

# Le test de transformation lymphocytaire (TTL)

## ou test de prolifération lymphocytaire (TPL)

*Le compte rendu de la Conférence internationale de la recherche sur le béryllium (cf. pp. 347-356 de ce même numéro), qui a eu lieu en mars 2005 à Montréal, fait référence à plusieurs reprises au test de transformation lymphocytaire. Ce test est effectivement utilisé pour le diagnostic de sensibilisation à plusieurs métaux dont le béryllium. La rédaction de Documents pour le Médecin du Travail a donc souhaité qu'un article sur ce test et ses applications paraisse dans ce numéro de la revue.*

### Définition du TTL ou TPL

Le test de transformation lymphocytaire (TTL) ou test de prolifération lymphocytaire (TPL) est un test biologique qui explore une hypersensibilité de type retardée (type IV de la classification de Gell et Coombs, voir *encadré 1*), c'est-à-dire médiée par les lymphocytes T mémoires. Cette hypersensibilité retardée résulte de mécanismes de réactivité cellulaire responsables de

l'inflammation (*figure 1*), sans mise en jeu d'anticorps circulants. La molécule sensibilisatrice (allergène ou antigène) liée à une protéine porteuse est absorbée par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) ou cellule de Langerhans puis présentée par celles-ci aux lymphocytes Th1 qui induisent l'hypersensibilité retardée par activation lymphocytaire, macrophagique et par production de cytokines permettant le recrutement cellulaire. Dès les années 1970, ce test a été utilisé dans le diagnostic d'allergie induite par les médicaments [1] et reste aujourd'hui le test de référence [2].

J.C. DUCHÉ, J. BARRÉ \*

(\*) Unité Fonctionnelle de Pharmacologie-Toxicologie, Centre hospitalier intercommunal de Créteil.

### Classification de Gell et Coombs

La classification de Gell et Coombs consiste en une catégorisation des modes de réponses d'hypersensibilité de l'organisme. Cette classification distingue quatre types d'hypersensibilité (type I, II, III et IV).

#### 1/ Hypersensibilité de type I

Ce type d'hypersensibilité regroupe l'ensemble des phénomènes d'anaphylaxie décrits par Richet et Portier (1902). Elles regroupent les maladies dites « atopiques » (Coca et Cooke 1923) : ces dernières sont définies par Bach (1993) comme « l'association de manifestations cliniques d'hypersensibilité et de la production excessive d'IgE ». En fait la synthèse d'IgE est déterminée en partie génétiquement (par un contrôle non spécifique d'antigènes dans le modèle mendélien et par un contrôle génétique spécifique d'antigène lié au HLA/CMH) mais les environnements anté-, pré- et post-nataux jouent un rôle tout aussi important. Les formes cliniques sont variables : urticaire, érythème maculo-papuleux, rash, œdèmes, rhinites, conjonctivites, asthme... Les formes les plus graves étant le choc anaphylactique et l'œdème de Quincke.

#### 2/ Hypersensibilité de type II

Encore appelée allo-immunisation, voire immunité cytotoxique, elle est la conséquence de l'introduction dans l'organisme d'un des alloantigènes érythrocytaire, leuco-

cytaire ou sérique. Ce type d'hypersensibilité se retrouve notamment dans trois situations : grossesse (maladie hémolytique du nouveau né), transfusions sanguines (réactions transfusionnelles), transplantations (cytolyse).

#### 3/ Hypersensibilité de type III

Cette hypersensibilité, dite également à immuns complexes, fait suite à la création d'anticorps précipitants qui se déposent au sein du tissu cible. C'est la maladie du poumon de fermier (« allergie » aux spores de l'actinomycète *Micropolyspora faeni*), la maladie des éleveurs d'oiseaux (« allergie » aux protéines de sérum et de déjection des pigeons, perruches, perroquets ou poules), de la maladie du charançon du blé (« allergie » à *Sitophilus granarius*), etc...

#### 4/ Hypersensibilité de type IV

Cette hypersensibilité ou allergie retardée, est une réaction d'infiltration cellulaire (lymphocytaire). La forme clinique la plus classique est l'eczéma avec une infiltration épidermique se manifestant par un érythème avec œdème et prurit.

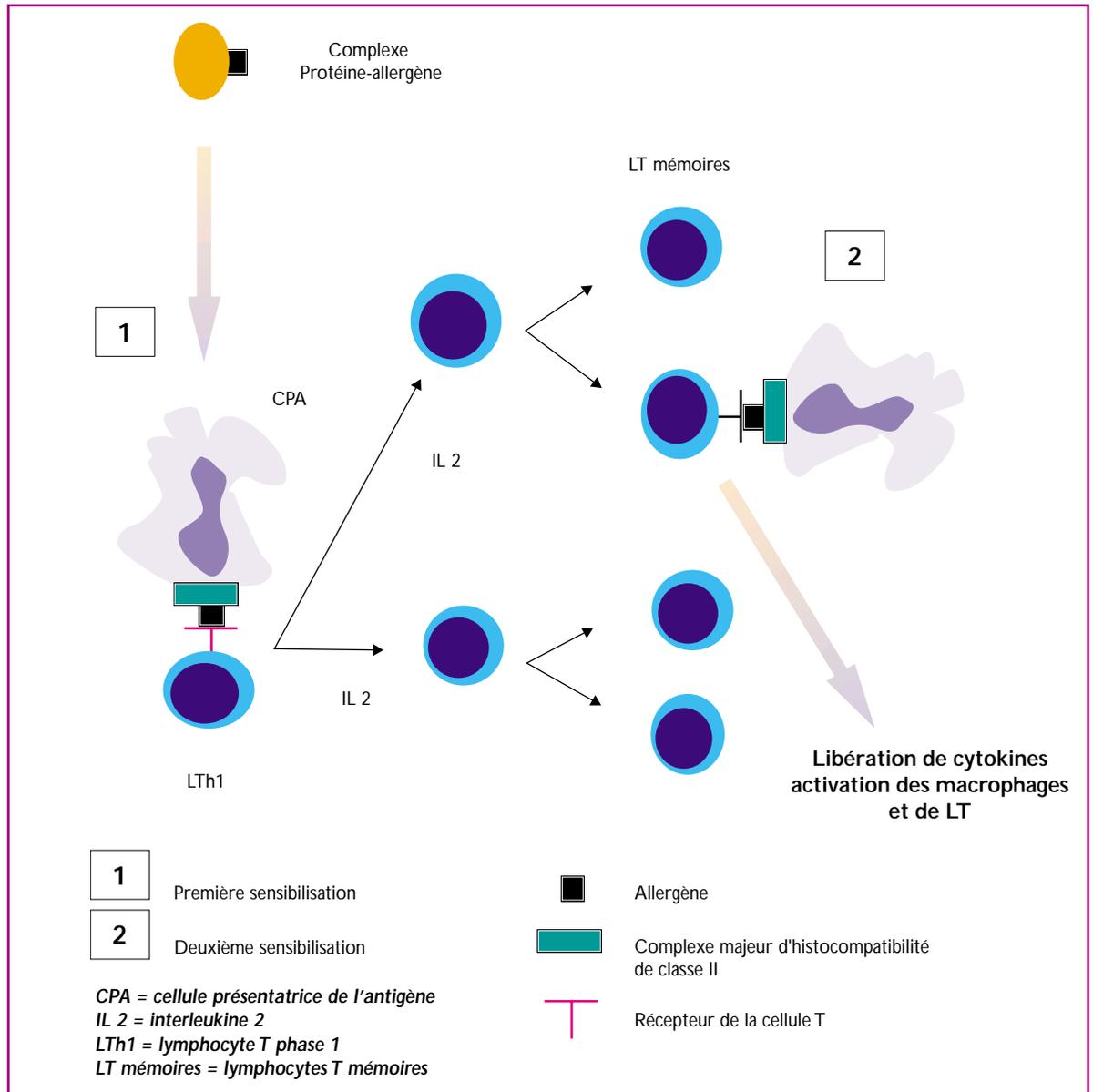
ENCADRÉ 10

 inrs

Documents pour le Médecin du Travail  
N° 103  
3<sup>e</sup> trimestre 2005

323

Fig. 1 : Mécanisme de l'hypersensibilité retardée.



## Principe du test

Ce test est basé sur le fait que les lymphocytes (cellules T mémoires) sensibilisés par un antigène, se transforment en lymphoblastes et prolifèrent lors d'une nouvelle exposition à ce même antigène. Au cours de cette transformation cellulaire, de nombreux mécanismes biologiques s'observent comme la synthèse de protéines, la synthèse d'ARN suite à une synthèse accrue d'ADN. Le TTL mesure cette réplication d'ADN induite par l'allergène mise en évidence par l'incorporation d'un marqueur radioactif, la thymidine tritiée, base nucléotidique rentrant dans la composition de l'ADN [3, 4].

## Réalisation pratique

### ➔ Prélèvements de sang

- ① Appeler un laboratoire spécialisé (*NDLR*) pour prendre un rendez-vous. Préciser le nombre d'échantillons à traiter.
- ② Prélever 30 ml de sang sur tube héparinate de lithium (Vacutainer® bouchon vert).
- ③ Etiqueter les tubes avec le nom du patient, son prénom, sa date de naissance, la date du prélèvement.
- ④ Associer une demande d'examen comportant le nom et le prénom du patient, sa date de naissance, la date du prélèvement, le nom du médecin à qui

renvoyer les résultats et le nom de l'entreprise ou du service demandeur. Préciser si le patient suit un traitement par les corticoïdes. Noter la posologie et la durée du traitement.

⑤ Placer les tubes dans des containers. Ne pas réfrigérer. Ne pas mettre dans la glace. Garder les tubes à température ambiante en attente de transport et pendant le transport. Éviter les températures extrêmes.

⑥ Les tubes doivent parvenir impérativement au laboratoire dans les 24 à 30 heures après le prélèvement.

### ⇒ Liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Ce liquide biologique est obtenu lors de l'exploration de pathologies pulmonaires résultant d'une exposition aux métaux.

Suivre les recommandations décrites pour les prélèvements sanguins, mais pour le LBA, les particularités sont les suivantes : le lavage doit être effectué avant une biopsie éventuelle, afin d'éviter une contamination par le sang. Sont instillés 240 ml de sérum physiologique dans les bronches, au niveau du lobe linguale ou médian droit, puis aspirés sous forme d'aliquotes de 60 ml. Un minimum de 15 millions de globules blancs est nécessaire pour la réalisation du test mais il est fortement recommandé d'obtenir 20 millions de cellules ou plus. Le prélèvement doit être amené rapidement au laboratoire. Dans le cas contraire, centrifuger le LBA (1 200 t/min 10 minutes), re-suspendre les cellules dans du RPMI 1640 (\*) contenant 0,5 % de sulfate de gentamicine ou d'un mélange pénicilline/strepto-

mycine et 10 % de sérum AB ou du sérum du patient. Les tubes doivent parvenir impérativement au laboratoire dans les 24 à 30 heures après le recueil. Joindre le résultat du comptage cellulaire du LBA si celui-ci est disponible.

### ⇒ Culture cellulaire

Les cellules mononucléées sont isolées à partir d'un prélèvement sanguin ou d'un LBA par centrifugation dans un gradient de Ficoll, puis mises dans un milieu de culture approprié supplémenté en sérum humain et en antibiotiques. Les cellules sont comptées (environ 106/ml) puis mises en culture en présence de l'allergène présumé à plusieurs concentrations, dans une micro-plaque de 96 puits, pendant 4 à 7 jours à 37 °C et sous une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub>. Cinq à 12 heures avant l'arrêt de la culture, la thymidine tritiée est ajoutée (1 µCi/ml (\*\*)), celle-ci sera incorporée proportionnellement à la prolifération lymphocytaire [3, 4].

### ⇒ Isolement des cellules transformées

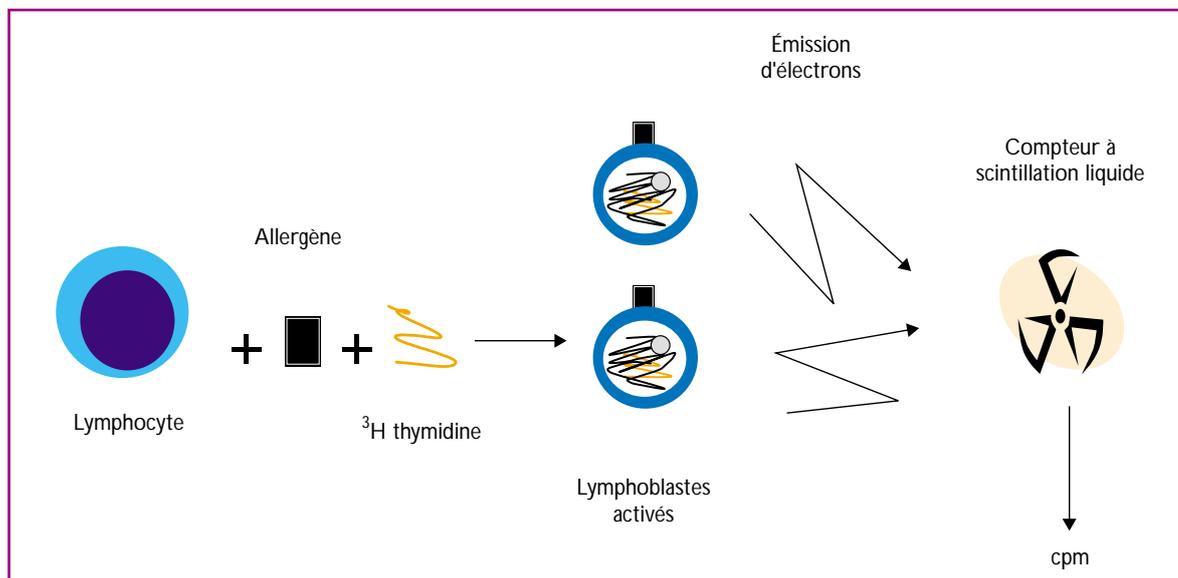
Les cellules sont ensuite filtrées sur papier spécial (fibre de verre) puis lavées (élimination de la radioactivité libre), le spot de papier obtenu est découpé puis placé au compteur à scintillation liquide pour la détection de la radioactivité intracellulaire (figure 2).

Des témoins positifs sont réalisés en utilisant des mitogènes comme la phytohémagglutinine (PHA) et le pokeweed (PWD) qui stimulent de façon non spécifique les lymphocytes T et B. Ils sont les témoins de la réactivité cellulaire.

(\*\*) Ci : curies

\* RPMI 1640 : milieu de culture spécifique.

Fig. 2 : Principe de détection de la radioactivité intracellulaire.



Des témoins négatifs sont effectués en utilisant les lymphocytes seuls, en absence de l'antigène. Une méthode statistique pour le test de lympho-prolifération qui prend en compte la variabilité intra-série et inter-série a été développée plus particulièrement pour le béryllium (BeLPT) [5, 6].

[7] et le béryllium [6, 10], et également maintenant au titane (prothèses articulaires). Ce test permet aussi l'exploration des manifestations allergiques liées à l'utilisation de produits chimiques et de détergents comme les ammoniums quaternaires, les amines aliphatiques et aromatiques, le glutaraldéhyde ou encore le latex.

## Domaines d'application

En immunologie, ce test est utilisé pour l'étude des fonctions lymphocytaires vis-à-vis de mitogènes (PHA, PWK) et d'antigènes spécifiques notamment vaccinaux (tuberculine, anatoxines...) dans la mise en évidence de déficits immunitaires.

En allergologie, ce test est utilisé pour le diagnostic d'une hypersensibilité retardée se manifestant par une dermatite de contact ou eczéma en relation avec la prise d'un médicament. L'apparition du symptôme est tardive (> 48 heures) par rapport à la première prise. Les médicaments responsables sont les antibiotiques ( $\beta$ -lactamines avec l'amoxicilline, céphalosporines, macrolides, sulfamides), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène, acide acétyl-salicylique), les anesthésiques locaux (procaïne, tétracaïne), les curares (atracurium, vécuronium, pancuronium) mais également les anti-rétroviraux dont l'abacavir (Ziagen<sup>®</sup>) et les différentes molécules anti-protéases comme le saquinavir. Il est à noter que ces molécules sont susceptibles d'engendrer également une hypersensibilité dite immédiate médiée par des IgE circulantes.

En pathologie professionnelle, ce test est utilisé pour la mise en évidence d'une sensibilisation aux différents métaux comme le nickel, le cobalt, le mercure

## Conclusion

Le TTL est un test biologique permettant de mettre en évidence un type de sensibilité vis-à-vis d'un allergène donné. Il explore un phénomène de sensibilité de type retardé impliquant les cellules mononucléées. Il est associé à d'autres tests biologiques comme le test d'histamino-libération (THL) ou l'activation des basophiles sanguins détectée par cytométrie de flux (CMF) qui mettent en évidence une sensibilité de type immédiat médiée par la présence d'IgE circulantes. Ces tests ne permettent pas de diagnostiquer la maladie résultant du contact avec l'allergène mais renseignent un « état ».

En règle générale, l'interprétation d'un TTL n'est pertinente que lorsque ce test est intégré dans un faisceau d'investigations cliniques et biologiques complémentaires réalisées pour répondre à une question précise.

Dans le cas d'une suspicion de béryllose, deux tests positifs au béryllium à deux ou trois mois d'intervalle mettent en évidence une sensibilisation à ce métal et représentent un des éléments importants du diagnostic différentiel de cette maladie. Toutefois, il faut rester prudent quant à l'interprétation d'un test de transformation lymphocytaire induit par le béryllium dans la mesure où une même analyse réalisée dans différents laboratoires peut produire des résultats discordants.

## Bibliographie

- [1] GIMENEZ-CAMARASA JM, GARCIA-CALDERON P, DE MORAGAS JM - Lymphocyte transformation test in fixed drug eruption. *N Engl J Med*. 1975; 292 (16) : 819-821.
- [2] NYFELER B, PICHLER WJ - The lymphocyte transformation test for the diagnosis of drug allergy: sensitivity and specificity. *Clin Exp Allergy*. 1997; 27 (2) : 175-81.
- [3] BICKER U, SCHAUMANN W, HAAS V - Optimizing the lymphocyte transformation test in whole blood. I. Optimum conditions for thymidine incorporation. *J Immunopharmacol*. 1983 ; 5 (1-2) : 1-12.
- [4] SCHAUMANN W, BICKER U, HAAS V - Optimizing the lymphocyte transformation test in whole blood. II. Kinetics of thymidine incorporation. *J Immunopharmacol*. 1983 ; 5 (1-2) : 13-30.
- [5] FROME EL, SMITH MH, LITTLEFIELD LG, NEUBERT RL ET AL. - Statistical methods for the blood beryllium lymphocyte proliferation test. *Environ Health Perspect* 1996 ; 104 (suppl 5) : 957-68.
- [6] KLEIN R, SCHWENK M, HEINRICH-RAMM R, TEMPLETON DM - Diagnostic relevance of the lymphocyte transformation test for sensitization to beryllium and others metals (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*. 2004 ; 76 (6) : 1269-81.
- [7] NEWMAN LS, MROZ MM, BALKISSOON R, MAIER LA - Beryllium sensitization progresses to chronic beryllium disease: a longitudinal study of disease risk. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 ; 171 (1) : 54-60.
- [8] US DEPARTEMENT OF ENERGY - Beryllium lymphocyte proliferation test (BeLPT) 2001. ([www.eh.doe.gov/techstds/standard/spec1142/SPEC11422001.pdf](http://www.eh.doe.gov/techstds/standard/spec1142/SPEC11422001.pdf))
- [9] INSTITUT NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE DU QUÉBEC - Le test sanguin de prolifération lymphocytaire au béryllium (BeLPT). De la théorie à la pratique (2004). ([www.inspq.qc.ca/pdf/publications/282-TestSanguinLymphocytaireBeryllium.pdf](http://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/282-TestSanguinLymphocytaireBeryllium.pdf))
- [10] STANGE AW, FURMAN FJ, HILMAS DE - The beryllium lymphocyte proliferation test: Relevant issues in beryllium health surveillance. *Am J Ind Med*. 2004 ; 46 (5) : 453-62.