A close-up photograph of a microscope objective lens, illuminated with a blue light. The lens is metallic and has the text 'UPlanApo 40x/0,85 JAPAN' engraved on it. The background is dark and out of focus, showing other parts of the microscope.

Approches diagnostiques pour le dépistage des Immunodéficiences

13 -3- 2025

Alessandra Noto

PhD, assistante FAMH

Service d'immunologie et d'allergie,
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)

Lausanne



Premier cas d'immunodéficience en 1952

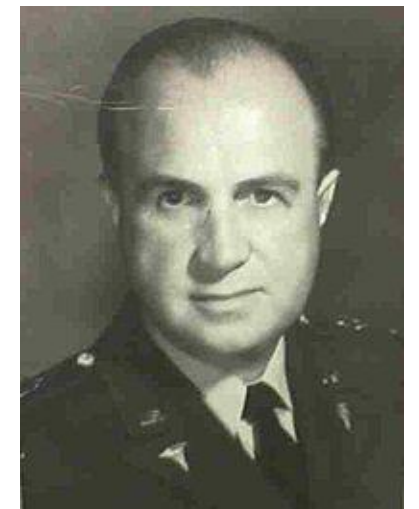
- En **1952**, le colonel Ogden Bruton, pédiatre et chef du service de pédiatrie à l'**hôpital militaire Walter Reed à Washington, DC**, a réalisé des avancées importantes dans le domaine de l'immunologie.
- **Lors de sa recherche** des raisons pour lesquelles un jeune enfant hospitalisé souffrait d'infections répétées et menaçant sa vie, **découvrit que l'enfant était incapable de synthétiser des anticorps spécifiques** et, plus tard, que le sérum de l'enfant manquait de gamma-globuline.
- Cette découverte a permis la dissection moléculaire et phénotypique des déficiences immunitaires et **a jeté les bases du développement de l'immunologie clinique moderne.**

PEDIATRICS

AGAMMAGLOBULINEMIA

By COL. OGDEN C. BRUTON, M.C., U.S.A.
Washington, D.C.

1952



Colonel Ogden Bruton

Les immunodéficiences primaires (IDP) sont un groupe de maladies rares et hétérogènes résultant de **anomalies génétiques**.

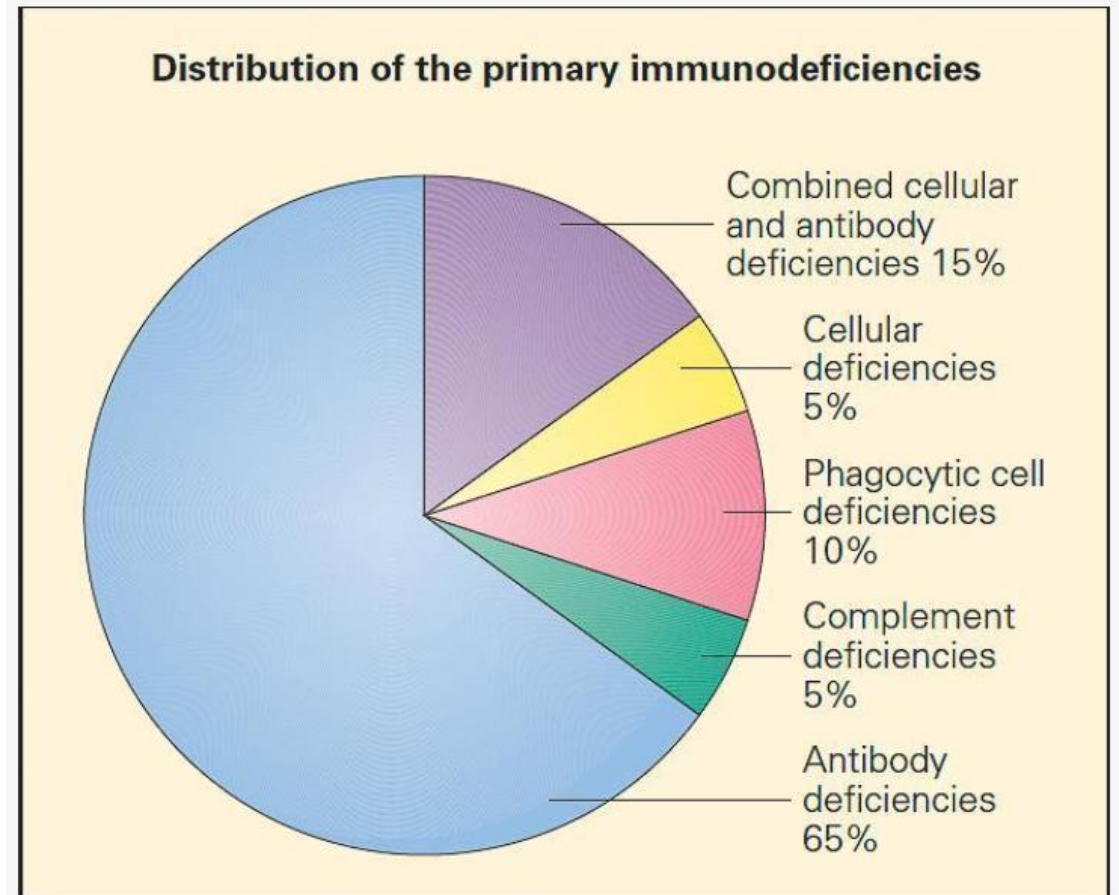
Ces troubles conduisent à **une fonction immunitaire altérée**, rendant les patients plus **susceptibles aux infections récurrentes**, et parfois à des **maladies auto-immunes ou inflammatoires**.



Classification des IDP:

➤ Les IDP sont classées en fonction de la principale composante du système immunitaire qui est déficiente, absente ou défectueuse :

- Immunité humorale
- Immunité cellulaire
- Immunité humorale et cellulaire combinée
- Cellules phagocytaires
- Protéines du complément



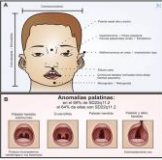




Suspicion de déficit immunitaire primaire (IDP)

- ❑ Infections fréquentes et récurrentes (antibiotiques >4 fois par an)
- ❑ Infections sévères avec des pathogènes habituellement inoffensifs
- ❑ Antécédents familiaux
- ❑ Retard de croissance
- ❑ Eczéma et manifestations cutanées
- ❑ Autoimmunité

Caractéristiques et incidence des IDP

- ❑ **500 gènes** ont été associés à des IDP
- ❑ Environ **30-40%** des **immunodéficiences primaires** (IDP) n'ont pas de cause génétique identifiée, malgré les avancées de la recherche. Cela signifie qu'un nombre significatif de maladies n'ont pas encore de gène responsable connu.
- ❑ Les immunodéficiences primaires **se manifestent** généralement pendant **l'enfance**. 70 % des patients ont **moins de 20 ans** au moment de l'apparition de la maladie.
- ❑ La transmission est souvent liée au chromosome X, **60 % des patients sont de sexe masculin**.
- ❑ L'incidence globale de IDP est d'environ **1/200 (1 sur 2000 naissances vivantes!!)**

Principales immunodéficiences et leurs caractéristiques cliniques et infectieuses

Maladie	Composant affecté	Gène(s)	Germes fréquemment associés	Description	Clinique
Syndrome de DiGeorge	Lymphocytes T	<i>TBX1</i>	Virus (VZV, CMV), bactéries (Staphylococcus, Streptococcus)	Malformation du thymus, anomalies cardiaques, fentes palatines, visage caractéristique.	
Candidose mucocutanée chronique	Lymphocytes T	<i>STAT1</i> , <i>AIRE</i>	Candida spp., Aspergillus	Infections chroniques à Candida sur la peau, les ongles et les muqueuses.	
Agammaglobulinémie liée à l'X (XLA)	Lymphocytes B	<i>BTK</i>	Bactéries encapsulées (Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae)	Infections bactériennes récurrentes, absence de tonsilles et ganglions lymphatiques.	Absence
Déficit immunitaire commun variable (CVID)	Lymphocytes B	<i>ICOS</i> , <i>TNFRSF13B (TACI)</i>	Bactéries (Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae), virus (CMV, EBV)	Infections récurrentes des voies respiratoires, risque accru d'auto-immunité.	Absence
Déficit immunitaire combiné sévère (SCID)	Lymphocytes T et B	<i>IL2RG</i> , <i>RAG1</i> , <i>ADA</i>	Bactéries (Pneumocystis jirovecii, Streptococcus pneumoniae), virus (CMV, VZV, RSV), champignons (Candida spp.)	Infections graves précoces, absence de thymus visible à la radiographie.	Absence
Syndrome de Wiskott-Aldrich	Lymphocytes T et B	<i>WAS</i>	Bactéries (Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae), virus (CMV, EBV)	Eczéma sévère, purpura, infections fréquentes.	
Déficit en C1q	Système du complément	<i>C1QA</i> , <i>C1QB</i> , <i>C1QC</i>	Bactéries (Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis)	Lupus-like syndrome, infections bactériennes fréquentes.	Absence
Déficit en C3	Système du complément	<i>C3</i>	Bactéries (Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis)	Infections graves par des bactéries encapsulées.	Absence
Maladie granulomateuse chronique (CGD)	Phagocytes	<i>CYBB</i> (lié à l'X), <i>CYBA</i> , <i>NCF1</i> , <i>NCF2</i> , <i>NCF4</i>	Bactéries (Staphylococcus aureus, Salmonella spp.), Champignons (Aspergillus, Candida)	Infections bactériennes et fongiques récurrentes, formation de granulomes.	
Syndrome de Chédiak-Higashi	Phagocytes	<i>LYST</i>	Bactéries (Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae), Champignons (Candida spp.)	Albinisme partiel, infections récurrentes, anomalies neurologiques.	

Swiss newborn screening for severe T and B cell deficiency with a combined TREC/KREC assay – management recommendations

Trück Johannes^a, Prader Seraina^a, Natalucci Giancarlo^b, Hagmann Cornelia^a, Brotschi Barbara^a, Kelly Janet^a, Bassler Dirk^b, Steindl Katharina^c, Rauch Anita^c, Baumgartner Matthias^a, Fingerhut Ralph^a, Hauri-Hohl Mathias^a, Güngör Tayfun^a, Schmid Jana Pachlopnik^a, Berger Christoph^a, Reichenbach Janine^a

^a University Children's Hospital Zurich, Switzerland

^b Department of Neonatology, University Hospital Zurich and University of Zurich, Switzerland

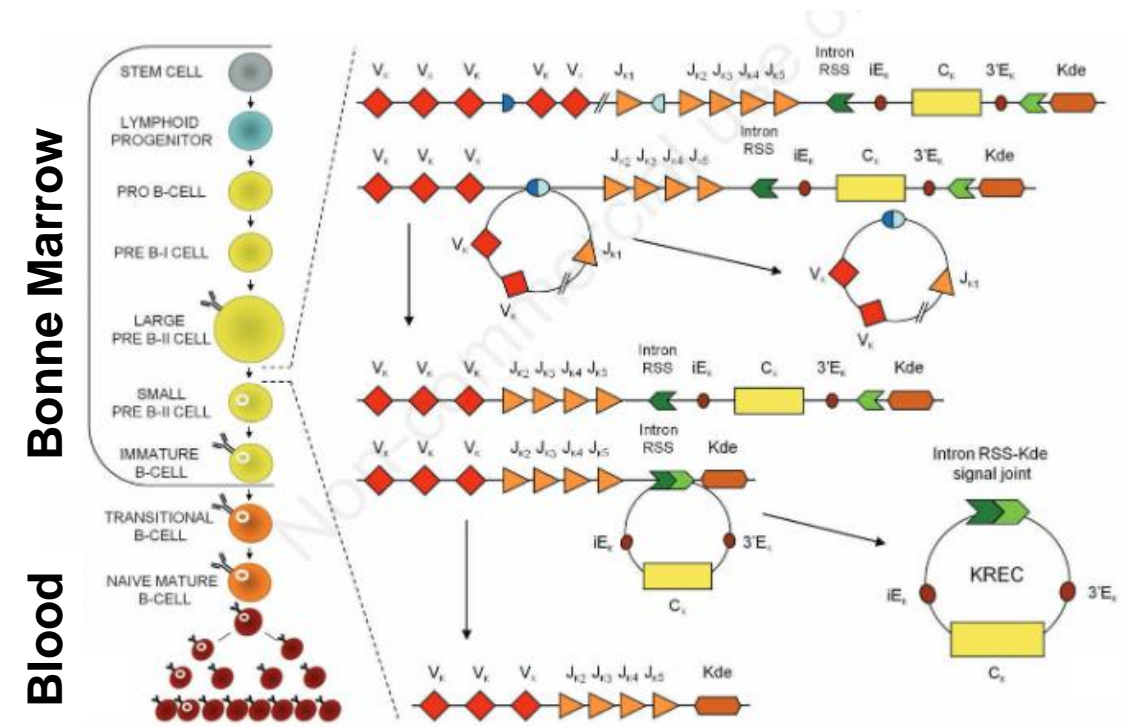
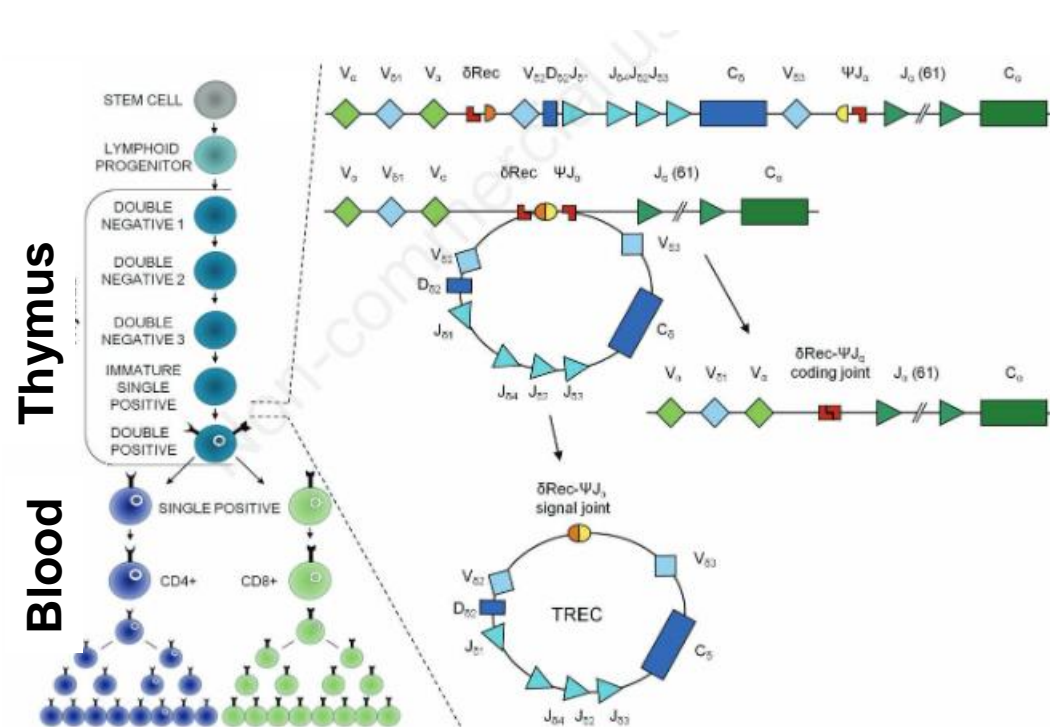
^c Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Switzerland

- ❑ **Le dépistage néonatal** des déficits sévères des cellules T et B primaires a été introduit en Suisse le **1er janvier 2019**.
- ❑ Les tests sont réalisés de manière centralisée dans le laboratoire de dépistage néonatal (NBS) de **l'Hôpital universitaire pour enfants de Zurich**.
- ❑ **Avec un diagnostic précoce et un traitement tempestif des patients atteints de SCID** dans un centre de transplantation expérimenté avant l'apparition de l'infection, les **taux de guérison peuvent atteindre 80 à 95 %!**



Newborn Screening: TREC/KREC assay

- Utilisé pour diagnostiquer les immunodéficiences primaires (ex. SCID) en analysant les lymphocytes T et B.
- TREC (T-cell receptor excision circles)** : fragments d'ADN circulaire produits lors de la maturation des lymphocytes T dans le thymus. Indicateur de la production de nouveaux lymphocytes T naifs.
- KREC (Kappa-deleting recombination excision circles)** : fragments d'ADN circulaire formés pendant la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Indicateur de la production récente de lymphocytes B.



Newborn Screening: TREC/KREC assay

Le test repose sur des techniques de **qPCR** (**quantitative Polymerase Chain Reaction**) pour mesurer la quantité de **TREC** et **KREC** dans l'ADN extrait des globules blancs à partir d'une **goutte de sang sec (DBS - dried blood spot)** prélevée par une piqûre au talon, généralement chez les nouveau-nés.

- 1. Isolation de l'ADN** : Extraction de l'ADN à partir des échantillons de sang.
- 2. Amplification par qPCR** : Amplification des séquences spécifiques des **TREC** et **KREC** à l'aide d'amorces et de sondes spécifiques. Un **gène de contrôle** (ex. albumine) est souvent analysé pour vérifier la qualité de l'ADN.
- 3. Analyse quantitative** : Mesure des niveaux de **TREC** et **KREC**, comparés aux valeurs de référence normales.

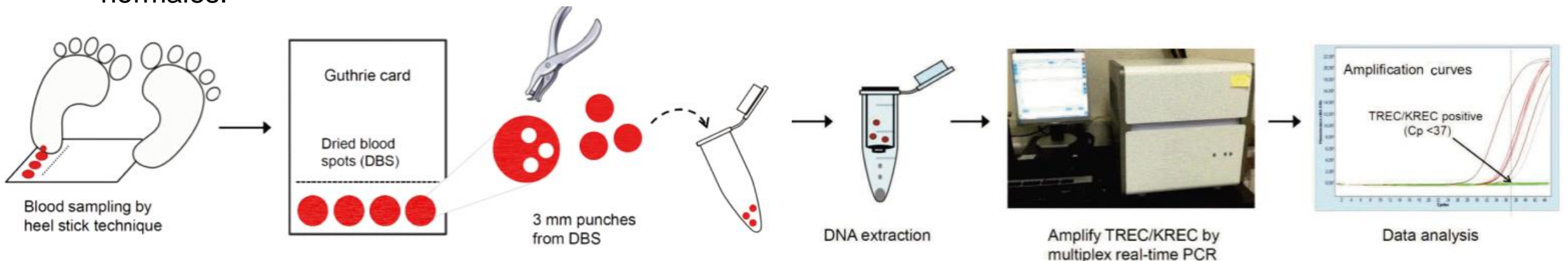
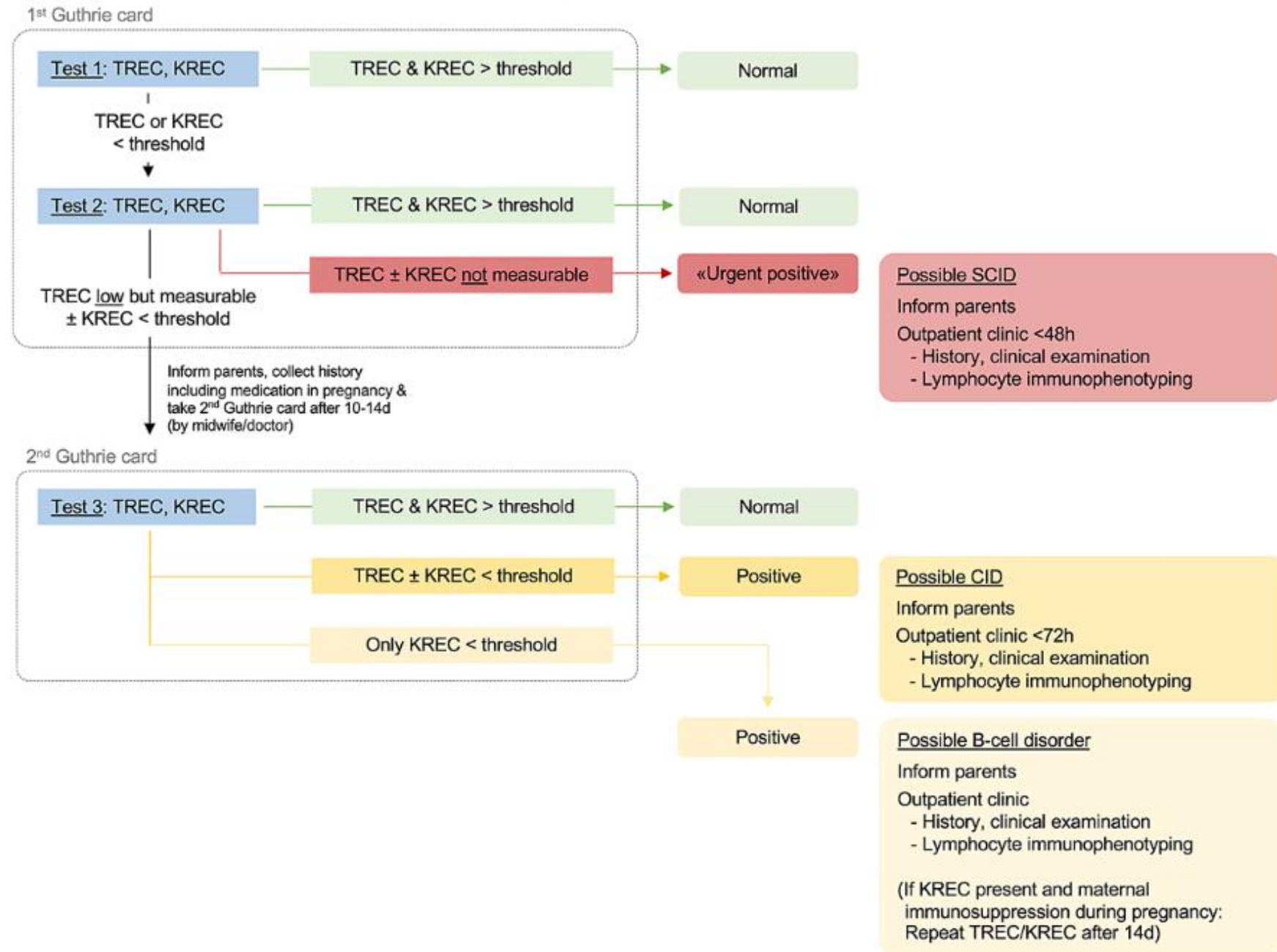


Figure 1: Screening algorithm –TREC/KREC screening and initial diagnostic evaluation.



European Society for Immunodeficiencies (ESiD)

➤ Fondée en 1994, l'ESiD s'engage à améliorer la compréhension, le diagnostic, le traitement et la prévention des immunodéficiences primaires (IDP).

➤ **Objectifs:**

- 1. Recherche**
- 2. Education**
- 3. Collaboration**
- 4. Registre**
- 5. Soutien aux Patients**



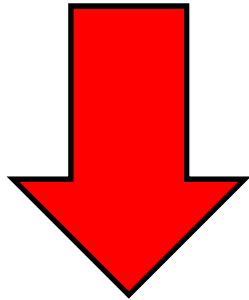
Prof. Fabio Candotti
President (2022-2026)



European Society
for Immunodeficiencies

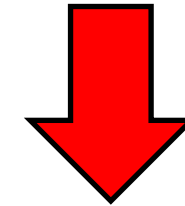
Prise en charge des patients pour la recherche d'IDP

Antécédents familiaux

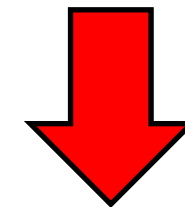


- **Analyse génétique (Sanger/ NGS)**

Pas d'antécédents familiaux



- **Le dépistage immunologique** à travers des tests sérologiques, cellulaires et fonctionnels, qui vont évaluer si la fonction du système immunitaire est absente ou compromise.



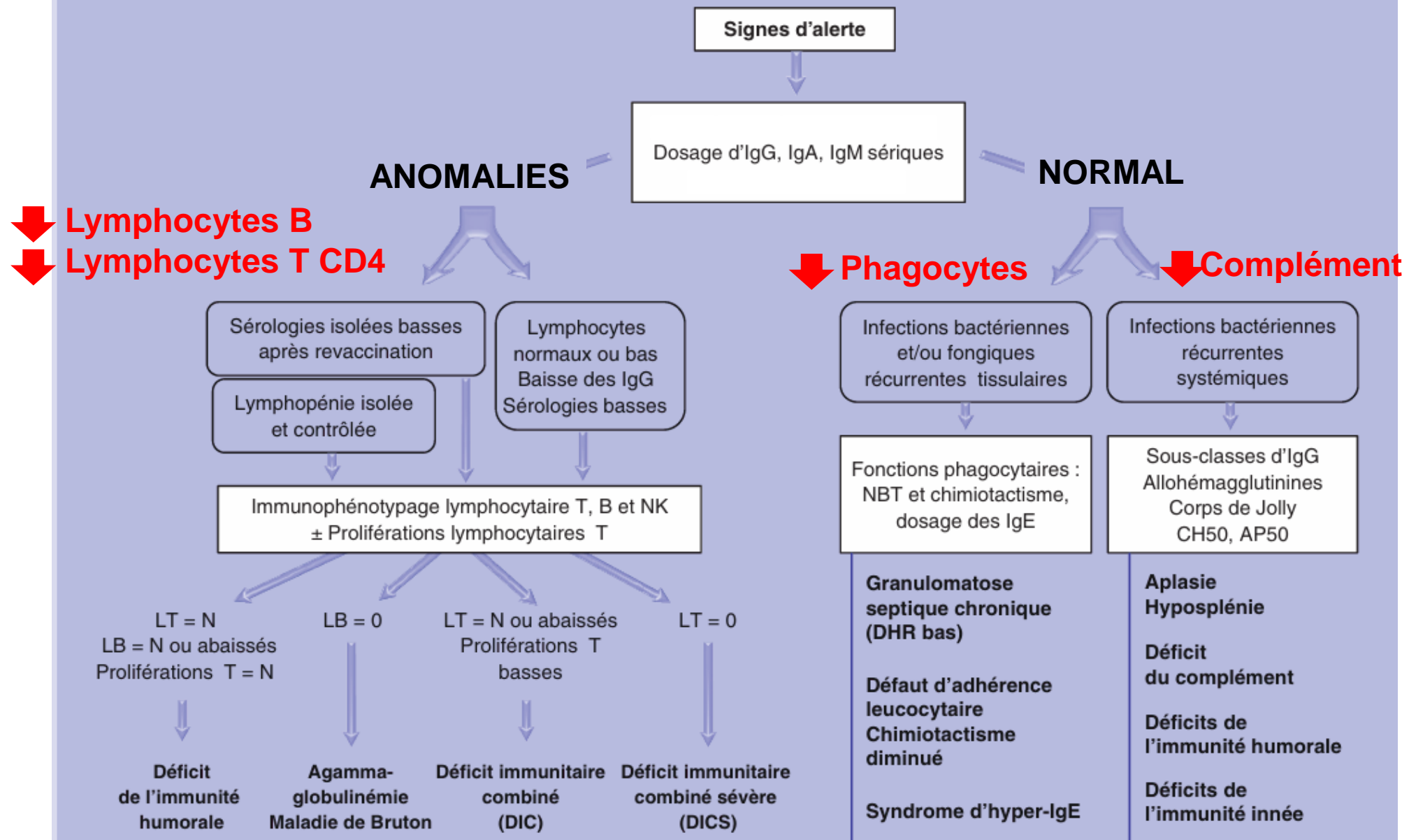
- **Analyse génétique (Sanger/ NGS)**

Cas n.1:

- ❑ **Patient** : Homme, 31 ans

- ❑ **Motif de consultation** : Infections respiratoires récurrentes (sinusites, pneumonies) depuis trois ans, avec deux épisodes documentés de pneumonie bactérienne, dont l'un causé par *Streptococcus pneumoniae*.

- ❑ **Antécédents médicaux** :
 - Infections récurrentes depuis l'enfance, aggravées à l'âge adulte.
 - Épisodes de diarrhée chronique intermittente.
 - Fatigue chronique et perte de poids involontaire (-5 kg en un an).



LB, lymphocytes B ; LT, lymphocytes T ; NK, Natural Killer ; N, normal ; NBT, test de réduction au nitrobleu de tétrazolium ; Ig, immunoglobuline.
(D'après : Picard C. La Revue du Praticien 2007 ; 57.)

1-Dosage des IgG/ IgA/ IgM

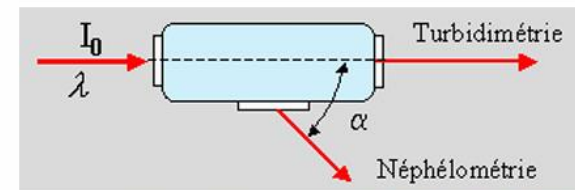
Technique: Turbidimétrie/néphélométrie

Principe: Mesure de la concentration d'Ig à l'aide d'un antisérum spécifique

En présence d'un anti-sérum un précipité se forme.

La turbidimétrie mesure la **réduction de l'intensité de la lumière transmise** à travers une solution contenant des particules en suspension.

Plus la concentration de protéines est élevée, plus la lumière est absorbée ou diffusée, ce qui entraîne une diminution de l'intensité lumineuse détectée.



Néphélométrie : mesure la lumière diffusée

1-Dosage des IgG/ IgA/ IgM

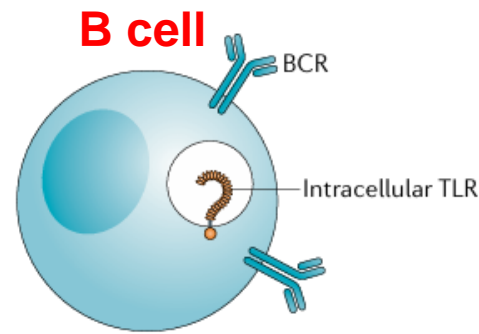
IMMUNOGLOBULINES

	Résultat	Unité	Intervalle de référence
IgG	↓ 4.58	g/l	6.10-16.16
IgA	↓ 0.35	g/L	0.85-4.99
IgM	1.41	g/l	0.35-2.42

Valeurs réduites pour les IgG et IgA et valeurs normales pour les IgM.

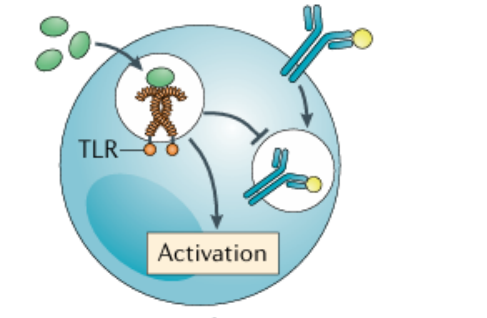
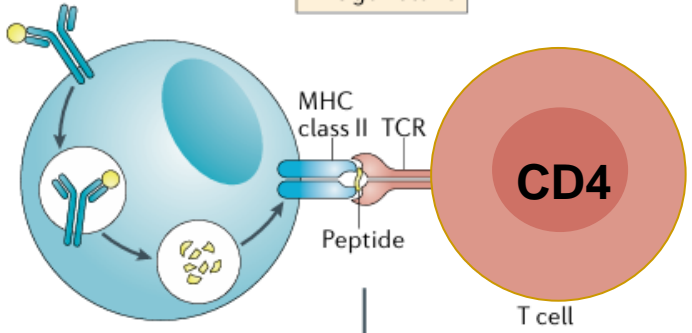
Activation T-dépendante

Activation T-indépendante



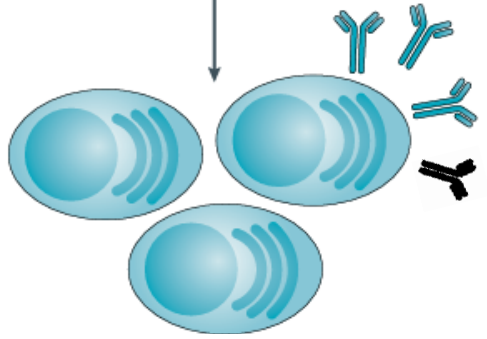
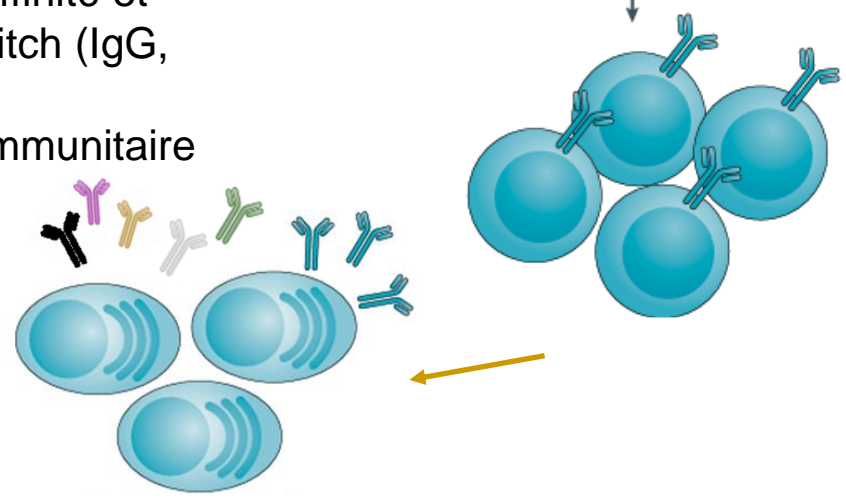
Antigen alone

Antigen + PAMPs



- ❑ Antigènes protéiques (**toxine diphtérique, toxine tétanique**, Protéines virales etc)
- ❑ Réponse plus efficace et durable
- ❑ Production d'anticorps de haute affinité et isotype switch (IgG, IgA, IgE)
- ❑ Mémoire immunitaire

- ❑ Polysaccharides capsulaires de bactéries (ex. **Streptococcus pneumoniae**, Neisseria meningitidis, **Haemophilus influenzae**).
- ❑ Rapide mais moins efficace (IgM)
- ❑ Anticorps de faible affinité

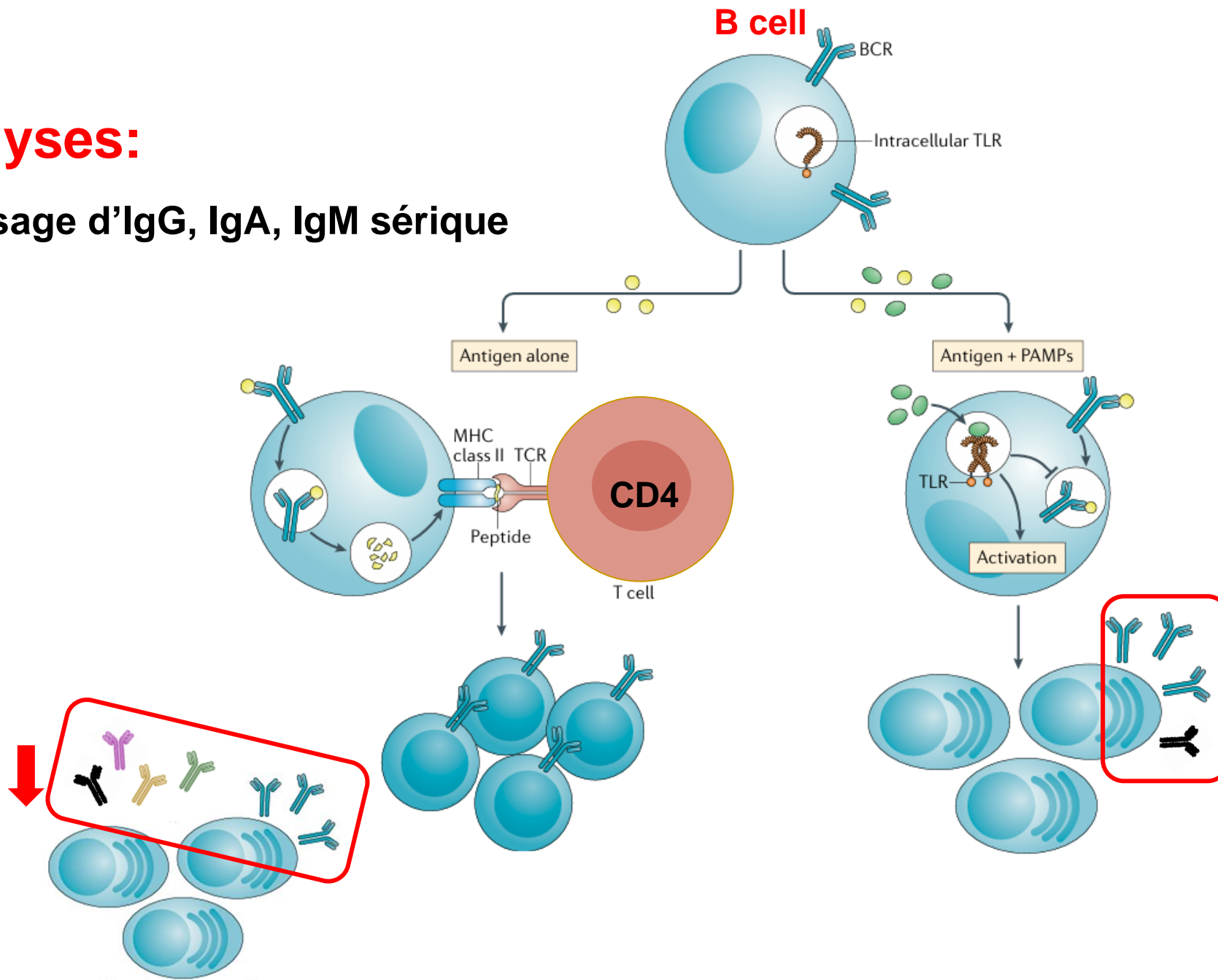


Long lived plasma cells

Short lived plasma cells

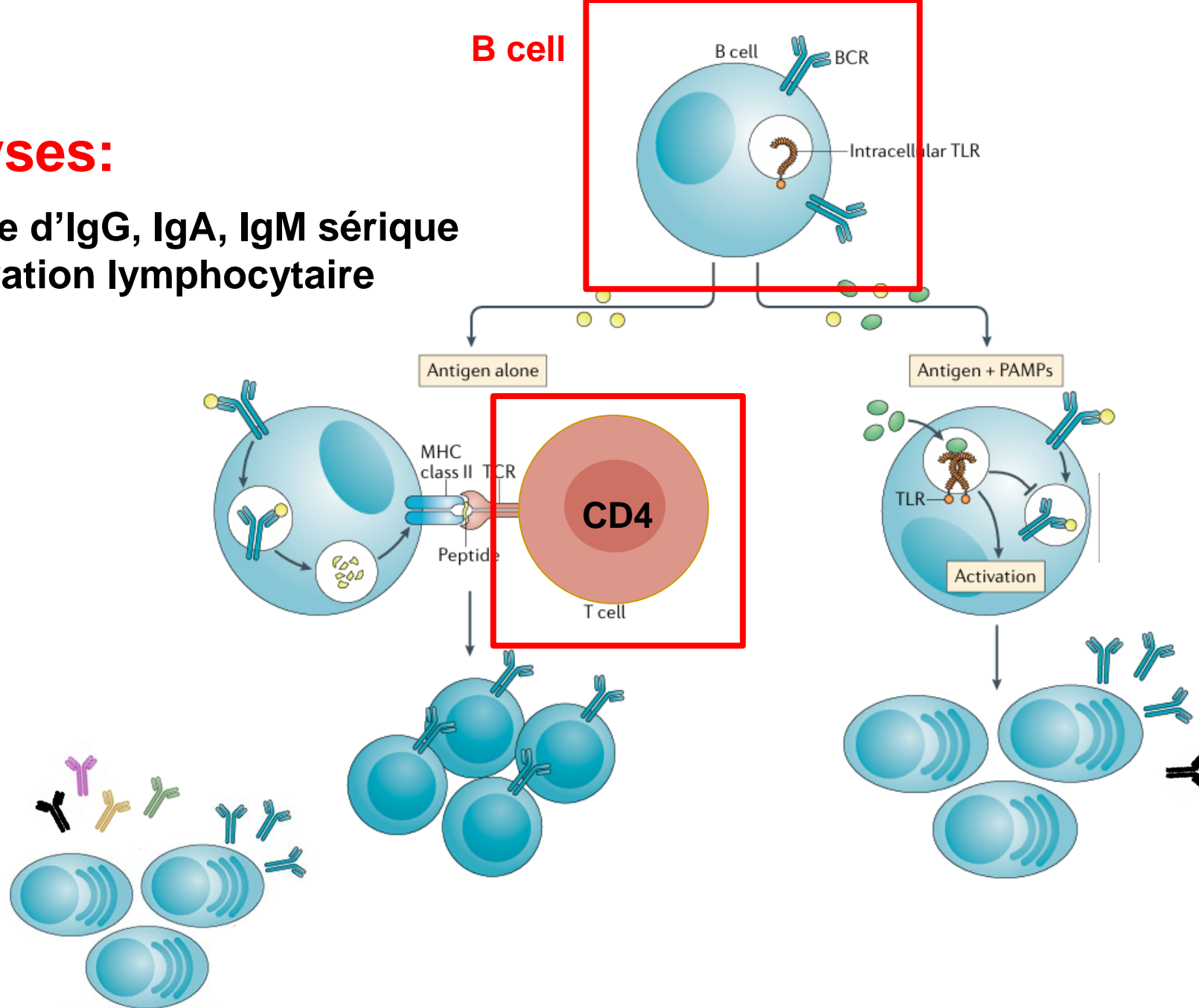
Analyses:

1. Dosage d'IgG, IgA, IgM sérique



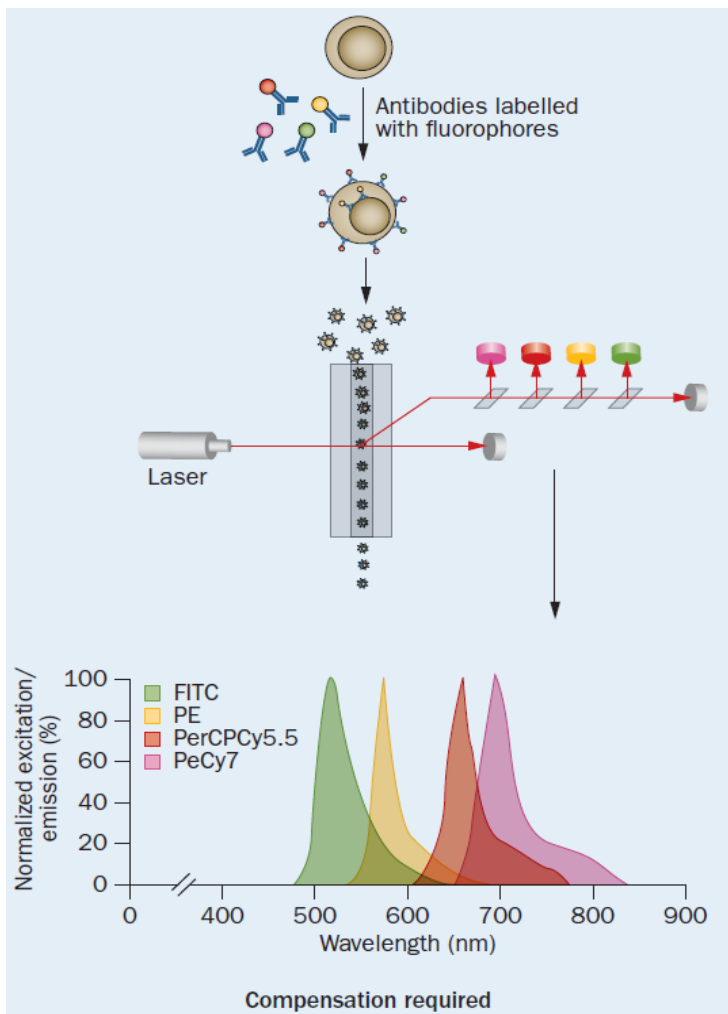
Analyses:

1. Dosage d'IgG, IgA, IgM sérique
2. Numération lymphocytaire

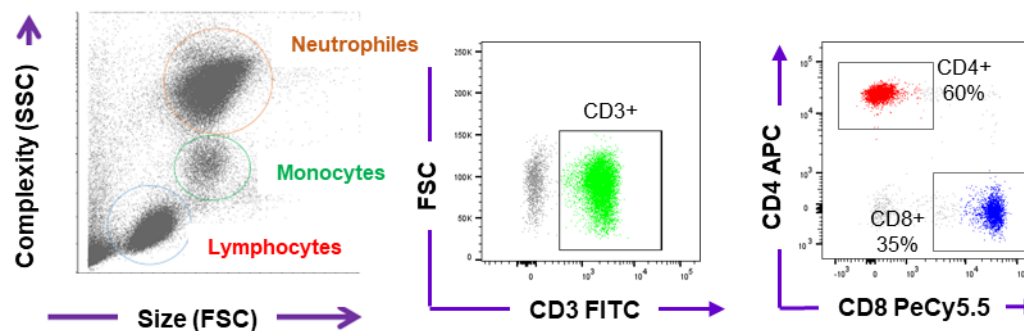


2. Numération lymphocytaire par cytométrie de flux

Cytométrie de flux



- ❑ **Passage des cellules à travers un flux laminaire**, excitant les cellules avec un ou plusieurs lasers.
- ❑ **Mesure de la diffusion de la lumière :**
 - - FSC (Forward Scatter) : taille cellulaire.
 - - SSC (Side Scatter) : granularité et complexité interne.
- ❑ **Détection de la fluorescence** émise par des marqueurs fluorescents liés à des antigènes de surface ou intracellulaires.
- ❑ **Analyse multiparamétrique** de milliers de cellules par seconde.
- ❑ **Permet la quantification (cell/mm³)** des différentes populations cellulaires



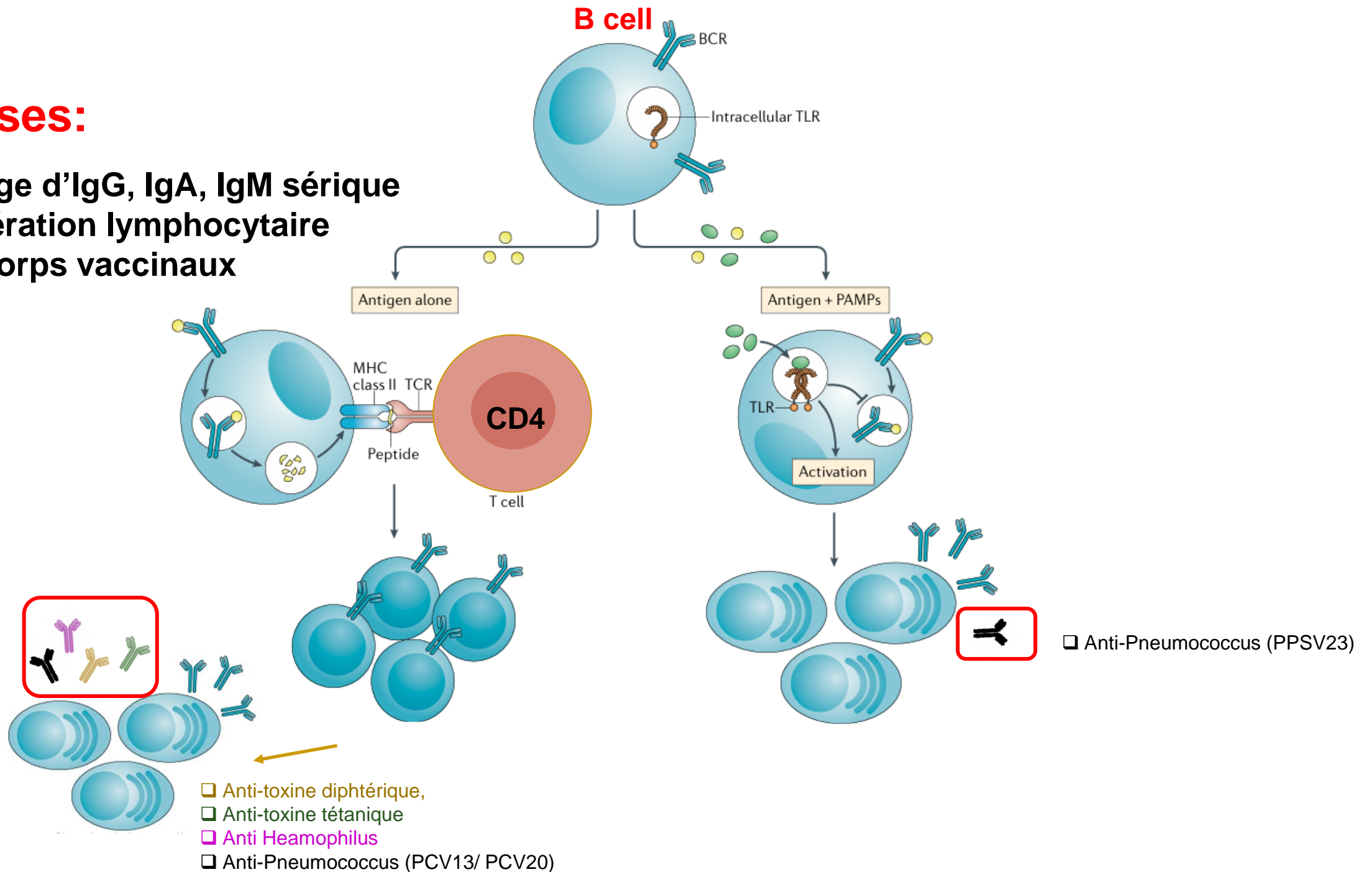
2. Numeration lymphocytaire

NUMERATION LYMPHOCYTAIRE

	Résultat	Unité	Intervalle de référence
Lymphocytes totaux	1621	cell/mm ³	1140-3380
Lymphocytes T	1076	cell/mm ³	780-2240
	66.4	% lympho	55-83
Lymphocytes T CD4+	580	cell/mm ³	490-1640
	35.8	% lympho	28-57
Lymphocytes T CD8+	466	cell/mm ³	170-880
	28.8	% lympho	10-39
Lymphocytes NK	352	cell/mm ³	80-690
	21.7	% lympho	7-31
Lymphocytes B	156	cell/mm ³	80-490
	9.6	% lympho	6-19

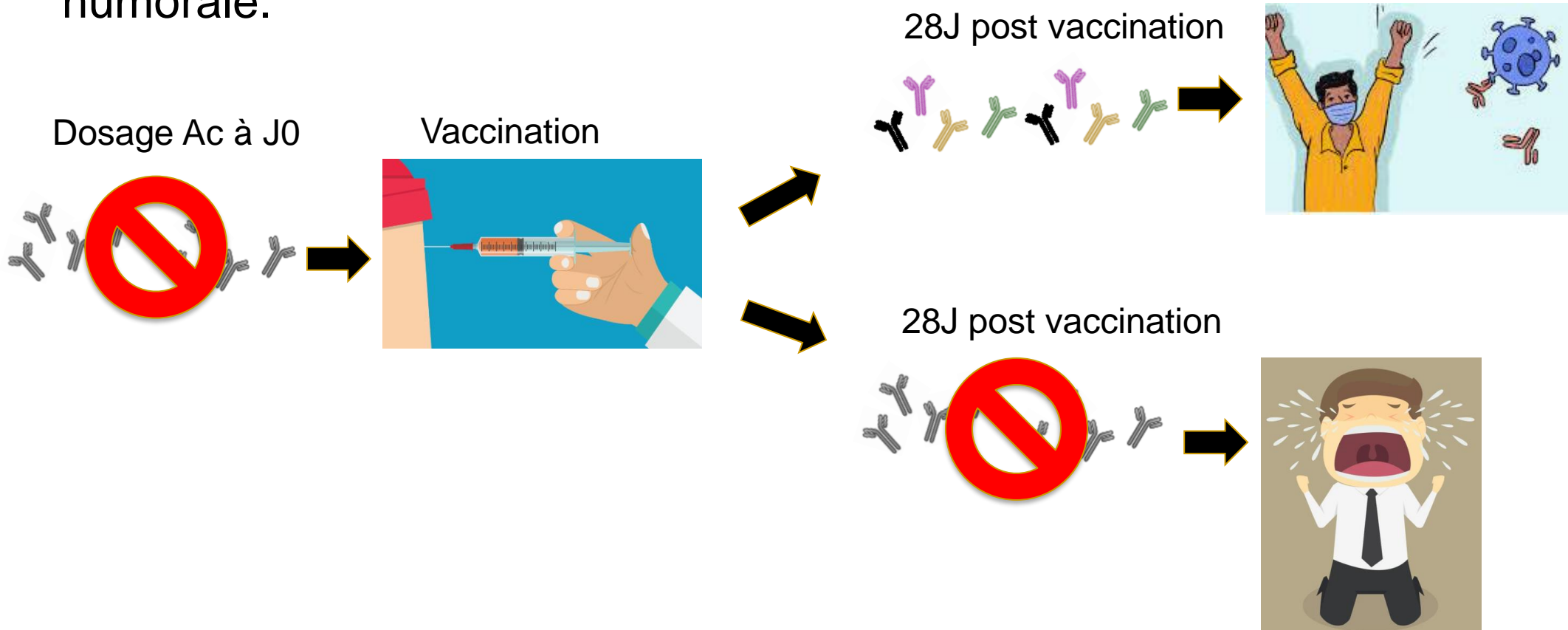
Analyses:

1. Dosage d'IgG, IgA, IgM sérique
2. Numération lymphocytaire
3. Anticorps vaccinaux



3-Réponse vaccinale

- On compare les niveaux d'anticorps **avant et après vaccination** (ex. à J0 et à J21 ou J28) pour évaluer la capacité du patient à produire une réponse humorale.



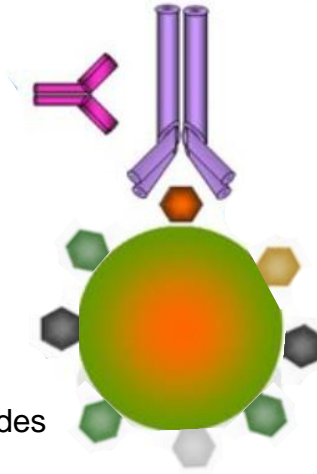
3-Réponse vaccinale

Luminex (Multiplex bead-based assay)

- **Principe** : Méthode multiplex permettant de doser simultanément plusieurs anticorps spécifiques dans un seul échantillon de sérum pour la détection d'anticorps IgG contre 23 polysaccharides des Pneumocoques .
- **Appareil** : LABScan 3D

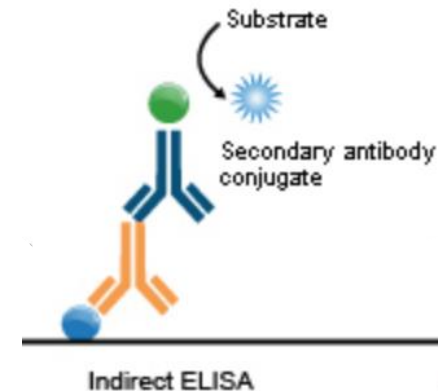
Microsphères (billes) couplées aux 23 polysaccharides

PE Anti human IgG



ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

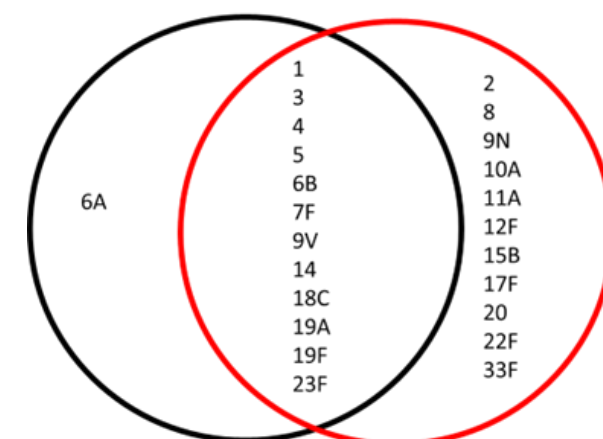
- **Principe** : Test immunoenzymatique quantitatif en format indirect pour la détection d'anticorps IgG dirigés contre la toxine de la diphtérie/ le toxoïde du tétanos et anti-Haemophilus influenzae .
- **Appareil** : Agility



3-Réponse vaccinale

	Résultat	Unité	Intervalle de référence	Antériorité
Anticorps anti-pneumocoque (IgG), 23 sérotypes	28 J après			J 0
Sérotipe 1*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 2		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 3*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 4*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 5*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 6A (6)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 6B (26)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 7F (51)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 8		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 9N (9)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 9V (68)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 10A (34)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 11A (43)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 12F (12)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 14*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 15B (54)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 17F (17)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 18C (56)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 19A (57)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 19F (19)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 20		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 23F (23)*		µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 33F (70)		µg/ml	>0.35	↓ <0.03

Prevenar 13 **Pneumovax 23**



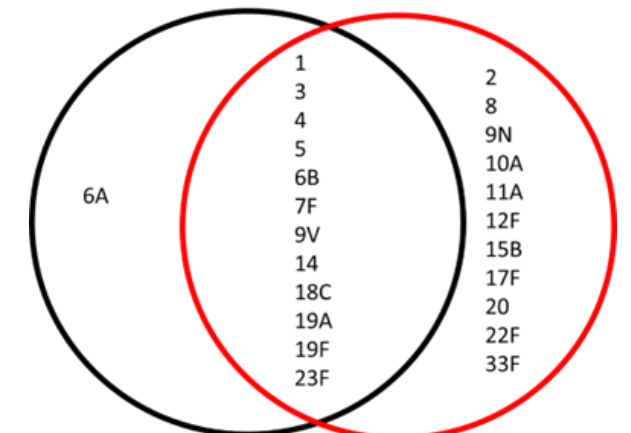
T-dépendante

T-indépendante

3-Réponse vaccinale

	Résultat	Unité	Intervalle de référence	Antériorité
Anticorps anti-pneumocoque (IgG), 23 sérotypes	28 J après			J 0
Sérotipe 1*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 2	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 3*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 4*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 5*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 6A (6)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 6B (26)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 7F (51)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 8	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 9N (9)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 9V (68)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 10A (34)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 11A (43)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 12F (12)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 14*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 15B (54)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 17F (17)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 18C (56)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 19A (57)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 19F (19)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 20	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 23F (23)*	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03
Sérotipe 33F (70)	↓ <0.03	µg/ml	>0.35	↓ <0.03

Prevenar 13 **Pneumovax 23**



T-dépendante

T-indépendante

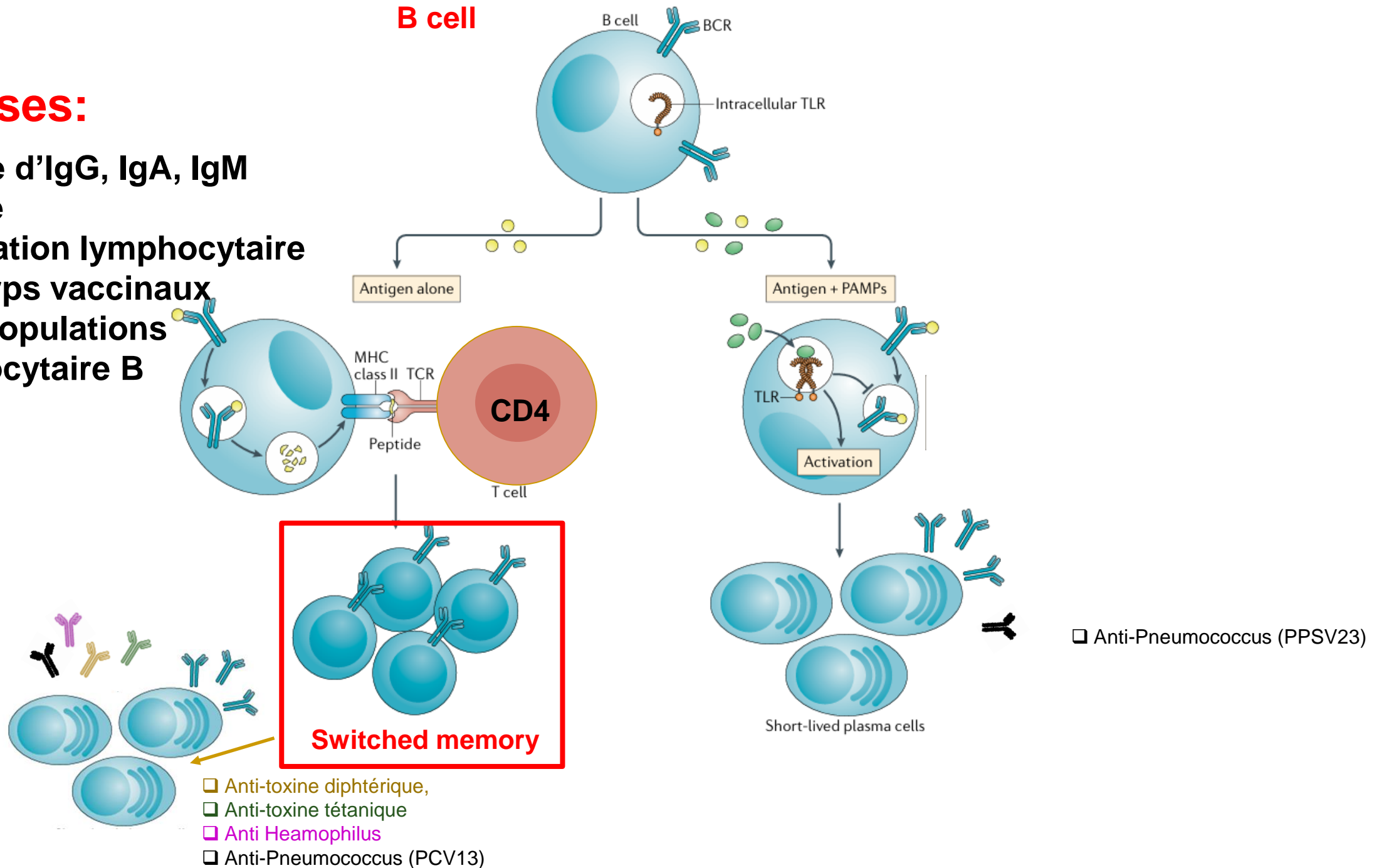
3-Réponse vaccinale

	Résultat	Unité	Intervalle de référence
Anticorps anti-tétanos (IgG)	↓ <0.05 <i>Taux inférieur à la limite de protection.</i>	UI/ml	> 0.10
Anticorps anti-diphtérie (IgG)	↓ <0.05 <i>Taux inférieur à la limite de protection.</i>	UI/ml	> 0.10
Anticorps anti-Haemophilus influenzae gr.B (IgG)	↓ <0.11 <i>Taux inférieur à la limite de protection.</i>	µg/ml	> 0.15

Déficit de réponse vaccinale

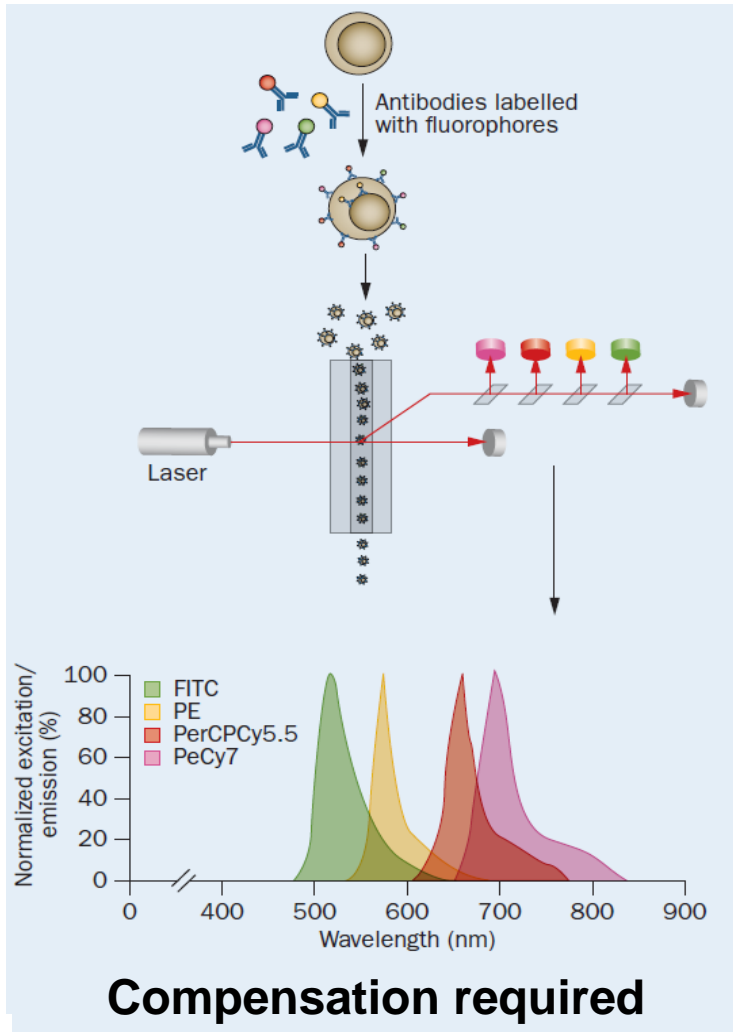
Analyses:

1. Dosage d'IgG, IgA, IgM sérique
2. Numération lymphocytaire
3. Anticorps vaccinaux
4. Sous-populations lymphocytaire B

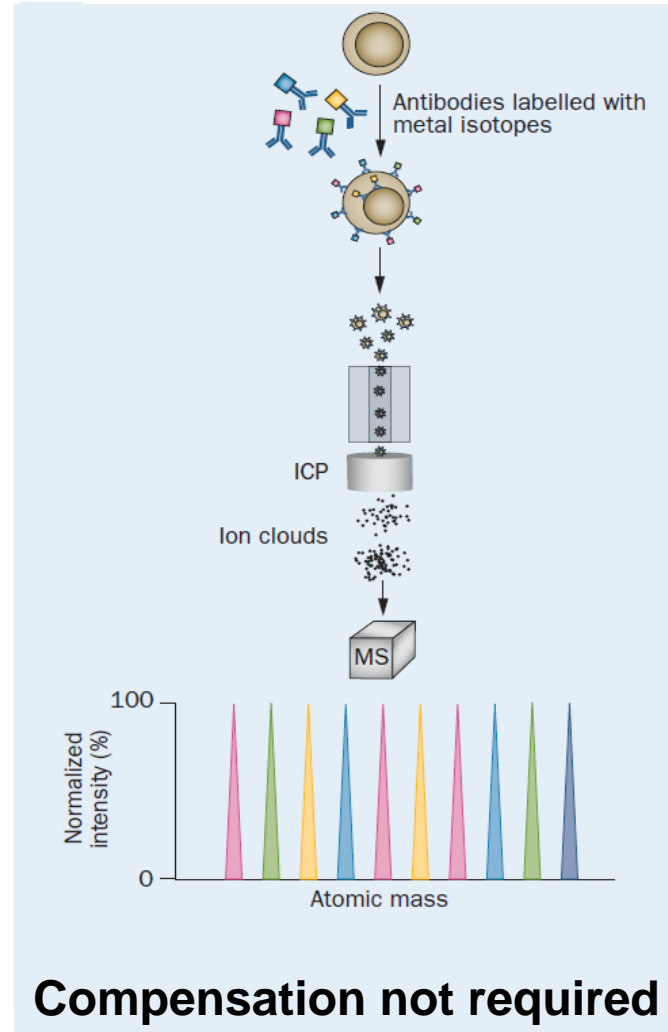


4- Cytométrie de masse (CyTOF)

Cytométrie de flux



Cytométrie de masse



- ❑ La cytométrie de masse partage certains principes de la cytométrie de flux.
- ❑ Cependant, à la place d'anticorps couplés à des fluorochromes, les anticorps utilisés par la cytométrie de masse sont couplés à des isotopes de métaux rares.
- ❑ Les cellules marquées avec ces anticorps sont nébulisées en gouttelettes qui sont introduites dans un spectromètre de masse couplé à un plasma inductif où chaque cellule est vaporisée dans un plasma d'argon à $>7000^{\circ}\text{C}$.
- ❑ Le nuage d'ions d'une cellule individuelle est ensuite soumis à une analyse élémentaire par temps de vol (TOF).

4-Cytométrie de masse avec 45 markers

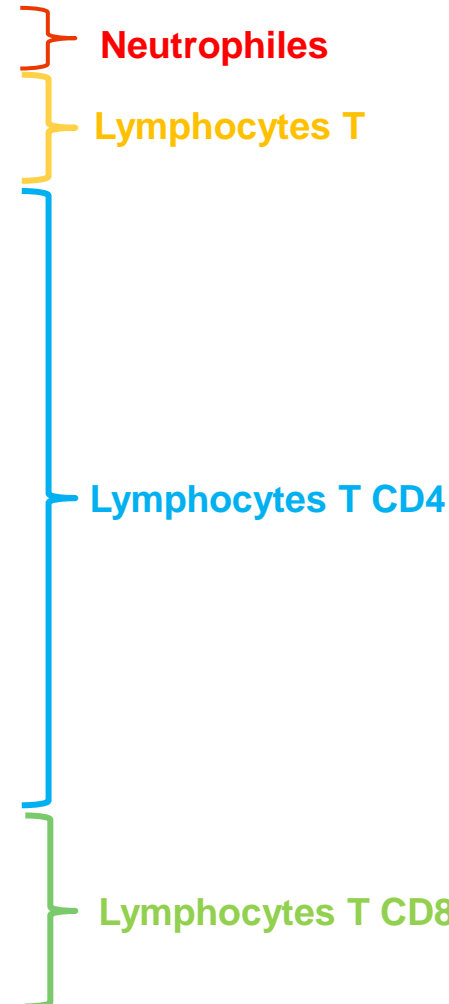
Technique: Cytométrie de masse



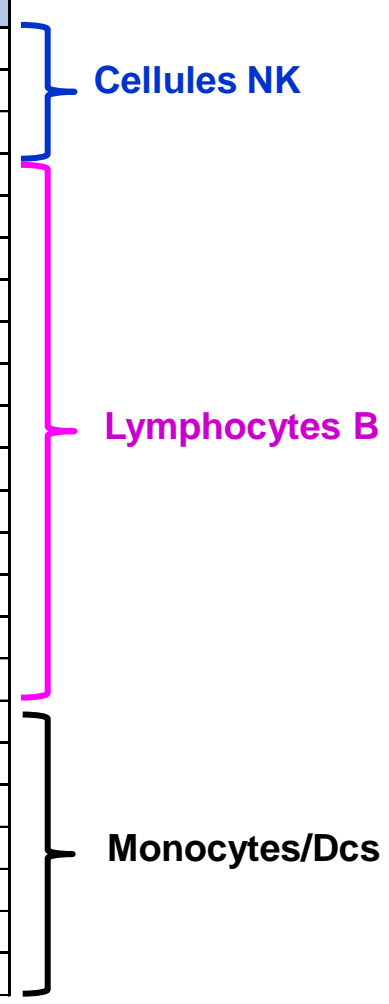
45 markers!!!

Cytométrie de masse

Marker
CD66b
CD3
TCR $\alpha\beta$
CD45
CD4
ICOS
CCR6
CD69
CD31
CD127
CD62L
CCR7
CXCR3
CXCR5
CD45RO
PD1
CCR4
CD27
CD25
CD8
CD45RO
CD45RA
TCRg_d

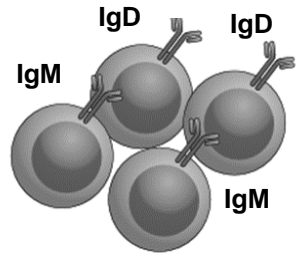


Marker
CD56
CD16
CD7
CD19
IgD
IgG1
IgG2
IgG3
IgA1
IgA2
CD21
CD10
CD24
CD38
CD20
IgM
CD14
CD1c
CD11c
HLADR
CD141
CD123
CD16



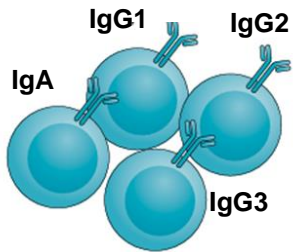
4-CyTOF: Sous-populations lymphocytaires B (subsets B)

Sous-populations cellulaires T, B, NK par Cytométrie de masse (CyTOF)



Tot
Naive

Lymphocytes B	156	cell/mm ³	80-490
Lymphocytes B CD27- IgD+	146	cell/mm ³	60-470
Lymphocytes B CD27- IgD+ IgM+	135	cell/mm ³	13-288



Switched memory

Lymphocytes B CD27+ IgD-	↓ 3	cell/mm ³	20-90
Lymphocytes B CD27+ IgD- IgG1+	↓ 0	cell/mm ³	3.2-40
Lymphocytes B CD27+ IgD- IgG2+	↓ 0	cell/mm ³	1.6-30
Lymphocytes B CD27+ IgD- IgG3+	↓ 0	cell/mm ³	0.5-8.4
Lymphocytes B CD27+ IgD- IgA1+	↓ 0	cell/mm ³	2.1-43
Lymphocytes B CD27+ IgD- IgA2+	↓ 0	cell/mm ³	1.2-18
Lymphocytes B CD21 ^{low} CD38 ^{low}	↑ 64	cell/mm ³	10-20
	↑ 33.5	% lympho B	1.6-10.0

Nombre normal de cellules B circulantes mais réduction marquée des cellules B mémoire switched.

5-Next Generation Sequencing (NGS) :

- ❑ Gène impliqué : **TNFRSF13B (TACI)**
- ❑ Variants hétérozygotes: c.310T>C et c.542C>A



2 variants sur le chr.17

TNFRSF13B:c.310T>C:p.Cys104Arg
TNFRSF13B:c.542C>A:p.Ala181Glu

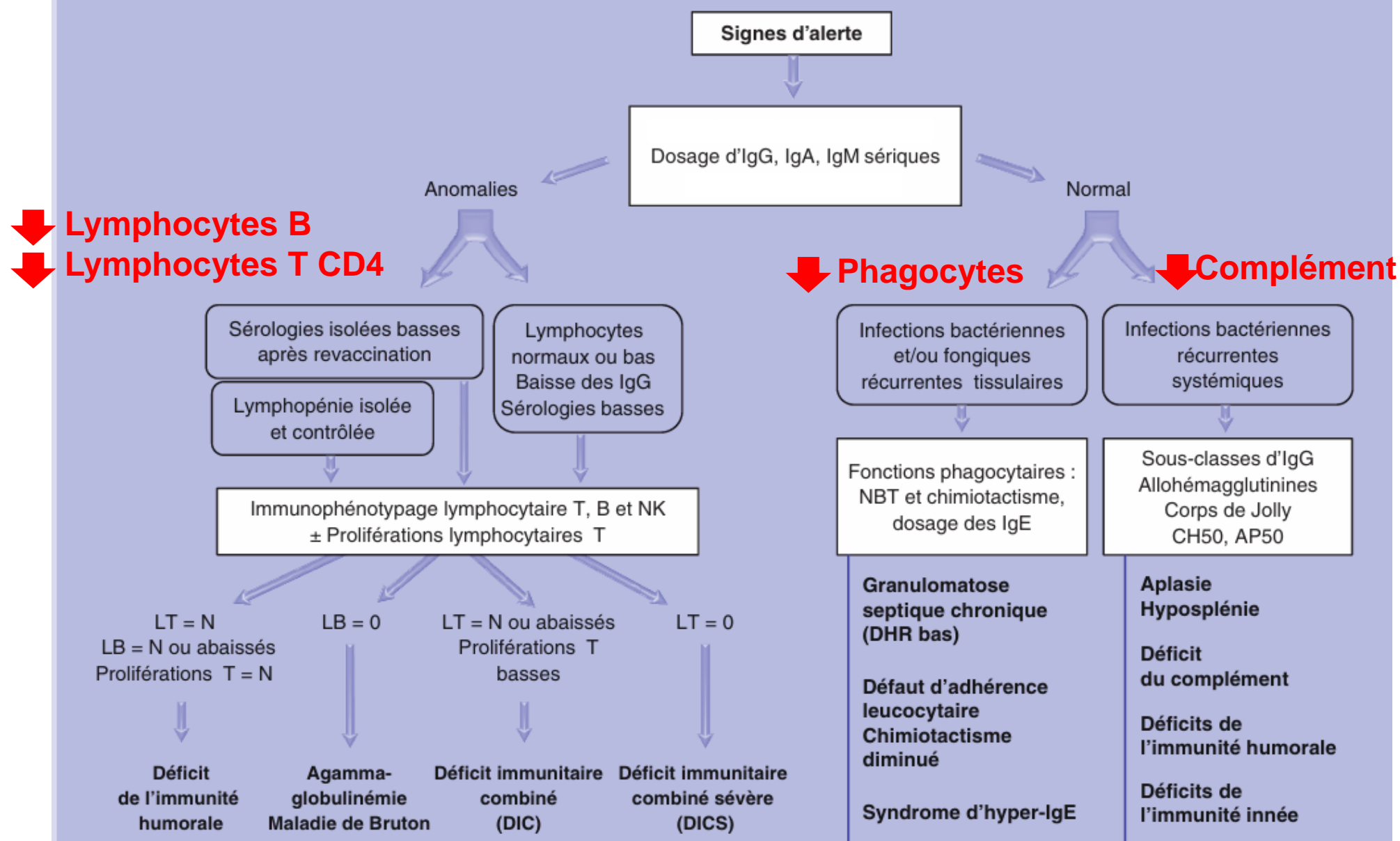
- ❑ TACI: Activateur transmembranaire, codé par le gène *TNFRSF13B*
- ❑ TACI est nécessaire pour class switch recombinaison IgA and IgG, la différenciation et survie des cellules plasmatisques
- ❑ Important pour l'homéostasie des cellules B périphérique
- ❑ **TACI est associé au Déficit Immunitaire Commun Variable (CVID)**

Diagnostic et Traitement

- ❑ **Diagnostic** : Déficit Immunitaire Commun Variable (CVID) avec déficit des immunoglobulines IgG et IgA, absence de réponse vaccinale, réduction des cellules B mémoire switched et mutation du gène TNFRSF13B (TACI).
- ❑ **Traitement substitutif par immunoglobulines intraveineuses (IVIg) ou sous-cutanées (SCIG)**
 - Prophylaxie antibiotique en cas d'infections récurrentes
 - Surveillance gastro-intestinale
 - Dépistage des maladies auto-immunes et des pathologies lymphoprolifératives
 - Éviter les vaccins vivants atténués (comme ROR, varicelle) en raison du risque de complications

Cas n.2:

- ❑ **Patient** : 4 ans
- ❑ **Symptômes**: Infections bactériennes et fongiques récurrentes, infections à **Staphylococcus aureus** et **Candida albicans**.
- ❑ **Infections spécifiques**: Pneumonies récurrentes, abcès cutanés multiples, infections fongiques systémiques.



LB, lymphocytes B ; LT, lymphocytes T ; NK, Natural Killer ; N, normal ; NBT, test de réduction au nitrobleu de tétrazolium ; Ig, immunoglobuline.
(D'après : Picard C. La Revue du Praticien 2007 ; 57.)

Résultats

IMMUNOGLOBULINES

	Résultat	Unité	Intervalle de référence
IgG	12.49	g/l	6.10-16.16
IgA	3.89	g/L	0.85-4.99
IgM	0.65	g/l	0.35-2.42

FACTEURS DU COMPLEMENT

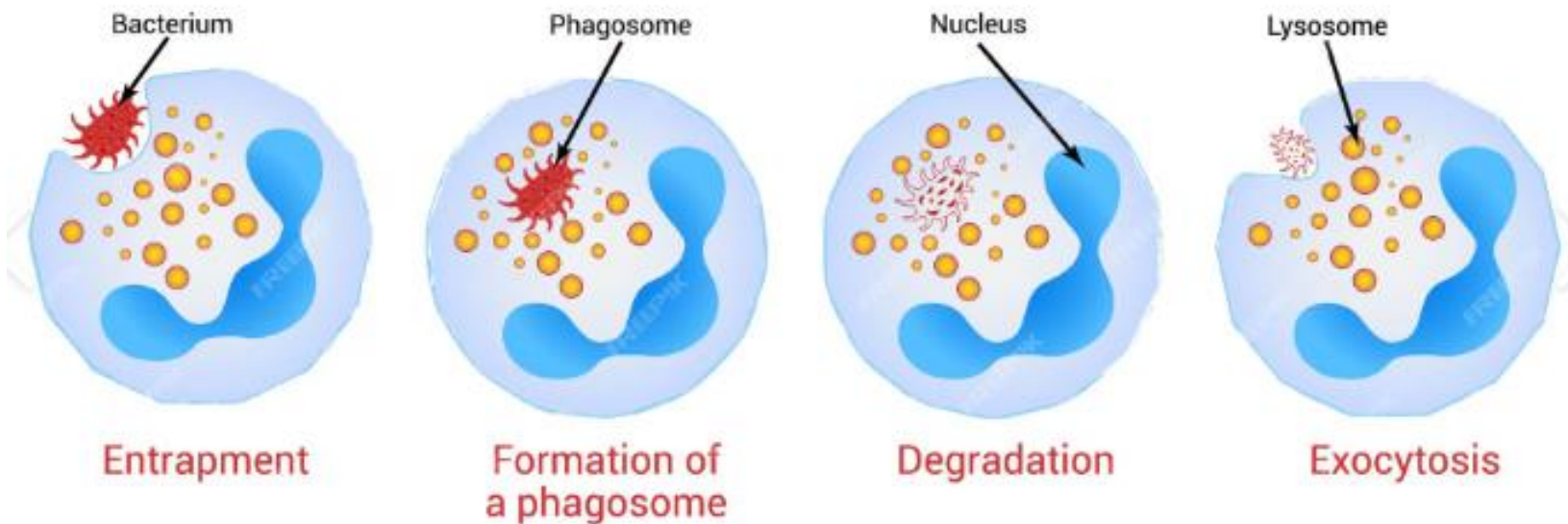
	Résultat	Unité	Intervalle de référence
C3c	0.87	g/L	0.81-1.57
C4	0.25	g/L	0.13-0.39
CH-50 (Classical pathway)	94	%	70-140
AP50 (Alternativ pathway)	97	%	> 71
MBL (Lectin pathway)	112	%	> 49

Test
fonctionnels

Hémogramme

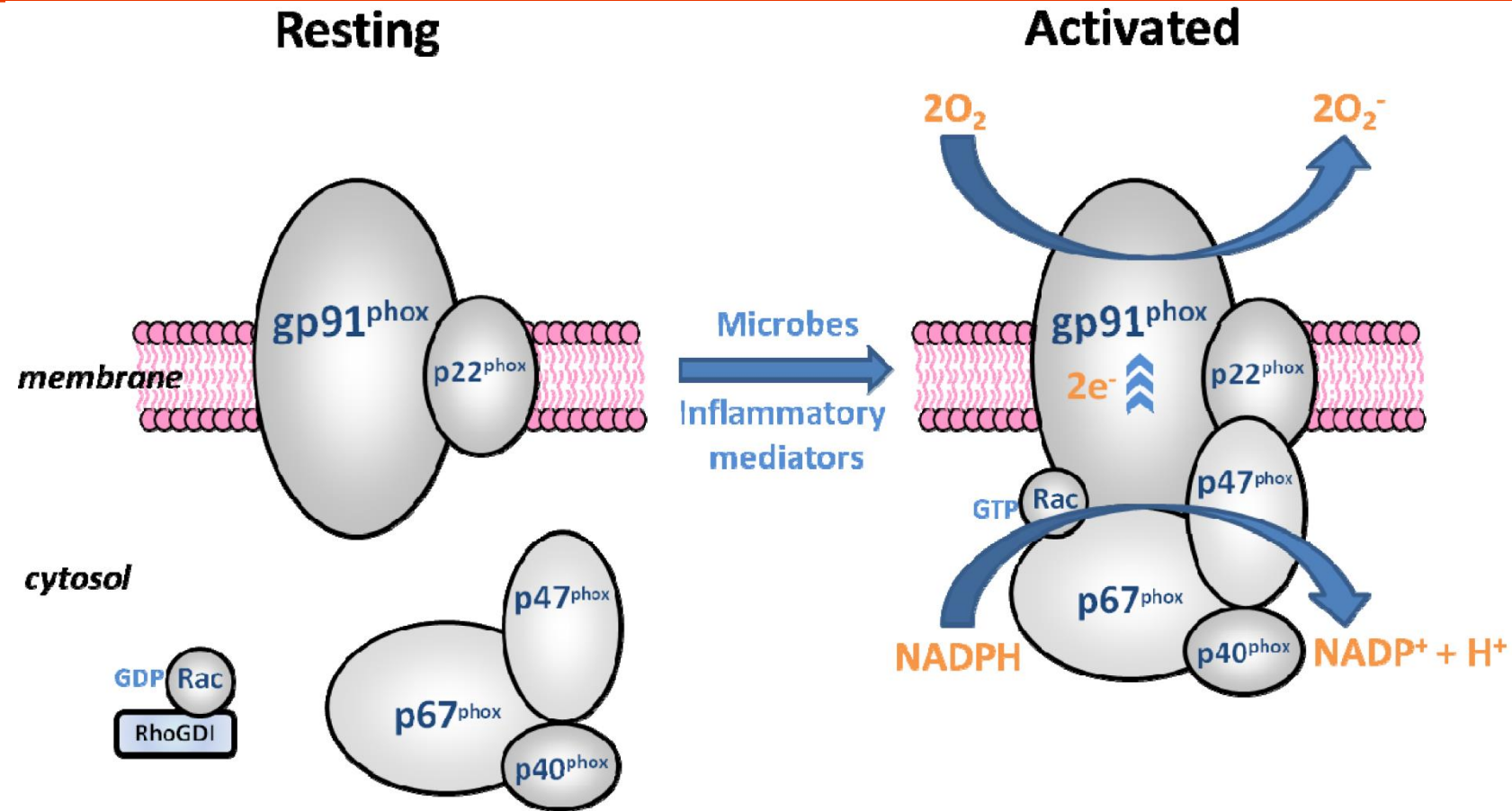
Valeurs absolues	Résultat	Unité	Intervalle de référence
Neutrophiles abs.	1.93	G/l	1.8-7.5

Les phagocytes ont une action microbicide



- Les phagocytes reconnaissent et adhèrent aux agents **pathogènes** via des **récepteurs spécifiques**, comme les récepteurs Toll-like.
- La **membrane cellulaire du phagocyte** entoure la particule étrangère, formant une vésicule appelée **phagosome**.
- Le **phagosome fusionne** avec des **lysosomes** pour former un **phagolysosome**, où des enzymes digestives dégradent le pathogène.
- Une enzyme **NAPDH** a une action **microbicide**

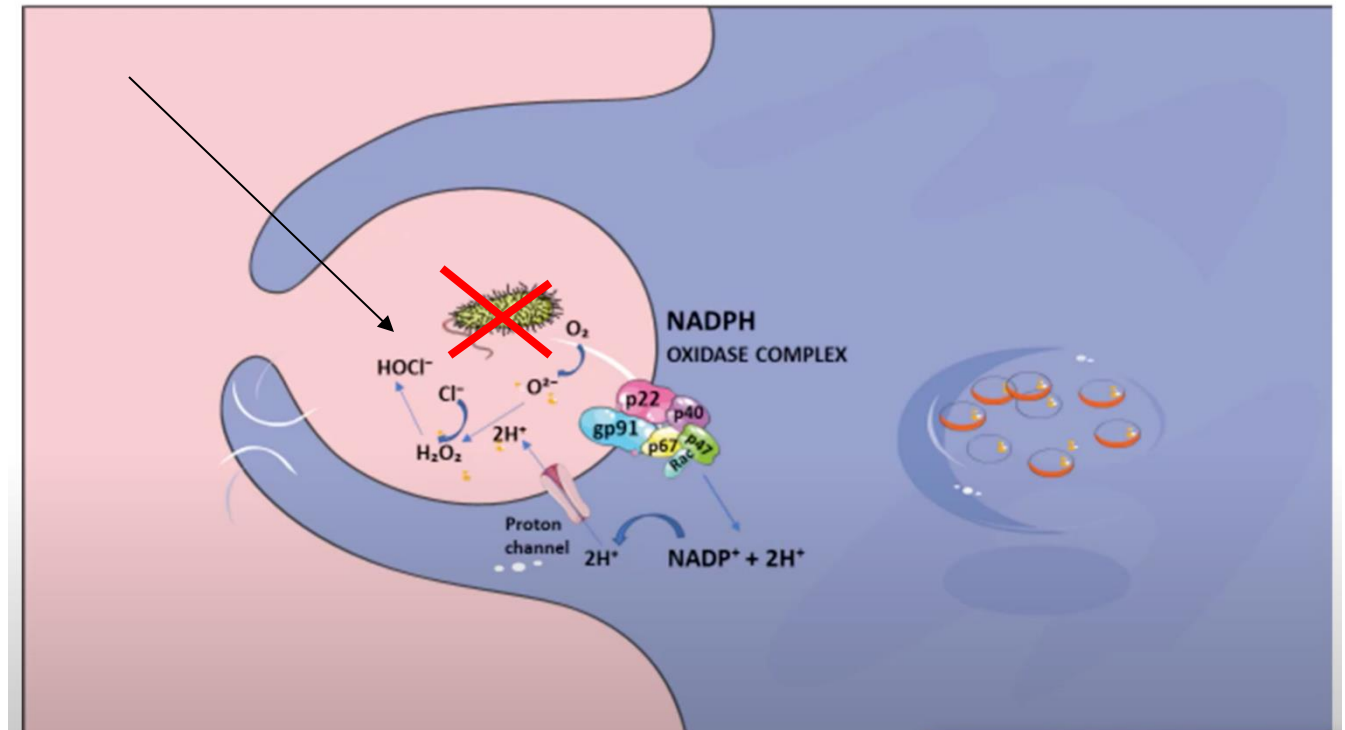
NAPDH oxidase a une action microbicide



Le complexe NADPH oxydase contient cinq sous-unités protéiques :

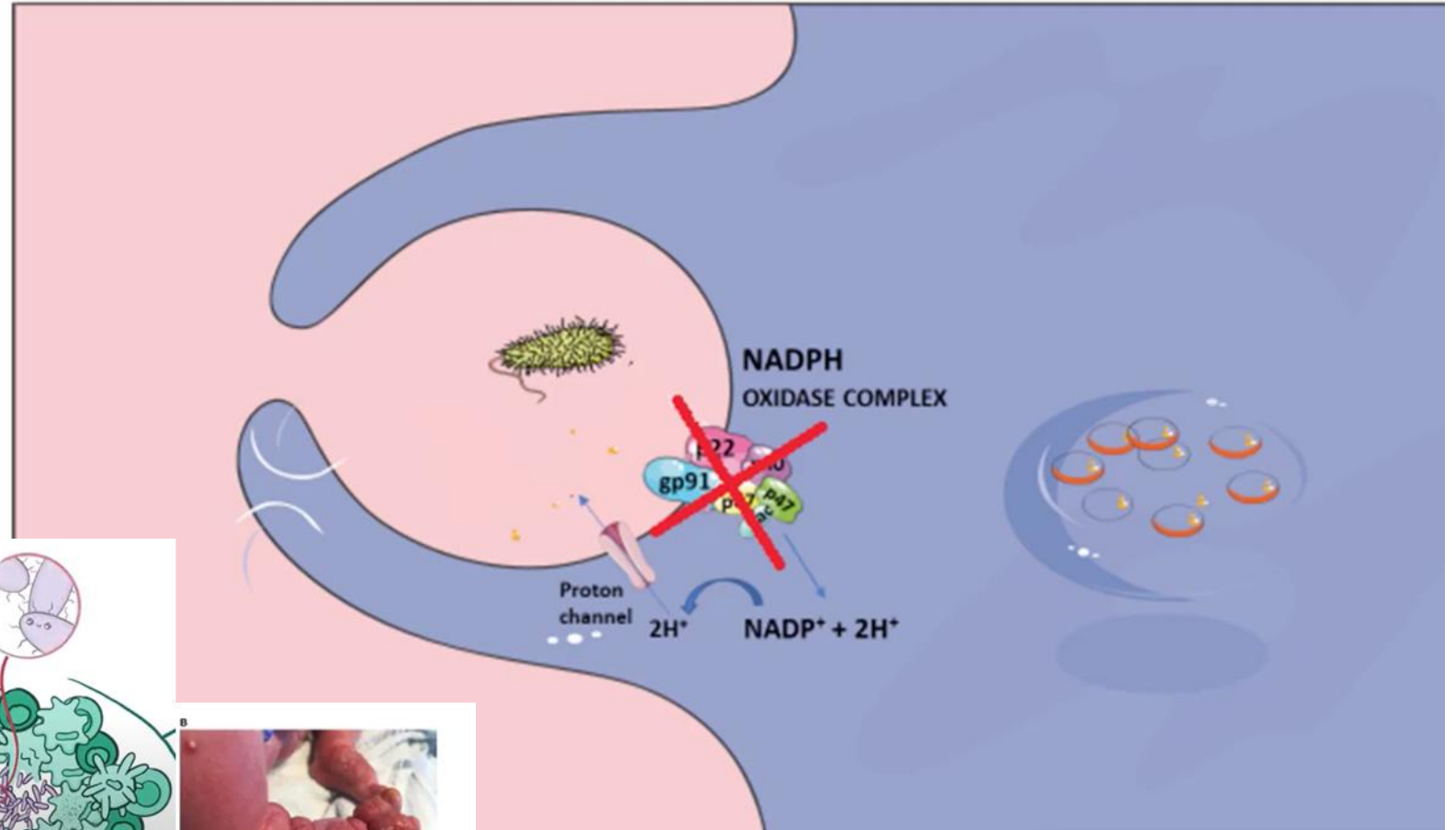
Voie d'activation normale

- In normal neutrophils upon activation dans les neutrophiles normaux, la production **Reactive oxygen species (ROS)** dans les phagosomes est nécessaire à l'activité microbicide et est médiée par le complexe multiprotéique NADPH oxydase.
- **ROS** are highly reactive chemicals formed from O_2 . ROS include:
 - Peroxides (R-O-O-R)
 - Superoxide (O_2^-)
 - Hydroxyl radical(OH)
 - Singlet oxygen ($O=O$)
 - Alpha oxigen (αO)

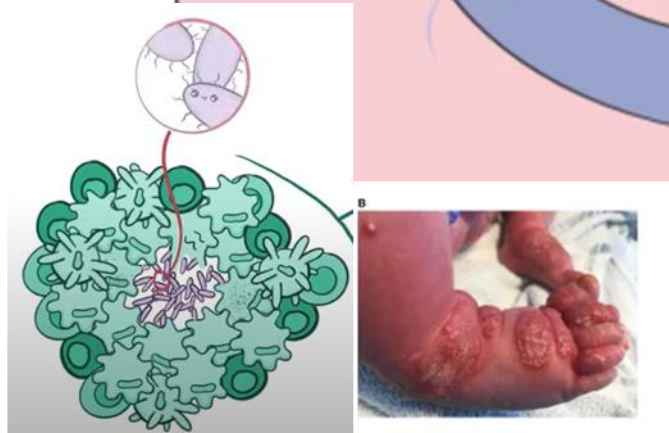


Voie d'activation pathologique

- Des mutations dans l'une des protéines du complexe NADPH oxydase empêchent la production de ROS et la suppression des bactéries.



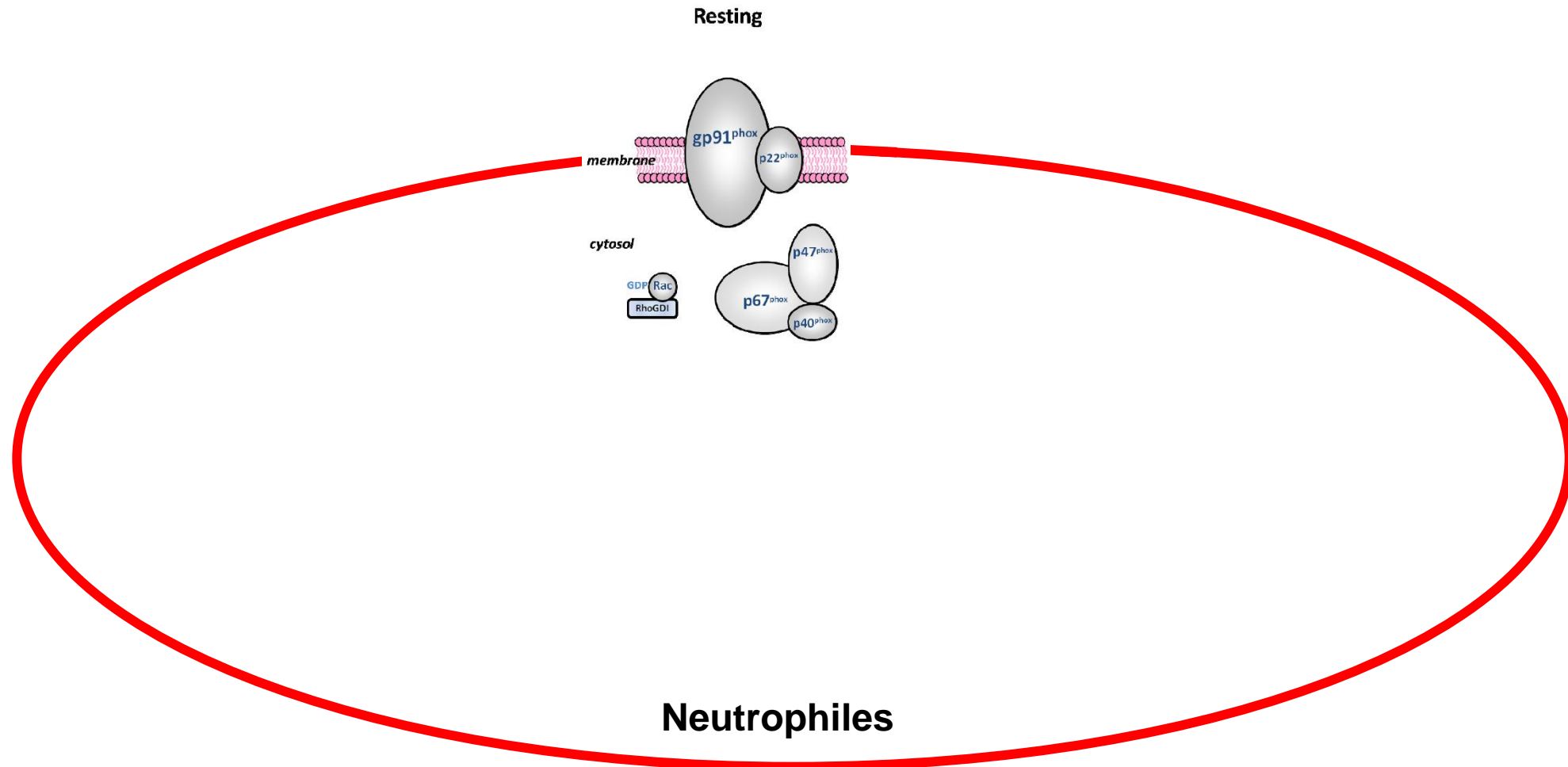
Granuloma: Ensemble de cellules immunitaires qui se rassemblent lorsqu'elles ne sont pas capables d'éliminer les pathogènes.



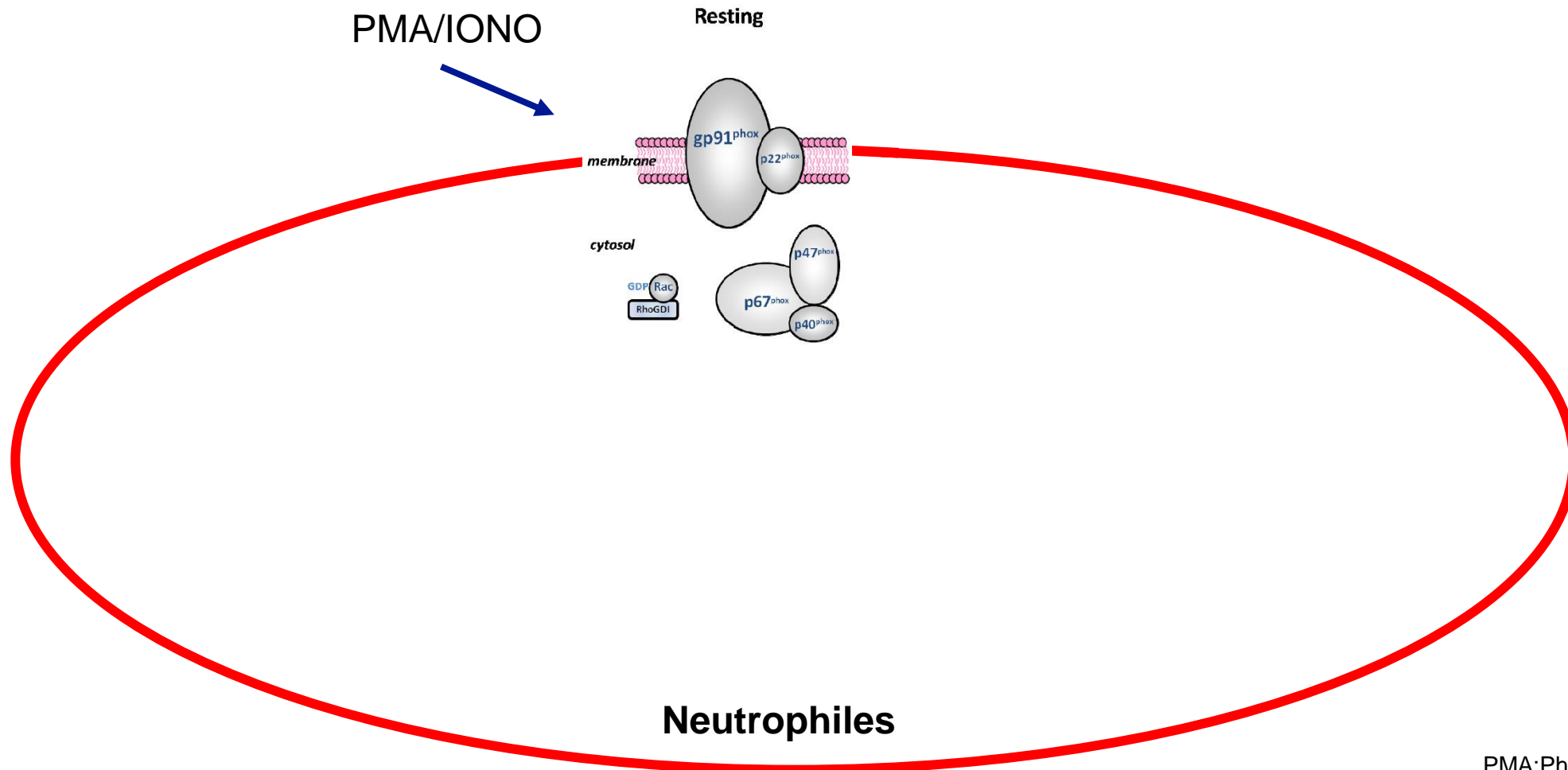
Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) test

- ❑ Le test DHR mesure la capacité des neutrophiles à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en réponse à une stimulation.

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay

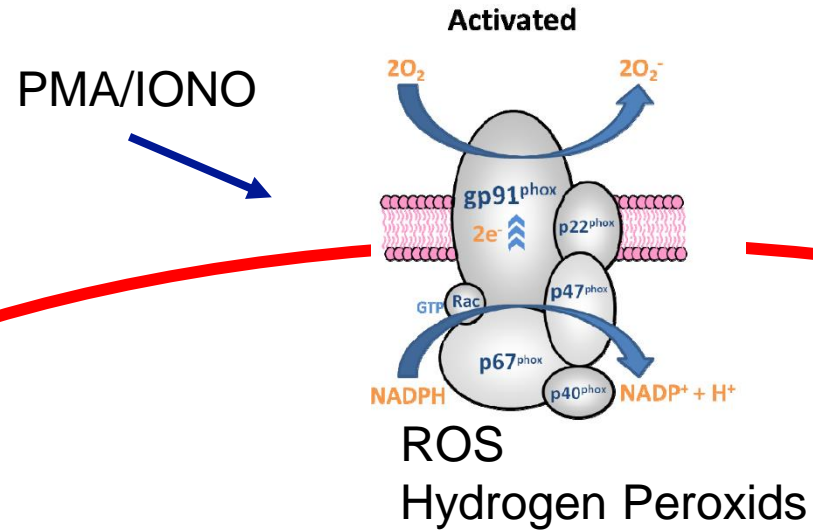


Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay



PMA: Phorbol Myristate Acetate
IONO: ionomycin.

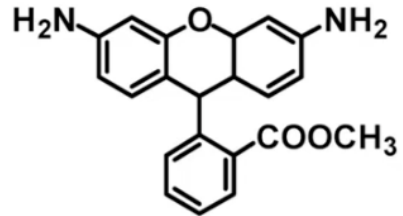
Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay



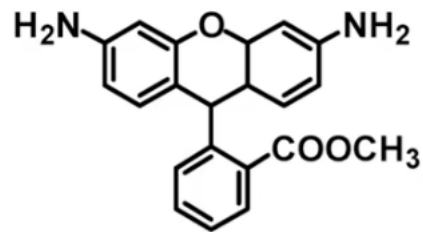
Neutrophils

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay

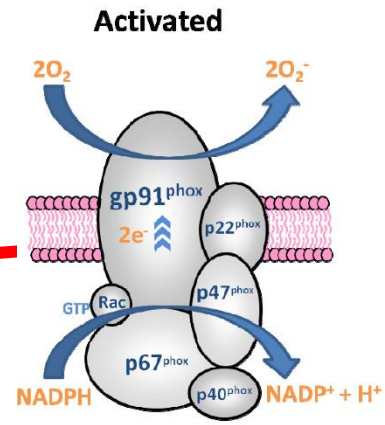
□ DHR entre spontanément dans les cellules.



Dihydrorhodamine 123 (DHR)



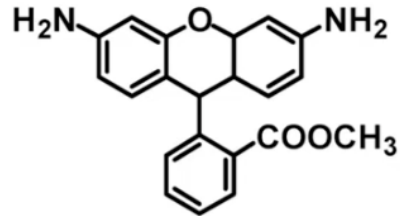
Dihydrorhodamine 123 (DHR)



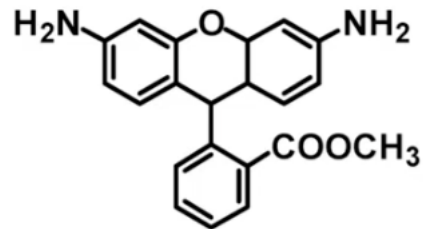
ROS
Hydrogen Peroxids

Neutrophiles

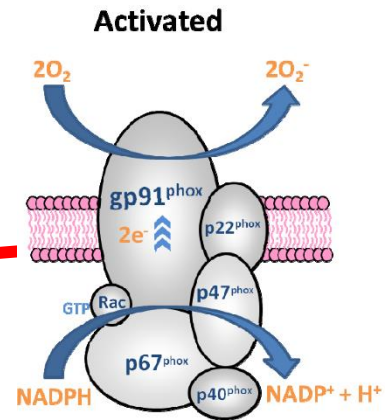
Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay



Dihydrorhodamine 123 (DHR)



Dihydrorhodamine 123 (DHR)

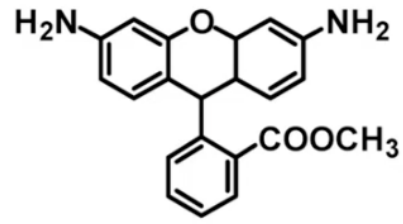


ROS
Hydrogen Peroxids

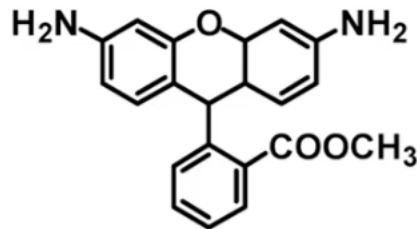
- ❑ DHR entre spontanément dans les cellules.
- ❑ Suite au contact avec les ROS, DHR est oxydé en rhodamine 123.

Neutrophiles

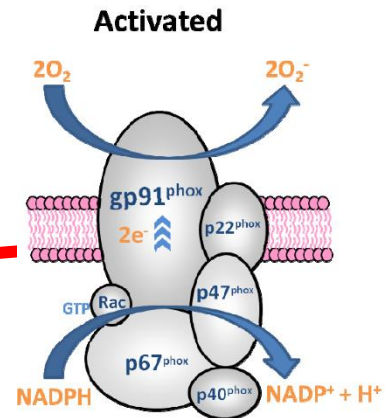
Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay



Dihydrorhodamine 123 (DHR)

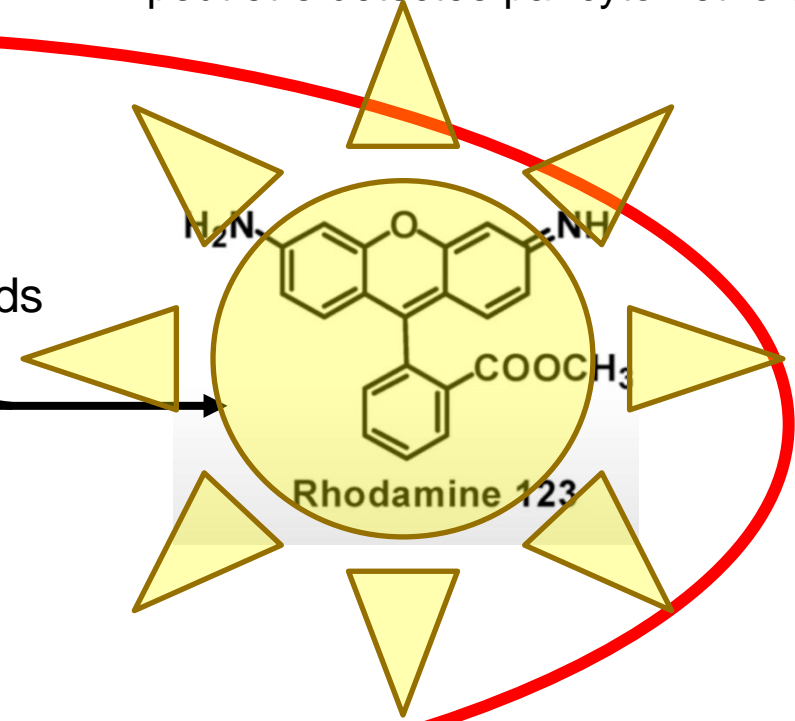


Dihydrorhodamine 123 (DHR)



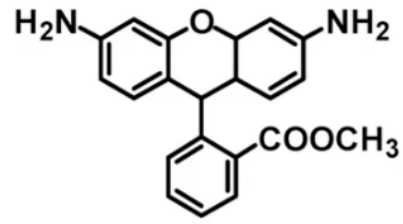
ROS
Hydrogen Peroxids

- ❑ DHR entre spontanément dans les cellules.
- ❑ Suite au contact avec les ROS, DHR est oxydé en rhodamine 123.
- ❑ La rhodamine 123 est fluorescente et sa présence peut être détectée par cytométrie en flux.



Neutrophiles

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay

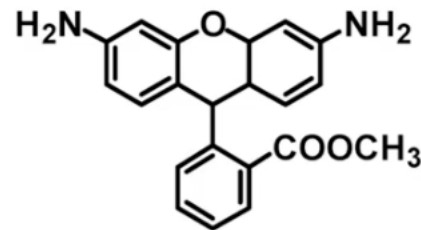


Dihydrorhodamine 123 (DHR)

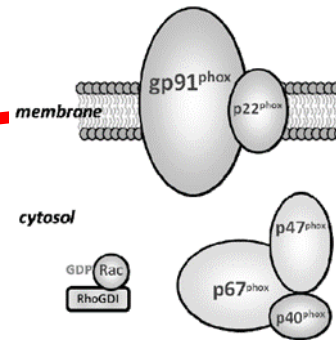
PMA/IONO

MUTATED NADPH
OXIDASE COMPLEX

- En l'absence d'un complexe NADPH fonctionnel
- DHR n'est pas converti en rhodamine 123.
- la fluorescence n'est pas détectée.

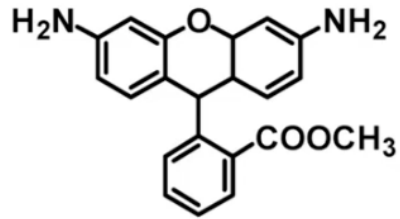


Dihydrorhodamine 123 (DHR)

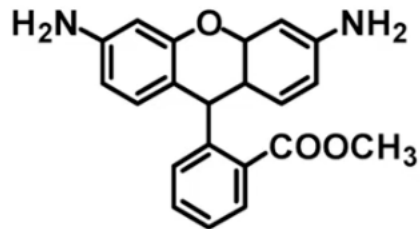


Neutrophiles

Dihydrorhodamine 123 (DHR 123) assay



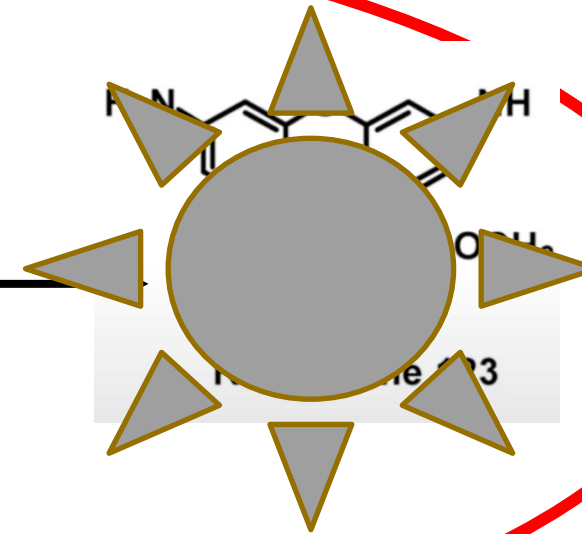
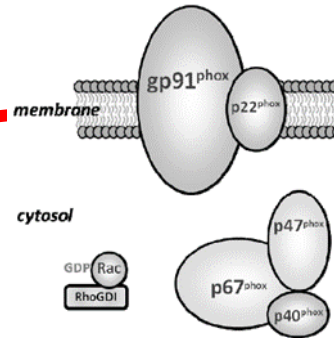
Dihydrorhodamine 123 (DHR)



Dihydrorhodamine 123 (DHR)

MUTATED NADPH
OXIDASE COMPLEX

- En l'absence d'un complexe NADPH fonctionnel
- DHR n'est pas converti en rhodamine 123.
- la fluorescence n'est pas détectée.

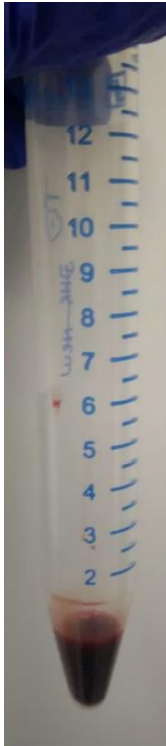


Neutrophiles

Sample preparation

Blood

Lysis solution



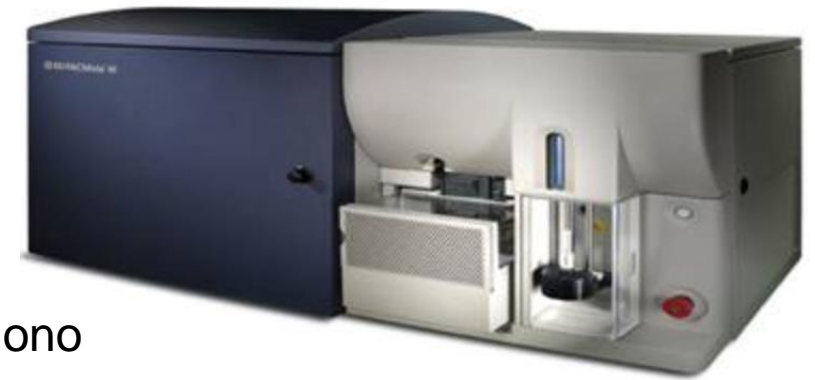
+ DHR 123



Unstimulated cells

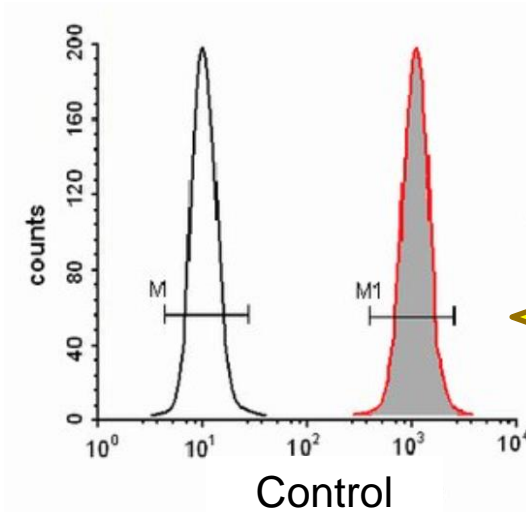
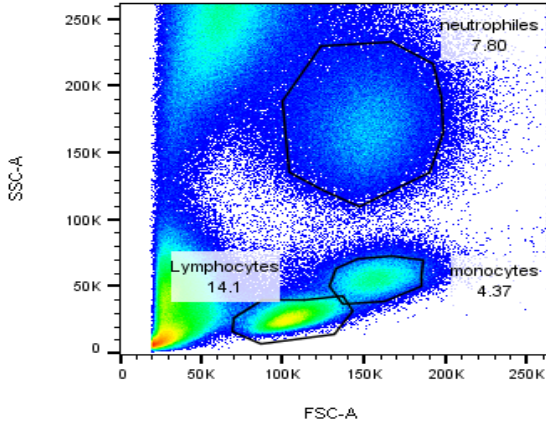
Stimulated with +PMA/iono

Facs Analysis

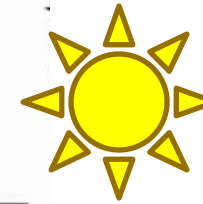


Results I: example of a patient with a complete deficit to produce ROS

Control

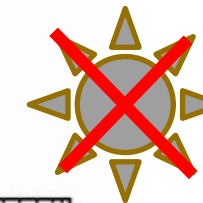
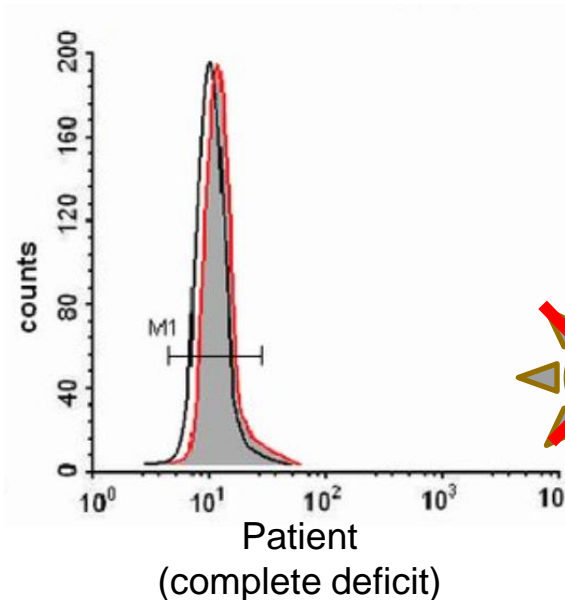
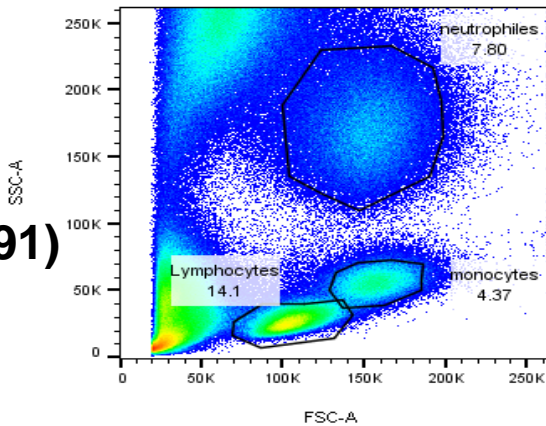


Unstimulated cells
Stimulated cells



Production of ROS

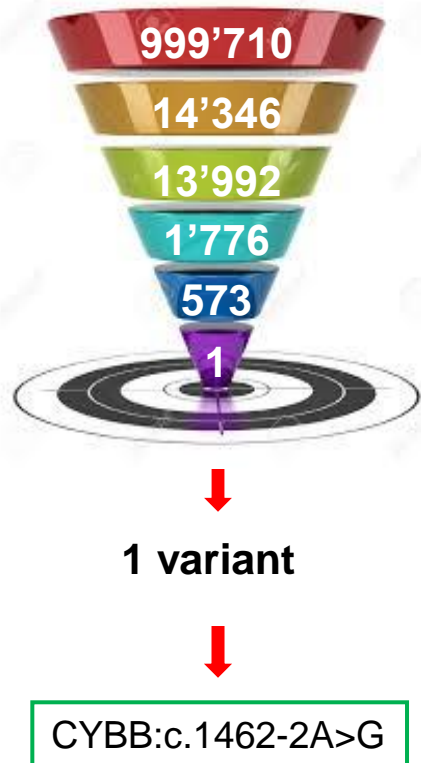
Patient
(complete deficit gp91)



No Production of
ROS

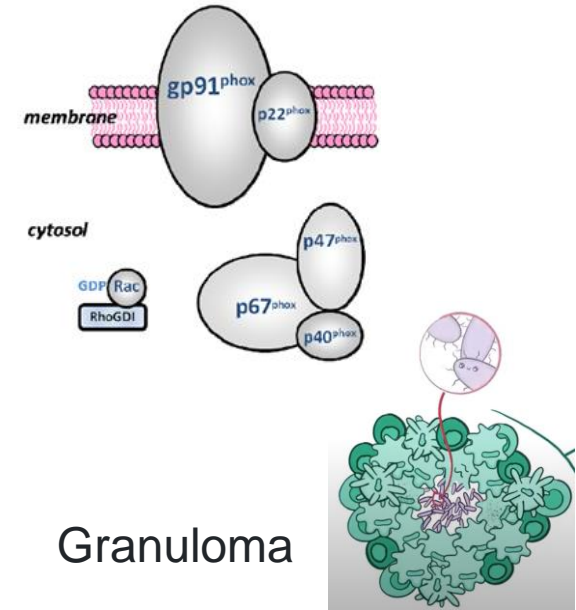
5-Next Generation Sequencing (NGS) :

1. Gène impliqué : **CYBB** (gp91phox)
2. Variants hétérozygotes: c.1462-2A>G
3. Pathogénicité : Variant associé au CGD



- ❑ CYBB fonction: primary component of the microbial oxidase system of phagocytosis
- ❑ Disease associated with CYBB includes X-linked chronic granulomatous disease

Diagnostic: Granulomatose septique chronique (GCD)



Granuloma

Figure 1



- **CGD** avec **déficit total d'activation des neutrophiles** et **absence de gp91** de la phagocyte NADPH oxydase.
- La CGD est causée par des défauts dans les **sous-unités protéiques de l'enzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase**
- Se caractérise par une **susceptibilité accrue aux infections bactériennes** (incluant *Staphylococcus aureus* et *Aspergillus spp*) **et fongiques** sévères et récurrentes
- Développement de granulomes, situées principalement au niveau des poumons, des ganglions lymphatiques, des voies gastro-intestinales et du foie.
 - Granuloma:** Ensemble de cellules immunitaires qui se rassemblent lorsqu'elles ne sont pas capables d'éliminer les pathogènes.
- La **gravité dépend également du niveau de fonctionnement de l'enzyme NADPH oxydase** :
 - **un niveau de fonctionnement > de 5 % est suffisant** pour survivre et combattre les agents pathogènes ;
 - **un niveau de 1 à 3 %** du potentiel fonctionnel présente des **tableaux graves** qui nécessitent un traitement.

Plan de traitement :

➤ **Traitement et suivi :**

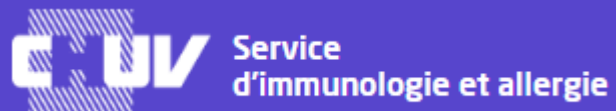
- Antibiotiques prophylactiques** à long terme pour prévenir les infections.
- Interféron-gamma** pour stimuler l'activité des phagocytes.
- Greffe de cellules souches hématopoïétiques** peut être envisagée

- Au CHUV, chez les patients ayant des résultats pathologiques aux tests de dépistage pour la recherche d'IDP, **la confirmation par NGS** n'est retrouvée que dans **25-30% des cas.**

Conclusions

- ❑ La **détection précoce** grâce aux tests de dépistage et aux technologies avancées permet d'optimiser **la prise en charge des patients**
- ❑ **NGS n'est pas le test de première intention**, sauf dans les cas familiaux
- ❑ **L'algorithme repose sur des tests décisionnels simples** (Ig, présence de lymphocytes et/ou fonction)
- ❑ La phase **pré-analytique** est extrêmement **importante** (risque de faux positifs ou négatifs).

Remerciements



Service de médecine génétique
Chuv

Lucia Bartoloni



Gonzalo Tapia



Rachel Mamin



Emmanuelle
Medjitna



Nathalie Felix

Nadine Do Rosario



Dr Craig Fenwick



Dre Orbicia Riccio



Prof. Fabio Candotti



Prof. Matthieu Perreau



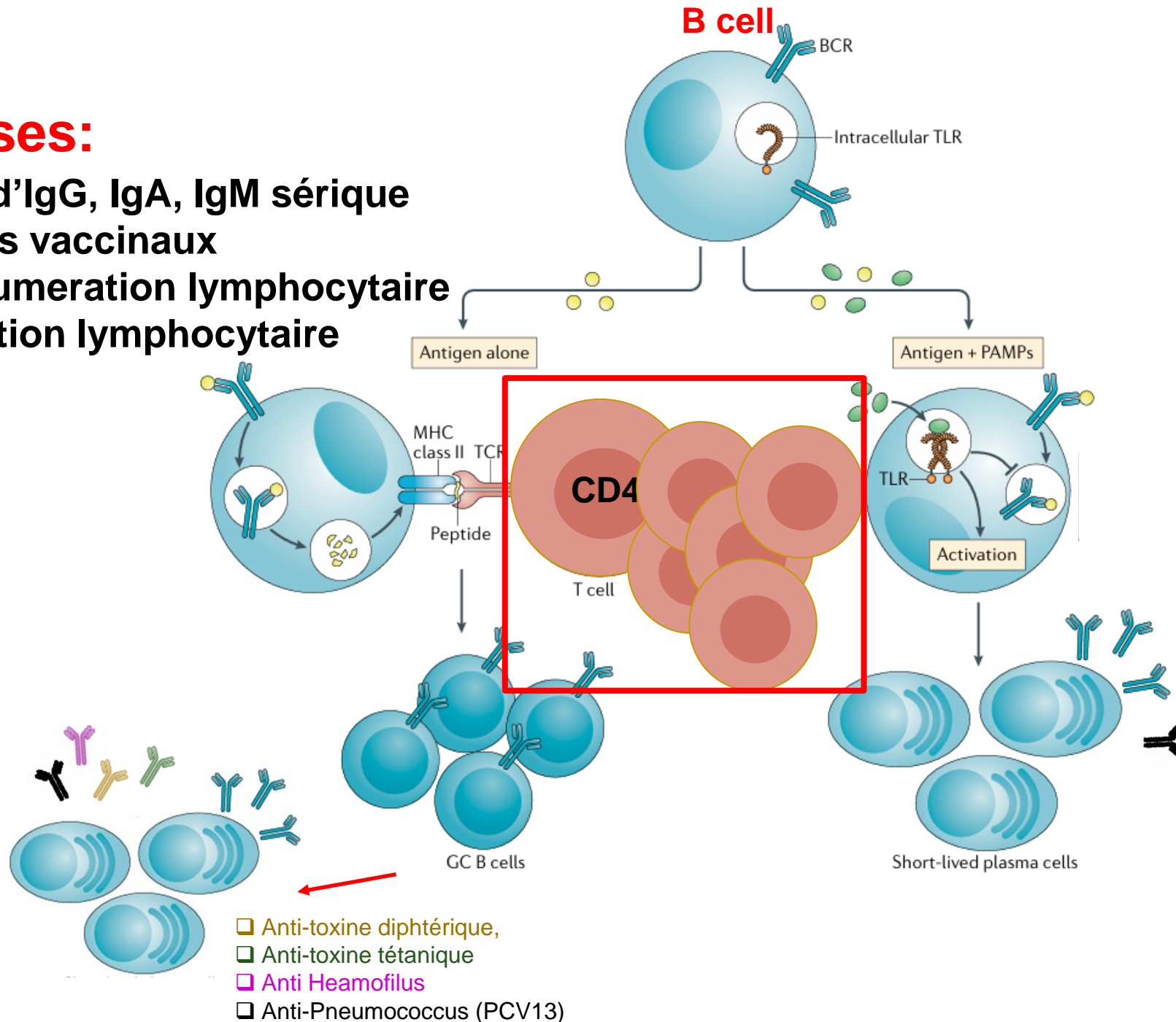
Prof. Giuseppe Pantaleo

Merci pour votre attention!



Analyses:

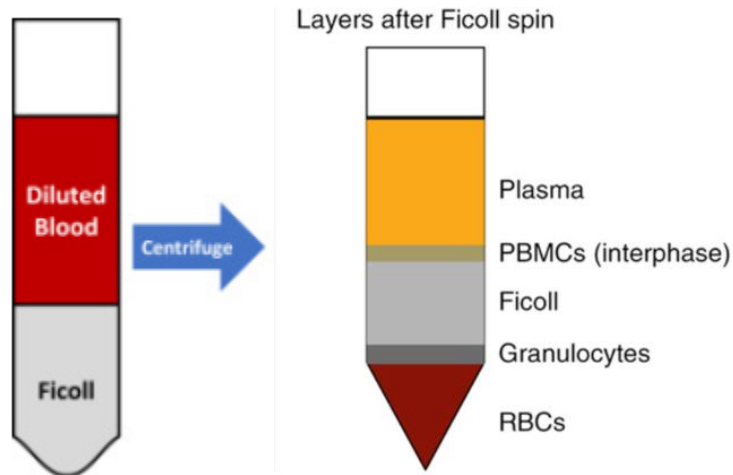
- ❖ Dosage d'IgG, IgA, IgM sérique
- ❖ Anticorps vaccinaux
- ❖ Cytof: Numeration lymphocytaire
- ❖ Prolifération lymphocytaire



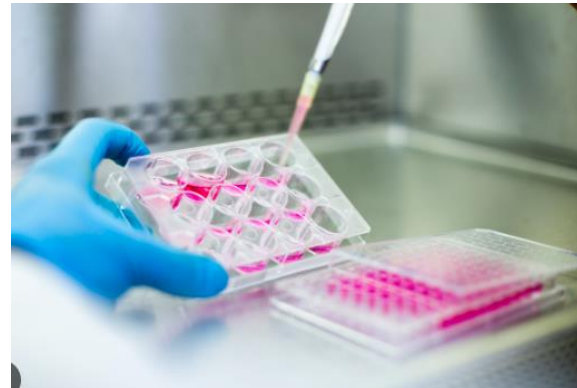
□ Anti-Pneumococcus (PPSV23)

4-Prolifération lymphocytaire

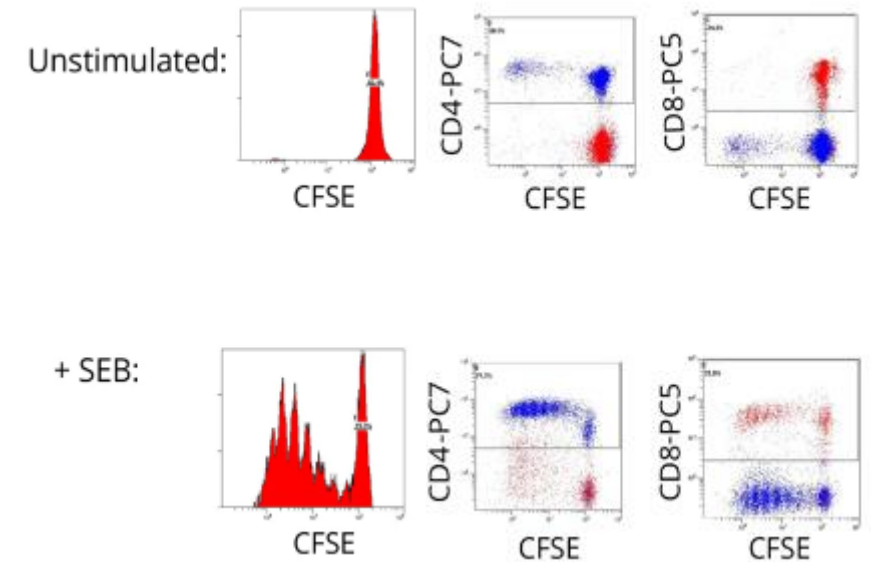
1. Ficoll



2. Cell culture





3. Flow Cytometry



- ❑ Stimulation lymphocytaire en présence de mitogènes et/ou d'antigènes spécifiques sur 6 jours.
- ❑ Mesure de la prolifération de cellules lymphocytaires T CD4+ et CD8+
- ❑ marquage CFSE [5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl]. Lecture au cytofluorimètre.

4-Prolifération lymphocytaire

-  OKT3 : Réponse normale
-  PHA (phytohémmagglutinine) : Réponse normale
- Toxine tétanique : Réponse absente

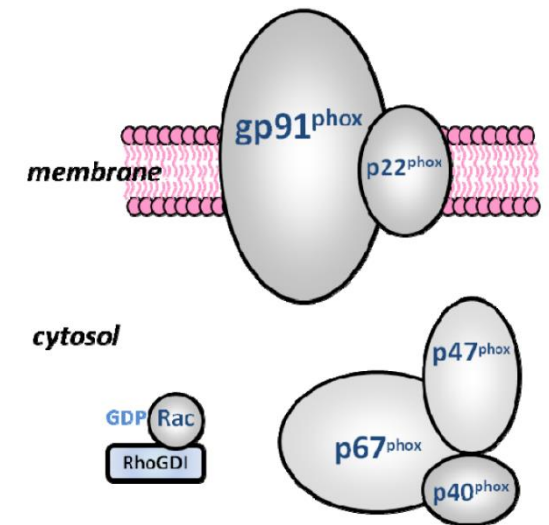
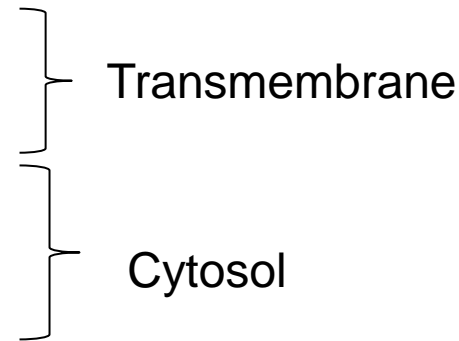
Fonction des cellules T normale

CGD est causée par des défauts dans le NADPH

La CGD est causée par des défauts dans les **sous-unités protéiques de l'enzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase** qui empêche la production de superoxyde (ROS) par les phagocytes (neutrophiles, monocytes et macrophages), nécessaire à l'activité microbicide.

Le complexe NADPH oxydase contient cinq sous-unités protéiques :

- ❖ gp91phox encode par CYBB gene
- ❖ p22phox encode par CYBA gene
- ❖ p47phox encode par NCF1 gene
- ❖ p67phox encode par NCF2 gene
- ❖ p40phox encode par NCF4 gene



- Les variantes du gène gp91phox /CYBB (liées à l'X) représentent environ 70 % de tous les cas de CGD.
- Les CGD autosomiques récessives (environ 30 %) sont causées par des variantes pathogènes dans d'autres gènes.

Classical Pathway	Lectin (MBL) Pathway	Alternative Pathway	Possible deficiency
Normal	Normal	Normal	NONE
Reduced ↓	Normal	Normal	C1q, C1r, C1s
Normal	Normal	Reduced ↓	Properdin, Factor B, Factor D
Normal	Reduced ↓	Normal	MBL, MASP2
Reduced ↓	Reduced ↓	Reduced ↓	C3, C5, C6, C7, C8, C9, Factor H*, Factor I*
Reduced ↓	Reduced ↓	Normal	C4, C2

**Deficiency of Factor H and/or Factor I cause consumption of C3, i.e. secondary C3-deficiency and thereby reduced pathway activity.*