien que partiellement divergentes des observations faites dans la cohorte globale. En effet, la diminution de l'expression de CD32 chez les patients atteints de NL renforce les tendances déjà suggérées dans la cohorte totale. Cependant, comme décrit précédemment, l'absence de distinction entre CD32a et CD32b limite encore l'interprétation de ce résultat.

À l'inverse, la tendance à l'augmentation de CD64, observée dans la cohorte globale et plus spécifiquement chez les patients en poussée, n'était pas retrouvée significative ici. Ce résultat est à interpréter avec prudence car la littérature, et notamment les travaux de *Li et al.*, décrivent une surexpression de CD64 en lien avec l'inflammation, à la fois chez les patients lupiques en poussée et chez ceux atteints de NL (57). L'hétérogénéité du sous-groupe NL, intégrant des patients stables et les 2 patients en poussées, pourrait ainsi expliquer cette absence de différence.

En revanche, la surexpression significative de CD86, sur l'ensemble des sous-types monocytaires, chez les patients atteints de NL suggère une activation des cellules myéloïdes persistante (72,73). CD86 étant nécessaire à la costimulation, son augmentation peut traduire une capacité accrue à activer des LT en périphérie, renforçant le lien entre compartiments myéloïde et lymphocytaire dans la physiopathologie de la NL.

Enfin, le récepteur CD1d, impliqué dans la présentation de glycolipides aux cellules iNKT, est retrouvé abaissé spécifiquement sur les monocytes non classiques dans le sous-groupe NL. La diminution de CD1d, conjointe à une hausse de CD86, en contexte de lupus est déjà décrite dans la population lymphocytaire B dans la littérature (74). La baisse de CD1d peut témoigner ici d'une perte de régulation via l'axe iNKT/CD1d, en parallèle d'une majoration de l'activation monocytaire via CD86. Cette combinaison CD1d^{low}/CD86^{high} pourrait donc constituer une signature compatible avec une inflammation chronique infra-clinique, même chez des patients en apparente rémission.

Il est également notable que ces variations phénotypiques persistent malgré le fait que ce sous-groupe ait les traitements immunosuppresseurs les plus lourds. L'ensemble de ces observations, bien que

limitées par la taille de la cohorte et par son hétérogénéité clinique, permet de valider la robustesse suffisante de certains marqueurs afin de les utiliser dans une approche ciblée à l'atteinte rénale. À l'inverse, d'autres marqueurs se sont révélés peu informatifs dans ce contexte précis mais leur intérêt pourra être vérifié dans d'autres situations cliniques.

Plusieurs limites ont été mises en évidence dans ce travail, justifiant une adaptation du protocole. Premièrement, le marqueur Ki67 n'a pas montré de modulation significative dans cette cohorte. Cette absence de variation nécessite une interprétation prudente en l'absence de prélèvement traités par mitogène. En effet, ces résultats peuvent refléter un problème technique autant qu'une absence de prolifération. Le Ki67 pourrait être remplacé par un autre marqueur intracellulaire comme FoxP3 qui permettrait d'identifier les LT régulateurs et apprécier la balance entre T activés et T régulateurs. Il pourrait également être retiré du panel afin d'enlever l'étape de marquage intracellulaire et simplifier le protocole pour la routine hospitalière.

De même, le marqueur de viabilité, ayant montré que les conditions pré-analytiques induisent une mort cellulaire négligeable, pourrait être retiré et remplacé par un CD45. Ce remplacement permettrait une meilleure discrimination des populations cellulaires, en réduisant l'impact des débris cellulaires et des éléments non spécifiques que le marqueur de viabilité ne permet pas d'éliminer efficacement. Cette optimisation serait particulièrement utile pour l'analyse de populations rares, comme les LTfh, dont l'identification nécessite un passage important de cellules, augmentant mécaniquement le bruit de fond et les risques de perte de résolution.

Finalement, le marqueur CD163 n'a pas été contributif sur cette cohorte majoritairement constituée de patients stables. Il est décrit comme un marqueur d'activation aigue, en particulier en contexte de NL. Plusieurs travaux appuient ce caractère contextuel, comme ceux d'*Allam et al.*, qui ont montré son expression au sein des infiltrats macrophagiques des biopsies rénales de patients lupiques, tandis que les équipes de *Renaudineau et al.* rapportaient une élévation du CD163 urinaire libre (uCD163s) corrélée à la NL (75,76). L'absence de variation dans notre étude, même chez les patients présentant une atteinte rénale, suggère que la forme membranaire du CD163 à la surface des monocytes circulants est peu discriminante hors des phases d'activité.

Au vu des résultats obtenus dans cette cohorte essentiellement composée de patients stables, l'utilisation de trois panels distincts ne semble pas justifiée. Un regroupement des marqueurs les plus pertinents dans un panel unique permettrait à la fois de simplifier la pratique et de conserver une bonne sensibilité clinique.

Du côté lymphocytaire, CD69 et CD25 ont montré un intérêt comparable en contexte stable. Néanmoins, l'interprétation de CD25 nécessite d'ajouter FoxP3 pour prendre en compte la population T régulatrice, ce qui en limite l'utilisation isolée. Le panel LTfh, pour sa part, n'a pas apporté d'éléments discriminants dans cette situation. Du côté myéloïde, CD64, CD32 et CD16 se sont révélés les plus informatifs, y

compris lors de l'analyse en sous-groupes. Cela suggère que le compartiment monocytaire reste plus sensible que le compartiment lymphocytaire pour détecter des variations, même discrètes, et ce même sous traitement.

Certains marqueurs gardent néanmoins une pertinence dans des contextes spécifiques. Le CD163, par exemple, n'a pas montré d'intérêt en situation stable mais pourrait s'avérer utile lors des poussées rénales, en complément de l'étude plus fine des isoformes CD32a et CD32b. De même, les marqueurs de régulation et de migration lymphocytaire (CTLA-4, PD-1, CD62L), peu contributifs ici, pourraient devenir pertinents dans l'évaluation des poussées ou d'atteintes sévères comme le neurolypus (77).

En pratique, un panel regroupant CD45, CD3, CD4, CD8, CD14, CD69, CD86, CD64 et CD16 constituerait une base réaliste pour un suivi hospitalier, pouvant même être réduit à un panel monocytaire simple CD45, CD14, CD64, CD16 et CD86 dans l'optique de la simplification des stratégies de fenêtrage et de la reproductibilité interpersonnelle.

V. Conclusion

En conclusion, ce travail montre qu'un protocole de CMF simplifié peut s'intégrer à l'exploration immunologique du LS en routine hospitalière. Bien que limité en nombre de paramètres, il a permis de détecter des variations immunophénotypiques cohérentes avec certains profils cliniques, notamment chez les patients atteints de NL, tout en restant stable chez les patients en rémission. Cela atteste de sa robustesse technique et de l'absence d'activation non spécifique liée aux manipulations.

La principale force de la CMF réside dans sa plasticité. Les panels peuvent être réorganisés et adaptés en fonction des contextes cliniques (poussée, atteinte spécifique...). Cette logique peut s'étendre également à l'adaptation de l'analyse à d'autres liquides biologiques comme l'urine en cas de NL, déjà étudiée pour le dosage de l'uCD163s, ou le liquide céphalo rachidien pour le neurolupus. De plus, les résultats présentés ici n'intègrent pas les paramètres sérologiques habituels (anticorps anti-ADN, complément), ce qui pourrait renforcer encore la valeur de la CMF dans le suivi des patients.

Cependant, le faible nombre de patients inclus en poussée dans cette étude ne permet pas encore de valider de manière robuste la capacité des panels à refléter l'activité clinique. Un élargissement de la cohorte, associé à un suivi longitudinal, serait nécessaire pour évaluer leur sensibilité au cours du temps et leur potentiel pour le monitoring dynamique du LS.

VI. Bibliographie

1. Mathian A, Dorgham K, Gorochoff G, Amoura Z. Mécanismes physiopathologiques du lupus systémique. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. janv 2022;206(1):7-16.
2. Arnaud L, Fabry-Vendrand C, Todea R, Vidal B, Cottin J, Bureau I, et al. Prévalence et incidence du lupus érythémateux systémique en France entière : étude dans le Système national des données de santé (LUPIN-F). *Revue du Rhumatisme*. 1 déc 2023;90:A203.
3. Siegel CH, Sammaritano LR. Systemic Lupus Erythematosus: A Review. *JAMA*. 7 mai 2024;331(17):1480.
4. Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. mars 2010;9(5):A277-287.
5. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. oct 1998;41(10):1714-24.
6. Muñoz LE, Janko C, Grossmayer GE, Frey B, Voll RE, Kern P, et al. Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. juin 2009;60(6):1733-42.
7. Su X, Yu H, Lei Q, Chen X, Tong Y, Zhang Z, et al. Systemic lupus erythematosus: pathogenesis and targeted therapy. *Mol Biomed*. 30 oct 2024;5(1):54.
8. Chen PM, Tsokos GC. The role of CD8+ T-cell systemic lupus erythematosus pathogenesis: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 1 nov 2021;33(6):586-91.
9. Chen PM, Tsokos GC. T Cell Abnormalities in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus: an Update. *Curr Rheumatol Rep*. févr 2021;23(2):12.
10. Zhao L, Tang S, Chen F, Ren X, Han X, Zhou X. Regulation of macrophage polarization by targeted metabolic reprogramming for the treatment of lupus nephritis. *Mol Med*. 25 juin 2024;30(1):96.
11. Fanouriakis A, Kostopoulou M, Andersen J, Aringer M, Arnaud L, Bae SC, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus: 2023 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*. janv 2024;83(1):15-29.
12. Amoura Z, Bader-Meunier B, Antignac M, Bardin N, Belot A, Bonnotte B, et al. Protocole national de diagnostic et de soin, Lupus systémique de l'adulte et de l'enfant. 2024;
13. Meier AL, Bodmer NS, Wirth C, Bachmann LM, Ribi C, Pröbstel AK, et al. Neuro-psychiatric manifestations in patients with systemic lupus erythematosus: A systematic review and results from the Swiss lupus cohort study. *Lupus*. sept 2021;30(10):1565-76.
14. Miner JJ, Kim AHJ. Cardiac Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. févr 2014;40(1):51-60.
15. Larosa M, Le Guern V, Guettrot Imbert G, Lazaro E, Morel N, Abisror N, et al. Impact de l'activité du lupus et des séquelles présentes au premier trimestre sur l'évolution des grossesses lupiques : résultats de l'étude prospective du GR2. *La Revue de Médecine Interne*. juin 2021;42:A29.
16. Rodziewicz M, Dyball S, Lunt M, McDonald S, Sutton E, Parker B, et al. Early infection risk in patients with systemic lupus erythematosus treated with rituximab or belimumab from the British Isles Lupus Assessment Group Biologics Register (BILAG-BR): a prospective longitudinal study. *Lancet Rheumatol*. mai 2023;5(5):e284-92.

17. Moreno-Torres V, Martínez-Urbistondo M, Gutiérrez-Rojas A, Castejón R, Sánchez E, Calderón-Parra J, et al. Impact of severe infections in SLE: an observational study from the Spanish national registry. *Lupus Sci Med*. oct 2022;9(1):e000711.
18. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol*. sept 2019;71(9):1400-12.
19. Bonroy C, Vercammen M, Fierz W, Andrade LEC, Van Hoovels L, Infantino M, et al. Detection of antinuclear antibodies: recommendations from EFLM, EASI and ICAP. *Clin Chem Lab Med*. 27 juin 2023;61(7):1167-98.
20. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 16 oct 2003;349(16):1526-33.
21. Flechsig A, Rose T, Barkhudarova F, Strauss R, Klotsche J, Dähnrich C, et al. What is the clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus? A comparison with anti-dsDNA antibodies and C3. *Clin Exp Rheumatol*. 2017;35(4):598-606.
22. Kavanaugh AF, Solomon DH, American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum*. 15 oct 2002;47(5):546-55.
23. Ayano M, Horiuchi T. Complement as a Biomarker for Systemic Lupus Erythematosus. *Biomolecules*. 15 févr 2023;13(2):367.
24. Ho A, Barr SG, Magder LS, Petri M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. oct 2001;44(10):2350-7.
25. Radanova M, Vasilev V, Mihaylova G, Kosturkova M, Kishore U, Roumenina L. Autoantibodies against Complement Classical Pathway Components C1q, C1r, C1s and C1-Inh in Patients with Lupus Nephritis. *Int J Mol Sci*. 17 août 2022;23(16):9281.
26. Mikdashi J, Nived O. Measuring disease activity in adults with systemic lupus erythematosus: the challenges of administrative burden and responsiveness to patient concerns in clinical research. *Arthritis Res Ther*. 20 juill 2015;17(1):183.
27. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*. juin 1992;35(6):630-40.
28. Chessa E, Piga M, Floris A, Devilliers H, Cauli A, Arnaud L. Use of Physician Global Assessment in systemic lupus erythematosus: a systematic review of its psychometric properties. *Rheumatology (Oxford)*. 1 déc 2020;59(12):3622-32.
29. Raynor JL, Chi H. Nutrients: Signal 4 in T cell immunity. *J Exp Med*. 4 mars 2024;221(3):e20221839.
30. Moulton VR, Tsokos GC. T cell signaling abnormalities contribute to aberrant immune cell function and autoimmunity. *J Clin Invest*. 1 juin 2015;125(6):2220-7.
31. Ciurtin C, Pineda-Torra I, Jury EC, Robinson GA. CD8⁺ T-Cells in Juvenile-Onset SLE: From Pathogenesis to Comorbidities. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:904435.
32. Liu T, Yang Y long, Zhou Y, Jiang Y mei. Noninvasive biomarkers for lupus nephritis. *Laboratory Medicine*. 4 sept 2024;55(5):535-42.
33. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol*. janv 2023;23(1):38-54.

34. Long D, Chen Y, Wu H, Zhao M, Lu Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J Autoimmun.* mai 2019;99:1-14.
35. Suárez-Fueyo A, Bradley SJ, Tsokos GC. T cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Current Opinion in Immunology.* déc 2016;43:32-8.
36. Qi J, Liu C, Bai Z, Li X, Yao G. T follicular helper cells and T follicular regulatory cells in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 28 avr 2023;14:1178792.
37. Gensous N, Charrier M, Duluc D, Contin-Bordes C, Truchetet ME, Lazaro E, et al. T Follicular Helper Cells in Autoimmune Disorders. *Front Immunol.* 17 juill 2018;9:1637.
38. Le Coz C, Joublin A, Pasquali JL, Korganow AS, Dumortier H, Monneaux F. Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. Bayry J, éditeur. *PLoS ONE.* 19 sept 2013;8(9):e75319.
39. Jin X, Chen J, Wu J, Lu Y, Li B, Fu W, et al. Aberrant expansion of follicular helper T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Front Immunol.* 2022;13:928359.
40. Cormican S, Griffin MD. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol.* 2020;11:1070.
41. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R, Novysedlak R, Cecrdlova E, Foley LK, et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? *Clin Sci (Lond).* 14 août 2023;137(15):1067-93.
42. Liu M -F., Li J -S., Weng T -H., Lei H -Y. Differential Expression and Modulation of Costimulatory Molecules CD80 and CD86 on Monocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Scand J Immunol.* janv 1999;49(1):82-7.
43. Cho YN, Kee SJ, Lee SJ, Seo SR, Kim TJ, Lee SS, et al. Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity. *Rheumatology (Oxford).* juin 2011;50(6):1054-63.
44. Evans L, Barral P. CD1 molecules: Beyond antigen presentation. *Mol Immunol.* juin 2024;170:1-8.
45. Ahamada MM, Jia Y, Wu X. Macrophage Polarization and Plasticity in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2021;12:734008.
46. Inthavong H, Vanarsa K, Castillo J, Hicks MJ, Mohan C, Wenderfer SE. Urinary CD163 is a marker of active kidney disease in childhood-onset lupus nephritis. *Rheumatology.* 1 mars 2023;62(3):1335-42.
47. Lagoo AS. How to Design and Validate a Clinical Flow Cytometry Assay. *Clin Lab Med.* sept 2023;43(3):333-49.
48. Pitoiset F, Cassard L, El Soufi K, Boselli L, Grivel J, Roux A, et al. Deep phenotyping of immune cell populations by optimized and standardized flow cytometry analyses. *Cytometry A.* août 2018;93(8):793-802.
49. Jimenez Vera E, Chew YV, Nicholson L, Burns H, Anderson P, Chen HT, et al. Standardisation of flow cytometry for whole blood immunophenotyping of islet transplant and transplant clinical trial recipients. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217163.
50. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol.* 17 févr 2012;12(3):191-200.
51. Kasitanon N, Intaniwet T, Wangkaew S, Pantana S, Sukitawut W, Louthrenoo W. The clinically quiescent phase in early-diagnosed SLE patients: inception cohort study. *Rheumatology (Oxford).* mai 2015;54(5):868-75.
52. Tselios K, Gladman DD, Touma Z, Su J, Anderson N, Urowitz MB. Disease course patterns in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* janv 2019;28(1):114-22.

53. American College of Rheumatology. 2025 American College of Rheumatology (ACR) Guideline for the Treatment of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Guideline Summary [Internet]. 2025 [cité 8 août 2025]. Disponible sur: <https://rheumatology.org/lupus-guideline#2025-sle-guideline>
54. Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*. 15 déc 2008;181(12):8761-6.
55. Alexander JJ, Jacob A, Chang A, Quigg RJ, Jarvis JN. Double negative T cells, a potential biomarker for systemic lupus erythematosus. *Precis Clin Med*. mars 2020;3(1):34-43.
56. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, Han Y, Yang Y, Pan H, et al. CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:816005.
57. Li Y, Lee PY, Sobel ES, Narain S, Satoh M, Segal MS, et al. Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):R6.
58. Crispin JC, Martínez A, de Pablo P, Velasquillo C, Alcocer-Varela J. Participation of the CD69 antigen in the T-cell activation process of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*. août 1998;48(2):196-200.
59. Zeidi M, Chen KL, Patel J, Desai K, Kim HJ, Chakka S, et al. Increased CD69+CCR7+ circulating activated T cells and STAT3 expression in cutaneous lupus erythematosus patients recalcitrant to antimalarials. *Lupus*. avr 2022;31(4):472-81.
60. Waysbort N, Russ D, Chain BM, Friedman N. Coupled IL-2-dependent extracellular feedbacks govern two distinct consecutive phases of CD4 T cell activation. *J Immunol*. 15 déc 2013;191(12):5822-30.
61. Chikuma S. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2017;410:99-126.
62. Cheong R, Wasser M, Nay Yaung K, Law Hui Nee A, Khoo NKH, Kumar P, et al. AB1116 Age-associated increase in cytotoxic t lymphocyte-associated protein 4 (ctla-4) expression on effector t cells and its role in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1 juin 2024;83(Suppl 1):1889.
63. Zhao L, Zhou X, Zhou X, Wang H, Gu L, Ke Y, et al. Low expressions of PD-L1 and CTLA-4 by induced CD4+CD25+ Foxp3+ Tregs in patients with SLE and their correlation with the disease activity. *Cytokine*. sept 2020;133:155119.
64. Minning S, Xiaofan Y, Anqi X, Bingjie G, Dinglei S, Mingshun Z, et al. Imbalance between CD8+CD28+ and CD8+CD28- T-cell subsets and its clinical significance in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. sept 2019;28(10):1214-23.
65. Żabińska M, Krajewska M, Kościelska-Kasprzak K, Klinger M. CD3(+)CD8(+)CD28(-) T Lymphocytes in Patients with Lupus Nephritis. *J Immunol Res*. 2016;2016:1058165.
66. Schlub TE, Badovinac VP, Sabel JT, Harty JT, Davenport MP. Predicting CD62L expression during the CD8+ T-cell response in vivo. *Immunol Cell Biol*. févr 2010;88(2):157-64.
67. Jiang L, Han X, Qiu W, Yu T, Feng R, Wang X, et al. Amelioration of Lupus Serum-Induced Skin Inflammation in CD64-Deficient Mice. *Front Immunol*. 2022;13:824008.
68. Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. mai 2004;43(5):547-54.
69. Anania JC, Chenoweth AM, Wines BD, Hogarth PM. The Human FcγRII (CD32) Family of Leukocyte FcR in Health and Disease. *Front Immunol*. 2019;10:464.

70. Su K, Wu J, Edberg JC, Li X, Ferguson P, Cooper GS, et al. A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcγRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1 juin 2004;172(11):7186-91.
71. Couzi L, Merville P, Deminière C, Moreau JF, Combe C, Pellegrin JL, et al. Predominance of CD8+ T lymphocytes among periglomerular infiltrating cells and link to the prognosis of class III and class IV lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* juill 2007;56(7):2362-70.
72. Nguyen CTH, Kambe N, Yamazaki F, Ueda-Hayakawa I, Kishimoto I, Okamoto H. Up-regulated expression of CD86 on circulating intermediate monocytes correlated with disease severity in psoriasis. *J Dermatol Sci.* mai 2018;90(2):135-43.
73. Decker P, Kötter I, Klein R, Berner B, Rammensee HG. Monocyte-derived dendritic cells over-express CD86 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* sept 2006;45(9):1087-95.
74. Liu F, Ji J, Li X, Li X, Xu J, Yue H, et al. Decreased CD1d level is associated with CD86 over-expression in B cells from systemic lupus erythematosus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 1 avr 2017;49(4):328-37.
75. Allam M, Fathy H, Allah DA, Salem MAE. Lupus nephritis: correlation of immunohistochemical expression of C4d, CD163-positive M2c-like macrophages and Foxp3-expressing regulatory T cells with disease activity and chronicity. *Lupus.* juill 2020;29(8):943-53.
76. Renaudineau Y, Chauveau D, Faguer S, Huart A, Ribes D, Pugnet G, et al. Urinary soluble CD163 is useful as « liquid biopsy » marker in lupus nephritis at both diagnosis and follow-up to predict impending flares. *J Transl Autoimmun.* déc 2024;9:100244.
77. Govoni M, Hanly JG. The management of neuropsychiatric lupus in the 21st century: still so many unmet needs? *Rheumatology (Oxford).* 5 déc 2020;59(Suppl5):v52-62.

VII. Annexes

Sous-populations de LTfh (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LTfh1	25,2% [23,2 ; 26,4]	29,8% [25 ; 33,8]	0,13
LTfh2	22,2% [18,7 ; 26,6]	19,9% [15,7 ; 21,9]	0,24
LTfh17	36,2% [28,7 ; 38,4]	36,1% [28,9 ; 40,8]	0,72

Tableau 4. Répartition des sous-populations de lymphocytes T folliculaires auxiliaires (LTfh) chez les témoins et les patients.

Ratios d'expression des FCyR	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
CD64 IMF/CD16 IMF	3,0 [2,2 ; 3,8]	3,9 [2,9 ; 4,8]	0,18
CD64 IMF/CD32 IMF	1,2 [1,1 ; 1,4]	1,6 [1,3 ; 2,2]	0,08
CD32 IMF/CD16 IMF	2,7 [1,8 ; 2,8]	2,4 [2,0 ; 2,7]	0,72

Tableau 5. Ratios des intensités moyennes de fluorescence (IMF) des Fc gamma récepteurs (FCyR) sur les monocytes totaux chez les témoins et les patients.

Expression de CD25 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LT CD4+	5,4% [4,4 ; 7,4]	6,5% [6,1 ; 7,9]	0,24
LT CD8+	1,5% [1,1 ; 2,0]	2,9% [1,3 ; 4,3]	0,18
LT DN	5,7% [2,0 ; 13,8]	2,5% [2,3 ; 9,6]	0,82
LT DP	8,0% [5,5 ; 14,9]	1,5% [0,5 ; 3,6]	0,02

Tableau 6. Expression de CD25 par les sous-populations lymphocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de PD1 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LT CD4+	23,3% [17,9 ; 27,7]	24,0% [17,1 ; 29,6]	0,99
LT CD8+	26,3% [12,5 ; 42]	21,2% [7 ; 41,1]	0,40
LT DN	36,1% [20,4 ; 40,8]	22,4% [11,1 ; 35,3]	0,35
LT DP	34,6% [17,9 ; 43,3]	30,1% [23,9 ; 37,8]	0,9

Tableau 7. Expression de PD1 par les sous-populations lymphocytaires chez les témoins et les patients.

Co-expression de PD1 et ICOS (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LTfh1	24,6 % [18,2 ; 27,5]	27,4 % [19,4 ; 42,0]	0,31
LTfh2	10,7 % [8,1 ; 13,8]	11,1 % [8,8 ; 16,3]	0,72
LTfh17	15,4 % [6,9 ; 16,6]	16,5 % [7,4 ; 17,3]	0,60

Tableau 8. Co-expression de PD1 et ICOS par les sous-populations de lymphocytes T folliculaires auxiliaires (LTfh) chez les témoins et les patients.

Expression de Ki67 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LT CD4+	0,24 % [0,09 ; 0,51]	0,32 % [0,18 ; 0,62]	0,49
LT CD8+	0,22 % [0,09 ; 0,35]	0,24 % [0,11 ; 0,36]	0,86
LT DN	0,26 % [0,17 ; 0,53]	0,43 % [0,19 ; 1,14]	0,59
LT DP	1,01 % [0,71 ; 2,16]	0,46 % [0,0 ; 0,81]	0,10
LTfh	0,2 % [0,08 ; 0,38]	0,24 % [0,16 ; 0,41]	0,59
LTfh1	0,09 % [0,04 ; 0,25]	0,22 % [0,0 ; 0,49]	0,76
LTfh2	0,24 % [0,09 ; 0,39]	0,29 % [0,11 ; 0,48]	0,73
LTfh17	0,19 % [0,09 ; 0,31]	0,28 % [0,03 ; 0,36]	0,89

Tableau 9. Expression de Ki67 par les sous-populations lymphocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de CTLA-4 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LT CD4+	0,3 % [0,2 ; 0,7]	0,5 % [0,3 ; 0,8]	0,48
LT CD8+	0,6 % [0,3 ; 0,9]	0,5 % [0,2 ; 0,8]	0,73
LT DN	2,0 % [1,2 ; 11,3]	1,5 % [1,0 ; 3,3]	0,48
LT DP	8,9 % [6,0 ; 11,4]	2,0 % [1,6 ; 5,6]	0,02

Tableau 10. Expression de CTLA-4 par les sous-populations lymphocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de CD28 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LT CD4+	99,3 % [98,4 ; 99,5]	98,2 % [92,1 ; 99,6]	0,64
LT CD8+	71,9 % [65,4 ; 79,2]	78,8 % [55,5 ; 85,3]	0,78
LT DN	56,5 % [51,4 ; 64,6]	64,7 % [55,4 ; 82,5]	0,27
LT DP	80,3 % [62,3 ; 86,4]	87,1 % [64,7 ; 95,9]	0,40

Tableau 11. Expression de CD28 par les sous-populations lymphocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de CD62L (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
LT totaux	66,7 % [64,1 ; 73,8]	67,8 % [58,6 ; 80,0]	0,78
LT CD4+	75,5 % [70,3 ; 82,6]	73,8 % [63,2 ; 81,4]	0,66
LT CD8+	59,7 % [49,3 ; 61,0]	71,3 % [42,6 ; 73,2]	0,35
LT DN	40,2 % [19,3 ; 68,1]	49,3 % [16,5 ; 67,3]	0,27
LT DP	40,4 % [32,5 ; 47,4]	62,8 % [41,6 ; 71,0]	0,18

Tableau 12. Expression de CD62L par les sous-populations lymphocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de CD86 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
Monocytes classiques	90,0% [80,6 ; 97,5]	93,4% [85,0 ; 98,7]	0,44
Monocytes intermédiaires	99,4% [98,7 ; 99,6]	99,3% [98,3 ; 100]	0,98
Monocytes non classiques	95,2% [91,9 ; 98,9]	98,8% [96,5 ; 99,3]	0,24

Tableau 13. Expression de CD86 par les sous-populations monocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de CD163 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
Monocytes classiques	95,2 % [87,4 ; 97,5]	95,9 % [93,1 ; 97,8]	0,64
Monocytes intermédiaires	78,9 % [61,5 ; 92,8]	86,4 % [82,7 ; 97,1]	0,18
Monocytes non classiques	49,0 % [32,4 ; 68,5]	14,3 % [10,1 ; 38,9]	0,04

Tableau 14. Expression de CD163 par les sous-populations monocytaires chez les témoins et les patients.

Expression de CD1d (IMF)	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe témoin	Médiane [Q1 ; Q3] du groupe patient	p-value
Monocytes classiques	21 943 [20 020 ; 23 136]	18 687 [17 963 ; 23 193]	0,49
Monocytes intermédiaires	15 314 [13 131 ; 18 645]	14 649 [12 554 ; 16 671]	0,54
Monocytes non classiques	9 108 [8 929 ; 10 077]	8 431 [7 783 ; 8 926]	0,04

Tableau 15. Intensités moyenne de fluorescence (IMF) du CD1d sur les sous-populations monocytaires chez les témoins et les patients.

Sous-populations de LTfh (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
LTfh1	33,8 % [26,1 ; 37]	27,6% [26,5 ; 29,8]	0,33
LTfh2	20,7 % [20,1 ; 22,5]	15,5% [12,2 ; 15,8]	0,08
LTfh17	30 % [25,2 ; 38]	40,4% [36,1 ; 41,1]	0,33

Tableau 16. Répartition des sous-populations de lymphocytes T folliculaires auxiliaires (LTfh) selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Sous-populations monocytaires (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
Monocytes classiques	91,6 % [88,3 ; 95]	91,6 % [81 ; 91,8]	0,43
Monocytes intermédiaires	3,4 % [2,3 ; 4,7]	3,9 % [2,6 ; 11,3]	0,79
Monocytes non classiques	1,1 % [0,4 ; 2,9]	2,6 % [1,5 ; 4,4]	0,33

Tableau 17. Répartition des sous-populations monocytaires selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression de CD69 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
LT CD4+	0,3% [0,1 ; 0,4]	0,2% [0,1 ; 0,2]	0,63
LT CD8+	1,5% [0,9 ; 2,5]	2,8% [0,9 ; 3,3]	0,54
LT DN	3,1% [1,7 ; 3,5]	5,0% [2,2 ; 9,4]	0,66
LT DP	1,9% [1,0 ; 2,4]	2,8% [2,4 ; 6,3]	0,18

Tableau 18. Expression de CD69 par les sous-populations lymphocytaires selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression de CD25 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
LT CD4+	6,6% [6,3 ; 7,4]	6,5% [5,7 ; 8,1]	0,79
LT CD8+	3,1% [2,8 ; 4,8]	1,5% [0,9 ; 3,4]	0,33
LT DN	2,4% [2,3 ; 5,6]	4,8% [2,5 ; 12,5]	0,54
LT DP	1,9% [1,0 ; 2,4]	1,5% [0,9 ; 3,4]	0,93

Tableau 19. Expression de CD25 par les sous-populations lymphocytaires selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression de PD1 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
LT CD4+	24,8% [17,2 ; 35,7]	22,4% [19,3 ; 24,6]	0,54
LT CD8+	25,3% [17,5 ; 31,4]	19,3% [7,5 ; 20,4]	0,25
LT DN	18,9% [10,2 ; 39,5]	22,4% [18,8 ; 26,7]	0,66
LT DP	27,2% [23,7 ; 31,0]	38,9% [27,2 ; 49,1]	0,33

Tableau 20. Expression de PD1 par les sous-populations lymphocytaires selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression de CTLA-4 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
LT CD4+	0,5 % [0,3 ; 0,8]	0,5 % [0,3 ; 0,5]	0,79
LT CD8+	0,4 % [0,3 ; 0,8]	0,8 % [0,5 ; 0,9]	0,79
LT DN	3,3 % [1,6 ; 4,7]	1,0 % [0,9 ; 1,5]	0,03
LT DP	2,5 % [1,9 ; 7,5]	1,9 % [1,4 ; 2,8]	0,43

Tableau 21. Expression de CTLA-4 par les sous-populations lymphocytaires selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression des FCyR par les monocytes totaux (IMF)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
CD64	567 013 [448 795 ; 628 828]	586 800 [474 587 ; 619 490]	>0,99
CD32	367 657 [338 389 ; 383 373]	269 745 [253 611 ; 296 558]	0,02
CD16	174 976 [149 309 ; 211 640]	127 309 [77 766 ; 136 916]	0,08

Tableau 22. Intensité moyenne de fluorescence (IMF) des Fc gamma récepteurs (FCyR) sur les monocytes totaux selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression de CD163 (%)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
Monocytes classiques	96,7 % [94,2 ; 97,9]	93,6 % [89 ; 96,7]	0,36
Monocytes intermédiaires	87,1 % [84,8 ; 95,7]	82,9 % [80,6 ; 95,8]	0,54
Monocytes non classiques	47,6 % [30,0 ; 65,6]	49 % [43,2 ; 76,2]	0,66

Tableau 23. Expression de CD163 par les monocytes totaux selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

Expression de CD1d (IMF)	Médiane [Q1 ; Q3] des patients sans NL	Médiane [Q1 ; Q3] des patients avec NL	p-value
Monocytes classiques	20 753 [18 346 ; 25 182]	18 436 [16 688 ; 19 795]	0,33
Monocytes intermédiaires	16 007 [14 733 ; 17 170]	11 615 [10 658 ; 13 492]	0,03
Monocytes non classiques	8 615 [8 059 ; 8 882]	7 800 [7 765 ; 8 941]	0,79

Tableau 24. Intensité moyenne de fluorescence (IMF) du CD1d sur les monocytes totaux selon la présence d'une néphropathie lupique (NL) chez les patients.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée Clara BRIGHT

Déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

(Décret n°92-657 du 13 juillet 1992)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 22213533t

N° Thèse : 70

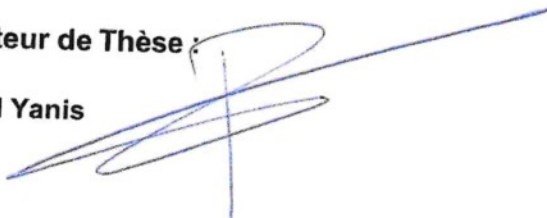
Nom et Prénom : BRIGHT Clara

Sujet : Développement d'un panel d'immunophénotypage en routine hospitalière : validation analytique et application au lupus systémique

Tours, le : 08/10/2025

Le Directeur de Thèse :

RAMDANI Yanis



**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



Développement d'un panel d'immunophénotypage en routine hospitalière : validation analytique et application au lupus systémique

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Introduction. Le lupus systémique (LS) est une maladie auto-immune chronique, caractérisée par la production d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes nucléaires. Il évolue par poussées entrecoupées de phases de rémission. Les marqueurs biologiques utilisés actuellement ne permettent qu'incomplètement de suivre l'activité de la maladie et les atteintes d'organes. L'ajout d'analyses en cytométrie en flux (CMF) pourrait améliorer le suivi des patients. L'objectif de ce travail était la mise au point de panels de CMF permettant d'isoler des populations et des marqueurs fonctionnels dans le suivi des patients LS sous traitement, stables ou en poussées.

Matériel et méthode. La mise au point des panels a été réalisée sur prélèvements sanguins issus de témoins sains de l'établissement français du sang. Les patients lupiques ont été inclus de manière prospective, dans le cadre de la cohorte FiNK Lupus au laboratoire d'immunologie du CHRU de Tours. Trois panels ont été mis au point et testés, évaluant la répartition et l'activation des populations de lymphocytes T (LT), incluant les LT folliculaires auxiliaires (LTfh), et des sous populations monocytaires. Le marquage a été effectué sur sang total avec les mêmes conditions pré-analytiques qu'en routine hospitalière.

Résultats. Huit témoins sains et 11 patients lupiques ont été inclus (81,8 % de femmes, âge moyen 44 ans [27–75]). Cinq patients (45,5 %) avaient des antécédents de néphrite lupique (NL) ; deux (18,2 %) étaient en poussée de la maladie. Les proportions lymphocytaires et monocytaires étaient comparables entre patients et témoins. Chez les patients, on observait une diminution des LT double négatifs (3,4 % vs 5,0 %, $p=0,026$), une baisse de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) de CTLA-4 (5 877 vs 7 669, $p=0,03$) et de l'expression membranaire de CD25 (1,5 % vs 8,0 %, $p=0,02$) sur les LT double positifs. Aucune différence significative n'était retrouvée sur les LTfh. Sur les monocytes non classiques, une augmentation de CD163 (49,0 % vs 14,3 %, $p=0,04$) et une baisse de l'IMF du CD1d (8 431 vs 9 108, $p=0,04$) étaient observées. L'IMF du CD64 était augmentée sur les monocytes totaux (586 800 vs 414 658, $p=0,15$), avec une différence significative chez les patients en poussée (645 734 vs 414 658, $p=0,04$). Chez les patients avec antécédents de NL, une baisse des LT CD4⁺ (51,7 % vs 66,5 %, $p=0,05$) et du ratio CD4/CD8 (1,2 vs 2,3, $p=0,08$) étaient retrouvées. Les monocytes classiques, intermédiaires et non classiques exprimaient davantage CD86 ($p=0,03$; 0,017 ; 0,0087). L'IMF du CD32 sur les monocytes totaux (269 745 vs 367 657, $p=0,02$) et celle du CD1d sur les monocytes intermédiaires (11 615 vs 16 007, $p=0,03$) étaient diminuées.

Conclusion. Ce travail montre qu'un panel de CMF peut être intégré à la routine hospitalière et détecter des variations phénotypiques pertinentes dans le LS, notamment en cas de NL. L'élargissement de la cohorte reste nécessaire pour confirmer ces résultats et valider son intérêt pour le suivi des patients.

Mots-clés : immunophénotypage, cytométrie en flux, immuno-monitoring, lupus systémique, néphropathie lupique

Président du jury : Pr Claire POUPLARD, pharmacien, PU-PH, Laboratoire Hématologie-Hémostase – Faculté de Pharmacie Tours

Membres du jury :

Dr Yanis RAMDANI, médecin, PH-U, Laboratoire Immunologie – Faculté de Médecine Tours

Dr Pierre BOULARD, pharmacien, AHU, Laboratoire Immunologie – Faculté de Pharmacie Tours

Dr Clémence GRANIER, pharmacien, MCU-PH, Laboratoire Hémato-Immunologie – Faculté de Médecine Orléans

Présentée publiquement le 26 septembre 2025 à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Tours