

Centre Armand-Frappier Santé et Biotechnologie

**EFFETS SUPPRESSEURS DU Delta-9-TETRAHYDROCANNABINOL
SUR L'IMMUNITÉ DES CELLULES T-CD8s : ATTEINTE DE LEUR
POLYFONCTIONNALITÉ, CYTOTOXICITÉ ET MÉTABOLISME
LIPIDIQUE**

Par
Cherifa Beji

Mémoire ou thèse présenté(e) pour l'obtention du grade de
Maître en Sciences (M. Sc.)
en immunologie et virologie

Jury d'évaluation

Président du jury et
Examineur interne

Terence Bukong
Institut National de la Recherche
Scientifique—Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

Examineur externe

Naglaa Shoukry
Université de Montréal
Centre de recherche du Centre
Hospitalier de l'Université de Montréal

Directeur de recherche

Julien van Grevenynghe
Institut National de la Recherche
Scientifique—Centre Armand-Frappier
Santé Biotechnologie

REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer cette partie par dédier ce mémoire à mes chers parents : merci pour votre amour et support inconditionnels. Je n'aurais rien pu accomplir sans vous. Je vous aime infiniment.

Je souhaite remercier mon directeur de recherche, Julien Van Grevenynghe, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci pour l'encadrement, les conseils, et la transmission des connaissances pour l'immunologie et la recherche.

Je tiens également à remercier Hamza Loucif et Xavier Dagenais Lussier pour toute leur aide et surtout patience quand tout allait de travers, ainsi que pour tous les bons moments qu'on a eus ensemble.

Je tiens finalement à remercier tous les amis que je me suis faite durant ces 2 ans, particulièrement Wiem Sleimi, Maha Ben Hammouda, Liseth Carmona Gauthier Alfonsi et Xavier Laulhé, ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de loin ou de près à la réussite de ce travail.

A mes frères et sœur, merci pour tous vos encouragements.

Soulayma, Sofia, Wissal : votre soutien dans les mauvais moments et votre présence dans les meilleurs, malgré la distance qui nous sépare, m'a été d'une aide cruciale. Vous êtes les meilleures amies qu'on pourrait espérer avoir.

Mariem, Ahmed, Walid, Aymée, Sam : merci pour tous les superbes moments passés ensemble et toute la positivité que vous m'offrez.

Nick : pour ton soutien, esprit rationnel, et niaiseries. Je t'aime.

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T sont des composantes importantes de la réponse immunitaire adaptative dans l'élimination des différentes infections. Dans le cas d'infections virales, cette élimination se fait via la production de cytokines antivirales par les lymphocytes T CD4 (T-CD4s) helper pour activer les différentes populations immunitaires nécessaires, notamment les lymphocytes T CD8 (T-CD8s) qui sont aussi connues pour leur action cytolytique menant directement à la lyse de la cellule infectée.

Afin d'assurer des réponses antivirales et cytotoxiques optimales, les lymphocytes nécessitent un apport énergétique important pour proliférer et exprimer plusieurs cytokines simultanément, d'où le terme polyfonctionnalité. Cet apport énergétique est assuré par l'oxydation de plusieurs substrats carbonés menant à la génération de l'énergie sous forme des molécules d'Adénosine Triphosphate (ATP). une plasticité métabolique permettant aux cellules d'altérer leurs voies métaboliques afin de dégrader différents métabolites et les transformer en ATP. Plusieurs études, dont celles menées dans notre laboratoire montrent que l'une des voies les plus utilisées par les lymphocytes T activées est la beta oxydation des acides gras (FAO).

Plusieurs substances peuvent inhiber les réponses immunitaires cellulaires, telles que les cannabinoïdes, dont la consommation est légalisée au Canada. La consommation de cannabis par la population générale est principalement du cannabis à spectre complet avec soit une teneur élevée en cannabidiol (CBD), soit une teneur élevée en tétrahydrocannabinol (THC). L'effet du CBD est plutôt thérapeutique vu qu'il est connu pour son effet anti inflammatoire et anti-douleurs. Cependant, les consommateurs de Cannabis à titre récréationel recherchent un effet neurotropique auquel on réfère par le terme 'High', qui est trouvé typiquement en consommant du cannabis à teneur élevée en THC. Cette consommation, ayant augmenté depuis la légalisation du cannabis, et d'autant plus depuis le début de la pandémie actuelle afin de réduire le stress mental dû aux conditions d'isolement et de distanciation imposées au Québec.

Dans le cadre de la nécessité de la génération d'une réponse immunitaire suffisante et protectrice contre le SRAS-CoV-2 suite à la vaccination, on se demande si cette consommation de THC ne serait pas de nature inhibante quant à la réponse vaccinale des consommateurs récréationels, qui représentent une population assez importante au Québec et au Canada.

De ce fait, on s'est intéressé à l'étude de l'effet du THC sur les réponses antivirales des lymphocytes T-CD8s et des T-CD4s mémoires.

Cette étude a été principalement réalisée en utilisant la plateforme de cytométrie en flux nous permettant de cibler à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (CMSPs), nos cellules et cytokines d'intérêt, étant respectivement les lymphocytes T-CD8s et l'IFN γ , la TNF α ainsi que l'IL-2, via un cocktail multiparamétrique d'anticorps. Nos résultats ont confirmé que les lymphocytes T-CD8s et T-CD4s mémoires, activées de manière polyclonale et, traitées ou non, au THC pendant 24h, présentent une inhibition significative de leur polyfonctionnalité immunitaire. Ces cellules présentent aussi une inhibition de leur potentiel cytotoxique observée via leur expression des molécules de la cytotoxicité cellulaire, Granzyme B et Perforine. De façon importante, on démontre une possible atteinte du métabolisme lipidique, en évaluant l'expression intra-mitochondriale du transporteur lipidique CPT1a, qui se trouve significativement diminuée chez les lymphocytes T-CD8s activés en présence de THC. Ces données métaboliques primaires sont à confirmer avec des données de respiration cellulaires, mitochondriales, qui peuvent être générées grâce à l'utilisation d'une plateforme d'étude métabolique, le Seahorse.

Mots-clés : Cannabis, THC, lymphocytes T-CD8, cytotoxicité, cytokines, polyfonctionnalité, immunométabolisme.

ABSTRACT

T lymphocytes are important components of the adaptive immune response in the elimination of various infections. In the case of viral infections, this elimination takes place via the production of antiviral cytokines by the helper T-CD4s to activate the various immune populations necessary, as well as by the T-CD8s which are also known for their cytolytic action leading directly to lysis of the infected cell.

In order to ensure optimal antiviral and cytotoxic responses, lymphocytes require a significant energy supply to proliferate and express several cytokines simultaneously, hence the term polyfunctionality. This energy supply is ensured by metabolic plasticity allowing cells to alter their metabolic pathways in order to degrade various metabolites and transform them into ATP. Several studies, including those conducted in our laboratory, show that one of the pathways most used by activated T lymphocytes is fatty acid beta oxidation (FAO).

Several substances can inhibit cellular immune responses, such as cannabinoids, the consumption of which is legal in Canada. Cannabis consumption by the general population is predominantly full-spectrum cannabis with either high cannabidiol (CBD) content or high tetrahydrocannabinol (THC) content. The effect of CBD is rather therapeutic since it is known for its anti-inflammatory and pain-relieving effect. However, recreational Cannabis users seek a neurotropic effect referred to as 'High', which is typically found when consuming cannabis with a high THC content. This consumption, having increased since the legalization of cannabis, and all the more since the beginning of the current pandemic in order to reduce mental stress due to the conditions of isolation and distancing imposed in Quebec.

In the context of the need to generate a sufficient and protective immune response against SARS-CoV-2 following vaccination, one wonders if this consumption of THC would not be of an inhibiting nature with regard to the vaccine response of consumers. recreational workers, who represent a fairly large population in Quebec and Canada.

As a result, there has been interest in studying the effect of THC on the antiviral responses of memory T-CD8s and T-CD4s.

This study was mainly carried out using the flow cytometry platform allowing us to target from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), our cells and cytokines of interest, being

respectively T-CD8s lymphocytes and IFN γ , TNF α as well as IL-2, via a multiparametric cocktail of antibodies. Our results confirmed that T-CD8s lymphocytes, polyclonally activated and, treated or not, with THC for 24 hours, show a significant inhibition of their immune polyfunctionality. These cells also show an inhibition of their cytotoxic potential observed via their expression of the cellular cytotoxicity molecules, Granzyme B and Perforin. Importantly, using the same experimental platform, we demonstrate a possible impairment of lipid metabolism, by evaluating the intra-mitochondrial expression of the lipid transporter CPT1a, which is significantly reduced in T-CD8s lymphocytes activated in the presence of THC. These primary metabolic data must be confirmed with cellular and mitochondrial respiration data, which can be generated through the use of a metabolic study platform, the Seahorse.

Keywords : Cannabis, THC, T lymphocytes, cytotoxicity, cytokines, polyfunctionality, immunometabolism.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
RÉSUMÉ.....	5
ABSTRACT.....	7
TABLE DES MATIÈRES.....	11
LISTE DES FIGURES.....	15
LISTE DES TABLEAU.....	19
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	21
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. CANNABIS :.....	2
1.1.1. <i>Historique et légalisation</i> :.....	2
1.1.2. <i>Cannabis : Variétés et origines</i>	3
1.1.3. <i>Cannabinoïdes</i> :.....	5
1.2. LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	7
1.2.1. <i>L'importance des lymphocytes T</i> :.....	7
1.2.2. <i>La production de cytokines par les T-CD8s et les T-CD4s</i> :.....	10
1.2.3. <i>La plasticité métabolique des cellules T</i> :.....	13
1.3. EFFET DES CANNABINOÏDES SUR LES LYMPHOCYTES T :.....	15
2. METHODOLOGIE :.....	17
2.1. MATERIEL CHIMIQUE :.....	17
2.1.1. <i>Licence d'utilisation de cannabis</i> :.....	17
2.1.2. <i>Dose utilisée</i> :.....	17
2.2. MATERIEL BIOLOGIQUE :.....	17
2.2.1. <i>Certificat d'éthique</i> :.....	17
2.2.2. <i>Manipulation du matériel biologique</i> :.....	18
2.3. MARQUAGE CYTOMETRIQUE :.....	19
2.4. PLATEFORMES D'ANALYSE DES DONNEES :.....	20
2.4.1. <i>La cytométrie en flux</i> :.....	20
2.4.2. <i>Le seahorse</i>	22
2.5. CONDITIONS EXPERIMENTALES :.....	25
2.6. LOGICIELS UTILISES ET TESTS STATISTIQUES :.....	27
3. RESULTATS.....	29
3.1. ANALYSES CYTOMETRIQUES :.....	29
3.2. LE THC DIMINUE LA POLYFONCTIONNALITE :.....	31
3.3. LE THC DIMINUE LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE :.....	35

3.4.	POLYFONCTIONNALITE ET POTENTIEL CYTOTOXIQUE CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES ET T-CD8s	
	TOTALES:	39
3.5.	LE THC INHIBE L'IMMUNITE DES CELLULES T-CD8s EN AFFECTANT LEUR APPORT ENERGETIQUE : ...	39
4.	DISCUSSION	43
5.	CONCLUSION.....	47
6.	REFERENCES	48
7.	ANNEXES	56
7.1.	LICENCE DU CANNABIS :	56
7.2.	FICHE DE SUIVI DE L'UTILISATION DES SUBSTANCES CANNABINOIDES	57
7.3.	CERTIFICAT D'ETHIQUE	58
7.4.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE L'IFN γ CHEZ LES T-CD8s TOTALES	59
7.5.	MFI D'EXPRESSION DE L'IFN γ CHEZ LES T-CD8s TOTALES.....	59
7.6.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DU TNFA CHEZ LES T-CD8s TOTALES.....	60
7.7.	MFI D'EXPRESSION DU TNFA CHEZ LES T-CD8s TOTALES	61
7.8.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD8s TOTALES	61
7.9.	MFI D'EXPRESSION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD8s TOTALES	62
7.10.	POLYFONCTIONNALITE CHEZ LES T-CD8s.....	63
7.11.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA GRZB CHEZ LES T-CD8s TOTALES.....	63
7.12.	MFI D'EXPRESSION DE LA GRZB CHEZ LES T-CD8s TOTALES	64
7.13.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA PRF CHEZ LES T-CD8s TOTALES	65
7.14.	MFI D'EXPRESSION DE LA PRF CHEZ LES T-CD8s TOTALES	65
7.15.	POURCENTAGE DE LA DOUBLE EXPRESSION (GRZB ⁺ , PRF ⁺) CHEZ LES T- CD8s TOTALES.....	66
7.16.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE L'IFN γ CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES.....	67
7.17.	MFI D'EXPRESSION DE L'IFN γ CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	67
7.18.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DU TNFA CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	68
7.19.	MFI D'EXPRESSION DU TNFA CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	69
7.20.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES.....	69
7.21.	MFI D'EXPRESSION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	70
7.22.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE GRZB CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	70
7.23.	MFI D'EXPRESSION DE GRZB CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	71
7.24.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA PRF CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES	72
7.25.	MFI D'EXPRESSION DE LA PRF CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES.....	72
7.26.	POURCENTAGE DE LA DOUBLE EXPRESSION (GRZB ⁺ , PRF ⁺) CHEZ LES T- CD4s MEMOIRES	73
7.27.	74	
7.28.	POURCENTAGE DE L'EXPRESSION (GRZB ⁺ , PRF ⁺ , IFN γ) CHEZ LES T- CD4s MEMOIRES.....	74
7.29.	POURCENTAGE DE L'EXPRESSION (GRZB ⁺ , PRF ⁺ , TNFA) CHEZ LES T- CD4s MEMOIRES.....	74
7.30.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE L'IFN γ CHEZ LES T-CD4s TOTALES	75

7.31.	MFI D'EXPRESSION DE L'IFN γ CHEZ LES T-CD4S TOTALES	76
7.32.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DU TNFA CHEZ LES T-CD4S TOTALES.....	76
7.33.	MFI D'EXPRESSION DU TNFA CHEZ LES T-CD4S TOTALES	77
7.34.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD4S TOTALES	78
7.35.	MFI D'EXPRESSION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD4S TOTALES	78
7.36.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA GRZB CHEZ LES T-CD4S TOTALES.....	79
7.37.	MFI D'EXPRESSION DE LA GRZB CHEZ LES T-CD4S TOTALES	79
7.38.	POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA PRF CHEZ LES T-CD4S TOTALES	80
7.39.	MFI D'EXPRESSION DE LA PRF CHEZ LES T-CD4S TOTALES	81
7.40.	MFI DE POSITIVITE DU CPT1A CHEZ LES T-CD8S TOTALES	81
7.41.	MFI DE POSITIVITE DU CPT1A CHEZ LES T-CD4S MEMOIRES.....	82

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION :

<u>FIGURE 1 : LE CANNABIS : DE LA CRIMINALISATION A LA LEGALISATION : PORTRAIT DES CHANGEMENTS DU CARACTERE LEGAL DU CANNABIS. SOURCE : ENQUETE NATIONALE SUR LE CANNABIS, 2018 (1^{ER},2^E ET 3^E TRIMESTRE) ET 2019 (1^{ER},2^E, 3^E ET 4^E TRIMESTRE), STATISTIQUE CANADA.</u>	3
<u>FIGURE 2 : LES SOUS ESPECES PRINCIPALES DU CANNABIS (6)</u>	5
<u>FIGURE 3 : LE SYSTEME DES ENDOCANNABINOÏDES : LOCALISATION DES RECEPTEURS CB1 ET CB2 ET LES DIFFERENTES MODULATIONS ENGENDREES A LA SUITE DE LEUR ACTIVATION (11).</u>	6
<u>FIGURE 4 : RECONNAISSANCE ANTIGENIQUE ET EXPANSION CLONALE DES CELLULES T : LES CELLULES T NAÏVES SONT ACTIVEES PAR LES CELLULES PRESENTATRICE D'ANTIGENE, CE QUI MENE A LEUR EXPANSION CLONALE ET DIFFERENCIATION EN EFFECTRICES ET MEMOIRES POUR ELIMINER LE PATHOGENE EN QUESTION VIA LA SECRETION DE CYTOKINES. LA CONSTITUTION DE MEMOIRE EST IMPORTANTE VU SON ROLE DE RECONNAISSANCE ET D'ACTIVATION D'UNE REPOSE ENCORE PLUS IMPORTANTE ET RAPIDE LORS D'UN 2EME CONTACT AVEC L'ANTIGENE DU MEME PATHOGENE.</u>	8
<u>FIGURE 5 : PRESENTATION DES DIFFERENTES SOUS POPULATIONS DES T-CD4s, LES CYTOKINES PRODUITES PAR CHACUNE ET LEUR ROLE DANS L'ELIMINATION DES PATHOGENE ET LA MAINTENANCE DE L'HOMÉOSTASIE. LA CELLULE T-CD4 NAÏVE EST ACTIVEE PAR LA PRESENCE D'ANTIGENE, ET SE DIFFERENCIE EN L'UNE DES SOUS POPULATIONS EN SECRETANT UN ENSEMBLE DE CYTOKINES BIEN DEFINI. UNE FOIS DIFFERENCIEE, CETTE SOUS POPULATION VA SECRETER UN AUTRE MIX DE CYTOKINE SPECIFIQUE A LA POPULATION QU'ELLE VEUT RECRUTER OU AU ROLE QU'ELLE DOIT JOUER (23).</u>	9
<u>FIGURE 6 : ROLE DES T-CD4s DANS L'ACTIVATION DES CELLULES B ET T : SUITE A LEUR ACTIVATION PAR UNE CELLULE PRESENTATRICE D'ANTIGENE, LES T-CD4s SECRETENT DES CYTOKINES POUR ACTIVER LES LYMPHOCYTES T ET B, ET LES ACTIVENT DIRECTEMENT SUITE A DES INTERACTIONS LIGAND-RECEPTEURS DEPENDANTES (25).</u>	10
<u>FIGURE 7 : LES DIFFERENTES EXPERIMENTATIONS POSSIBLES PAR LE SEAHORSE.</u>	24
<u>FIGURE 8 : SCHEMATIQUE DE L'ETUDE : LES CMSPs SONT DECONGEELES ET ACTIVEES DE MANIERE POLYCLONALE PENDANT 24H EN PRESENCE OU EN ABSENCE D'UNE DOSE DE 10µM DE THC. ELLES SONT PAR LA SUITE SOIT :</u>	26
<u>FIGURE 9 : STRATEGIE DE GATING DES LYMPHOCYTES T</u>	29
<u>FIGURE 10 : GATING DES CYTOKINES D'INTERET : AFIN DE QUANTIFIER LA VRAIE EXPRESSION CYTOKINIQUE, ON SE REFERE AU TUBE ISO (PREMIERE COLONNE) POUR IDENTIFIER LE SIGNAL NON SPECIFIQUE ET NEGATIF DU FLUOROCHROME. CE SIGNAL EST CONSIDERE COMME NEGATIF. LA PARTIE A SA DROITE EST LA OU ON S'ATTEND A UN SIGNAL POSITIF D'EXPRESSION CYTOKINIQUE, DONT L'INTENSITE VA VARIER SELON LA CONDITION D'ACTIVATION ET DE TRAITEMENT.</u>	30

<u>FIGURE 11 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE THC A 10 µM PENDANT 24H SUR LA PRODUCTION DE L'IFNγ CHEZ LES T-CD8s :</u>	31
<u>FIGURE 12 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE THC A 10 µM PENDANT 24H SUR LA PRODUCTION DU TNFA CHEZ LES T-CD8s : A. EN POURCENTAGE D'EXPRESSION B. EN MFI</u>	32
<u>FIGURE 13 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE THC A 10 µM PENDANT 24H SUR LA PRODUCTION DE L'IL-2 CHEZ LES T-CD8s : A. EN POURCENTAGE D'EXPRESSION B. EN MFI</u>	32
<u>FIGURE 14 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10 µM DE THC PENDANT 24H SUR LA POLYFONCTIONNALITE CELLULAIRE ANTIVIRALE DES T-CD8s : PRODUCTION SIMPLE (IFNγ SEULE), PRODUCTION DOUBLE (IFNγ+ TNFA OU IFNγ+ IL-2), PRODUCTION TRIPLE (IFNγ+ TNFA+ IL-2)</u>	33
<u>FIGURE 15 : EFFET D'UNE DOSE DE 10 mM DE THC SUR L'EXPRESSION INDIVIDUELLE DES CYTOKINES D'INTERET CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES EN CONDITION DE QUIESCENCE, D'ACTIVATION, EN PRESENCE OU ABSENCE DU THC : A. EXPRESSION DE L'IFNγ ; B. MFI DE L'IFNγ ; C. EXPRESSION DE DE L'IL-2 ; D. MFI DE L'IL-2 ; E. EXPRESSION DE LA TNFA ; F. MFI DE LA TNFA</u>	34
<u>FIGURE 16 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR LA PRODUCTION DE GRANZYME B CHEZ LES T-CD8s EN CONDITION DE QUIESCENCE, D'ACTIVATION, EN PRESENCE OU ABSENCE D'UNE DOSE DE 10MM DE THC: A. EN POURCENTAGE D'EXPRESSION ; B. EN MFI</u>	35
<u>FIGURE 17 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR LA PRODUCTION DE PERFORINE T-CD8s EN CONDITION DE QUIESCENCE, D'ACTIVATION, EN PRESENCE OU ABSENCE D'UNE DOSE DE 10MM DE THC: A. EN POURCENTAGE D'EXPRESSION ; B. EN MFI</u>	36
<u>FIGURE 18 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DES T-CD8s : LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE EST PLUS PRONONCE SUITE A L'ACTIVATION POLYCLONALE DE 24H. LE THC DIMINUE DE MANIERE SIGNIFICATIVE CETTE CYTOTOXICITE EN INHIBANT LA PRODUCTION CELLULAIRE SIMULTANEE DE GRANZYME B ET DE PERFORINE</u>	36
<u>FIGURE 19 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR L'EXPRESSION INDIVIDUELLE DES CYTOKINES D'INTERET CHEZ LES T-CD4s MEMOIRES EN CONDITION DE QUIESCENCE ET D'ACTIVATION: A. POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA GRANZYME B. B. MFI D'EXPRESSION DE LA GRANZYME B. C. POURCENTAGE D'EXPRESSION DE LA PERFORINE. D. MFI D'EXPRESSION DE LA PERFORINE</u>	37
<u>FIGURE 20 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR LE POTENTIEL CYTOTOXIQUE DES T-CD4s MEMOIRES EN CONDITION DE QUIESCENCE ET D'ACTIVATION</u>	38
<u>FIGURE 21 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR LA POLYFONCTIONNALITE CYTOTOXIQUE DES T-CD4s MEMOIRES EN CONDITION DE QUIESCENCE ET D'ACTIVATION</u>	38
<u>FIGURE 22 : EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10µM DE THC PENDANT 24H SUR L'EXPRESSION DE CPT1A CHEZ LES T-CD8s</u>	40

FIGURE 23: EFFET D'UN TRAITEMENT DE 10 μ M DE THC PENDANT 24H SUR L'EXPRESSION DU CPT1A CHEZ LES T-CD4S MEMOIRES.....40

LISTE DES TABLEAU

TABLEAU 1 LE PROFIL METABOLIQUE DES DIFFERENTS PHENOTYPES DES CELLULES T	15
TABLEAU 2 CONDITIONS EXPERIMENTALES	25
TABLEAU 3 CARACTERISTIQUES DES PATIENTS	26

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CBC: Cannabichromene

CBD: Cannabidiol

CBG: Cannabigerol

CBN: Cannabinol

CEF: Cytomegalovirus, Epstein - Barr virus and Influenza Virus

CMSP: Cellules mononuclées du sang périphérique

CPT1a: Carnitine Palmitoyltransferase 1A

DMSO: Dimethyl sulfoxide

ECM: Matrice extracellulaire

FBS: Fetal Bovine Serum

GrzB: Granzyme B

IFN γ : Interferon gamma

IL-2: Interleukine-2

PBS: Phosphate Buffered Saline

Prf: Perforine

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

T-CD4s: Population CD4 des Lymphocytes T

T-CD8s: Population CD8 des Lymphocytes T

THC: Delta-9-tétrahydrocannabinol

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

1. INTRODUCTION

Le tetra-delta 9- hydro-cannabinol, ou THC, est l'une des substances actives majoritaires dans la plante de Cannabis, récemment légalisée au Canada. Cette plante contient plus que 400 cannabinoïdes différents, incluant le CBD et le THC auquel notre étude s'intéresse vu que c'est la substance d'intérêt pour les consommateurs récréationnels de cannabis. Selon les dernières études statistiques effectuées au Canada, la consommation de cette substance a augmenté de façon significative chez les jeunes (35%) ainsi que les adultes (10%), et se fait dans un aspect thérapeutique, dans les cas de prescription médicale pour les troubles d'anxiété et d'anorexie, ainsi qu'en tant que soin palliatif pour les stades terminaux de maladies chroniques tel que le cancer ou la sclérose en plaque, et dans un aspect récréationnel comme drogue douce pour son effet neurotropique de relaxation nommé 'éhigh'.

Le système immunitaire joue un rôle crucial dans la survie de l'homme grâce au rôle qu'il confère dans la protection contre les différents pathogènes, notamment les infections virales. L'une des composantes les plus importantes du système immunitaire adaptatif sont les lymphocytes T qui jouent un rôle crucial dans la résolution des infections virales. Ceci se fait de manière directe grâce à leur potentiel antiviral et cytotoxique assuré par les T-CD8s, ainsi que grâce aux T-helper, qui sont notamment des T-CD4s, sécrétant des cytokines afin d'orchestrer la réponse immunitaire en activant différentes cellules du système immunitaire. L'activation des lymphocytes T nécessite un apport énergétique important, assuré par une plasticité métabolique. Plusieurs études, dont une effectuée par notre équipe, montrent qu'une composante importante de cette plasticité est la dégradation lipidique via la voie de beta oxydation des acides gras. Ceci nous pousse à nous demander quels sont les effets de cette consommation de substances cannabinoïdes, notamment le THC, sur le système immunitaire humain, en particulier sur les lymphocytes T en étudiant leur fonctionnalité à exprimer des cytokines antivirales, molécules de cytotoxicité et un des marqueurs du métabolisme lipidique.

Pour ce faire, on a principalement eu recours à la plateforme de cytométrie en flux, permettant d'apprécier la polyfonctionnalité cellulaire à partir d'un échantillon sanguin, grâce à un cocktail multiparamétrique d'anticorps fluorescents. Notre étude nécessite donc la manipulation de cellules humaines, ainsi que de substances dont l'achat et l'utilisation dans un but de recherche sont légalisées par le gouvernement du Canada, d'où un dossier de bioéthique concernant les échantillons humains ainsi qu'une licence d'utilisation de cannabis ont été obtenus.

1.1. Cannabis :

1.1.1. Historique et légalisation :

À la suite de la légalisation du cannabis, plante à fleurs originaire de l'Asie de l'Ouest et majoritairement connu pour son effet psychoactif, sa consommation a vu une augmentation significative. En effet, en 1923, les cannabinoïdes, substances actives de cette plante, furent classifiés comme drogues dures et de stupéfiants dans la même catégorie que l'opium, l'héroïne et la cocaïne, menant à l'interdiction de leur consommation selon la Loi interdisant l'usage inapproprié d'opium et d'autres drogues du premier ministre William Lyon Mackenzie King.

Malgré la popularité de la consommation de cette plante entre les années 1960, cette interdiction du cannabis a été maintenue tout autour du Canada, malgré les différents rapports indiquant que cette dernière n'est pas seulement coûteuse pour les canadiens, mais d'autant plus nocive pour ses consommateurs, vu que ça leur crée un casier juridique, affectant donc leur employabilité (1).

Cependant, suite à la multiplication d'études confirmant l'utilité du cannabis ou de substances cannabinoïdes dans les traitements de stades finaux de maladies chroniques -tel que le VIH, les différents cancers et la sclérose en plaque, ainsi que la militance croissante des consommateurs, cultivateurs et des activistes, l'année 2001 fut celle de la réglementation de l'usage médical du cannabis, suivi par des discussions concernant la réglementation générale voire légalisation de cette plante dans les années 2002 et 2003 (2).

Cette approche pro-cannabis n'a pas duré longtemps, vu que l'interdiction de la consommation de cette plante a été encore une fois renforcée sous la gouvernance du parti conservateur de Stephen Harper, qui a imposé différentes peines pour la consommation, la cultivation ainsi que la simple possession de cannabis augmentant encore une fois le nombre d'arrestations.

Le tout change quand en 2013 de nouvelles réglementations fédérales permettent la production et la distribution de cannabis médicinal et qu'en 2015 la cour suprême du Canada décide qu'il est inconstitutionnel d'obliger les individus autorisés à consommer du cannabis à le fumer. Une industrie licite du cannabis et de ses dérivés est donc mise en place. Cette décision est suivie par l'annonce de la légalisation de l'utilisation récréationnelle du Cannabis par le gouvernement libéral de Trudeau, qui met en place en 2016 une équipe pour travailler le projet de loi C45. Cette loi reçoit la sanction royale le 21 juin 2018 et entre en vigueur le 17 octobre 2018, faisant du Canada le deuxième pays, après l'Uruguay, à légaliser le cannabis(1, 3). Cette légalisation, saluée par la plupart des consommateurs, reste tout

de même redoutée par les autorités en raison des risques qu'elle présente, notamment en matière d'augmentation de consommation et surtout d'insobriété au volant (4).

La figure 1, issue de l'enquête nationale sur le cannabis dans les années 2018 et 2019, détaille la consommation du cannabis au Canada avant et après sa légalisation (5).

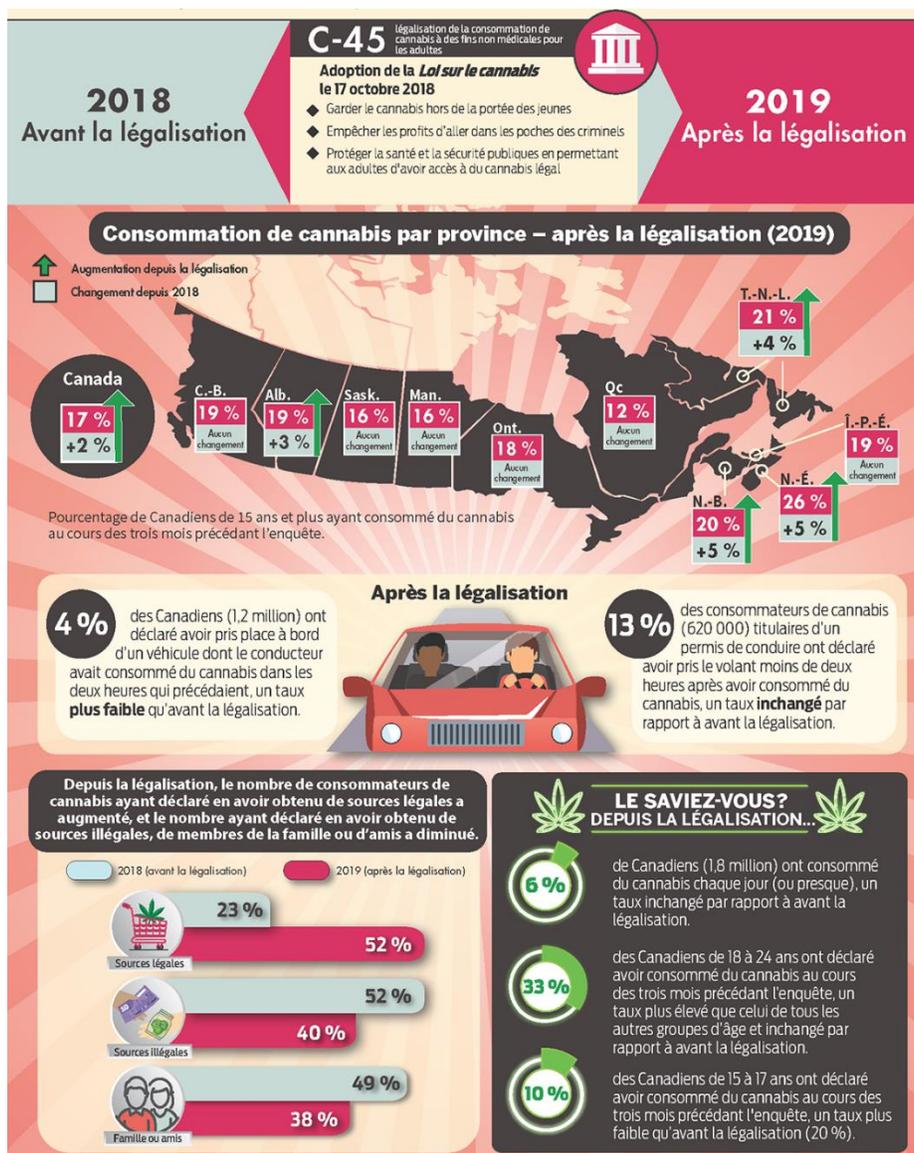


Figure 1 : le Cannabis : de la criminalisation à la légalisation : Portrait des changements du caractère légal du cannabis. Source : Enquête nationale sur le cannabis, 2018 (1^{er}, 2^e et 3^e trimestre) et 2019 (1^{er}, 2^e, 3^e et 4^e trimestre), Statistique Canada (5).

1.1.2. Cannabis : Variétés et origines

Le cannabis appartient au règne des plantes, ordre des rosales, et à la famille des cannabacées. Comme montré dans la figure 2, il existe 3 espèces de cannabis (6):

- Le *cannabis sativa*, ou chanvre cultivé, provient des régions équatoriales. Cette espèce est caractérisée par sa tige creuse et souple, ainsi que ses feuilles fines et peu ramifiées, et peut atteindre une hauteur de 6 mètres. Elle est aussi connue pour sa teneur élevée en delta-9-tetrahydrocannabinol, procurant l'effet de « High » (7).
- Le *cannabis indica*, ou chanvre indien, est originaire des régions himalayennes du nord de l'Inde. Elle est caractérisée par sa tige pleine et souple, ses feuilles larges et sa ramification importante, ainsi qu'une hauteur maximale de 3 mètres. Grâce à sa composition plutôt riche en CBD, son effet psychotrope est plus prononcé que celui du *cannabis sativa*, et est plutôt de nature corporelle, appelé « stoned » (8).
- Le *cannabis ruderalis* : aussi appelée sauvage ou spontané, pousse principalement en Europe centrale et de l'est. Cette variété est caractérisée par sa très faible ramification, sa tige unique, et sa taille ne dépassant pas 1 mètre. Son effet psychotrope est quasi-nul vu que sa teneur en THC ne dépasse pas les 0.5% (6).
- Le *cannabis afghanica* : connu aussi sous le nom de Kusch, cette sous espèce de cannabis pousse comme son nom l'indique dans les régions de l'Afghanistan, notamment les montagnes de l'Hindu Kusch, ainsi qu'en Pakistan. Cette plante est caractérisée par sa hauteur maximale de 1.5 mètre, sa ramification importante, ses feuilles larges, et surtout par son tronc nervuré et solide. Cette plante est notamment très riche en THC qu'elle est exclusivement cultivée ou la production de haschisch (6, 8).

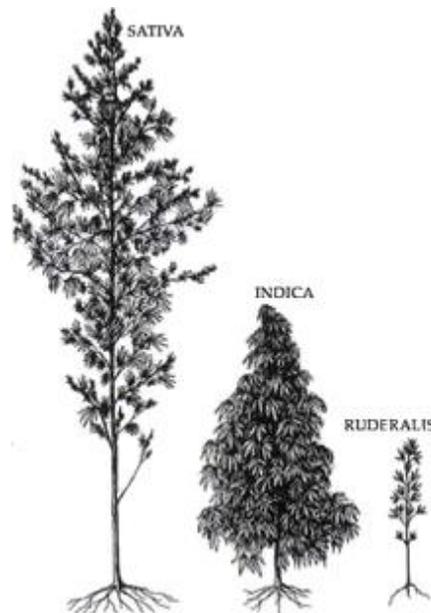


Figure 2 : Les sous espèces principales du cannabis (6)

1.1.3. Cannabinoïdes :

Plusieurs recherches ont été conduites afin de caractérisées les substances présentes dans les différentes espèces de Cannabis. Ces composés sont principalement des cannabinoïdes, dont la concentration varie d'une espèce à l'autre, attribuant la raison principale de sa culture (9). On compte aujourd'hui plus que 100 cannabinoïdes, dont les principaux sont le THC, le cannabidiol (CBD), le cannabinol (CBN), ainsi que le cannabigerol (CBG) et le cannabichromene (CBC) (10).

Ces cannabinoïdes, sont des homologues des endocannabinoïdes qui existent naturellement dans les corps humains, et sont donc capables de se fixer sur les récepteurs de ces derniers, étant le CB1 pour le système nerveux et les cellules épithéliales, et le CB2 principalement pour le système immunitaire (11). La distribution de ces récepteurs se fait comme indiqué dans la figure 3 :

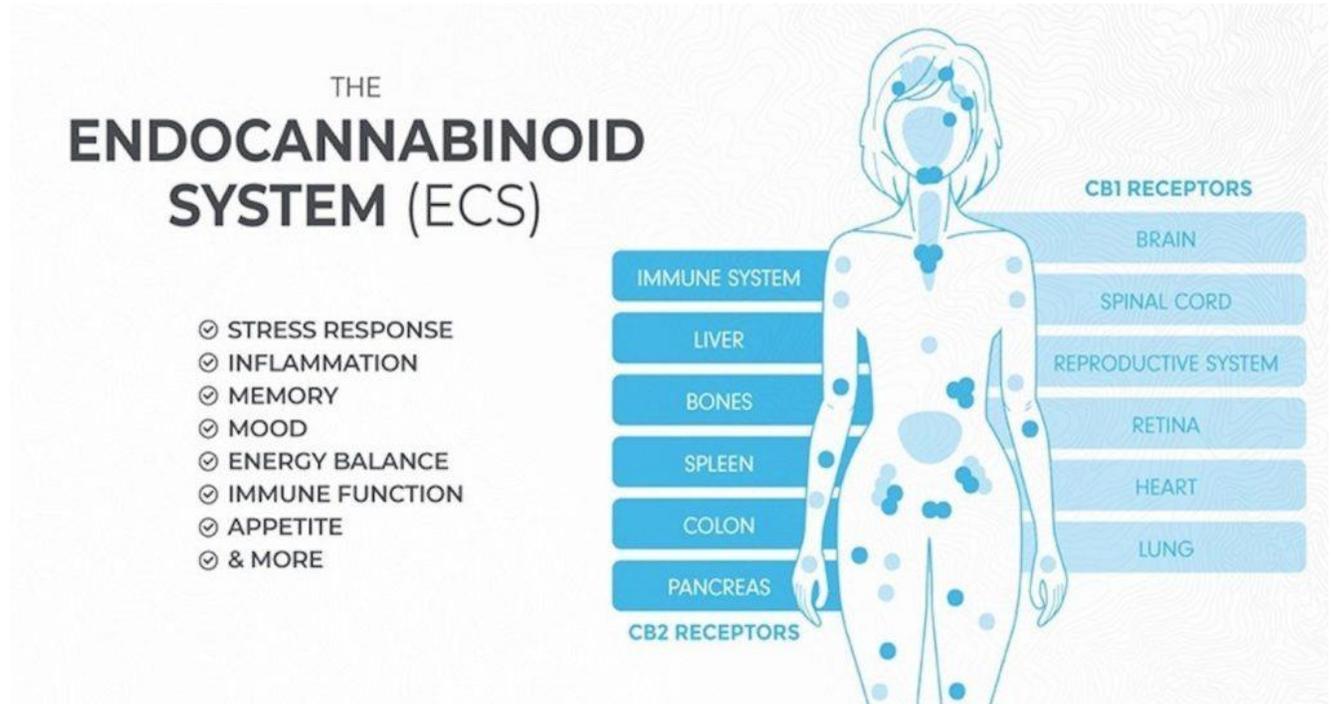


Figure 3 : Le système des endocannabinoïdes : localisation des récepteurs CB1 et CB2 et les différentes modulations engendrées à la suite de leur activation (11).

Ces cannabinoïdes peuvent être divisés en 2 catégories principales : les cannabinoïdes à effets psychotrope, soit le THC, et ceux sans effets psychotropes, soient le CBG, le CBN, et surtout le CBD.

- Le THC

Le tetrahydrocannabinol, ou THC, est l'un des cannabinoïdes majoritaires des plantes de cannabis. Cette substance a été identifiée en 1964 par les professeurs Raphael Mechoulam et Yechiel Gaoni de l'institut Weizmann de Rehovot. Cette molécule est de formule chimique $C_{21}H_{30}O_2$, de masse molaire 314.4617 ± 0.0195 g/mol, et de solubilité quasi nulle dans l'eau, de l'ordre de 2.8 mg par litre d'eau à 23°C, mais qui est assez élevée dans les solvants organiques tel que l'éthanol ou le méthanol, ainsi que dans les matières grasses tel que le beurre ou l'huile (6).

Cette molécule est la plus connue pour son effet psychotrope, qui est induit suite à sa fixation sur le récepteur neuronal au cannabinoïdes, le CB1, résultant en un sentiment de relaxation et d'euphorie. Le CB1 n'existe pas uniquement sur les cellules du système nerveux, mais aussi sur celles du cœur, des poumons, ainsi que de la moelle épinière et de la rétine.

Des effets palliatifs d'ordre analgésique et stimulant d'appétit sont ce qui a fait de ce cannabinoïde, dans sa forme naturelle de THC, ou synthétique de THC-V- une substance de 100 à 1000 fois plus active, un médicament prescrit pour plusieurs maladies, tel que les stades terminaux de cancer ou de syndromes d'auto-immunité pour atténuer les douleurs causées par la chimiothérapie, ainsi que pour la stimulation d'appétit chez ces mêmes individus ainsi que ceux atteints de troubles métaboliques comme l'anorexie (6, 12).

Cependant, des effets nocifs liés à la consommation du THC ont aussi été découverts. En effet, une revue récente de Gorey *et al.* a résumé l'impact de l'âge sur la consommation et la métabolisation du cannabis en se concentrant sur son effet sur l'attention, l'apprentissage et la mémoire chez les jeunes (moins de 18 ans) et les adultes (plus de 18 ans), qui fument quotidiennement ou presque ainsi que chez les rats jeunes et adultes. L'article a montré que de multiples lacunes et contradictions existent dans les études réalisées sur des humains et des rats en ce qui concerne l'effet du THC sur les domaines neuropsychologiques, mais que les jeunes fumeurs ont montré plus de déficit d'attention ainsi qu'un trouble de mémoire inférieur par rapport aux adultes, qui eux ont montré des troubles de la mémoire plus élevés (13). D'autant plus, il a été démontré qu'en se reliant à son récepteur CB2, le THC module à la baisse l'expression du TcR (14), ce qui confirme notre intérêt à étudier ce cannabinoïde lors d'une activation cellulaire immunitaire.

- Le CBD :

Le cannabidiol, 2^{ème} cannabinoïde majoritaire des plantes de chanvre après le THC, est un isomère de ce dernier. Il a donc la même composition et masse moléculaire et il est très liposoluble. Cependant, à la différence du THC, ce cannabinoïde n'a pas d'effets psychotropes, ce qui le rend très apprécié dans le domaine médical, où il est principalement utilisé pour le traitement d'inflammation, de convulsions, d'épilepsie et de nausées. Des études ont aussi montré que le CBD est capable d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses (15).

1.2. Le système immunitaire

1.2.1. L'importance des lymphocytes T :

La réponse immunitaire est la réaction de l'organisme à la pénétration d'un corps étranger, qui résulte en la production de cellules sensibilisées spécifiques destinées à neutraliser ou à éliminer le non soi.

Les lymphocytes T proviennent de la moelle osseuse et migrent par la suite vers le thymus pour leur maturation, sélection et exportation ultérieure vers la périphérie. En périphérie, on retrouve différents sous-ensembles des lymphocytes T, y compris les lymphocytes T naïves, qui ont la capacité de répondre à de nouveaux antigènes, les cellules T mémoires qui dérivent d'une activation antigénique précédente et qui maintiennent une immunité à long-terme, et les cellules effectrices qui contrôlent les réponses immunitaires (16).

Comme le résume la figure 4, l'activation des cellules T naïves se fait suite à la rencontre des antigènes et des ligands de costimulation présentés par les cellules dendritiques (DC). Cette rencontre entraîne la production d'interleukine 2 (IL-2) qui à son tour induit la prolifération et la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices qui migrent vers divers sites pour favoriser l'élimination des agents pathogènes. Les cellules effectrices activées ont pour la plupart une durée de vie courte. Cependant, une proportion survit sous forme de cellules T mémoires, qui persistent sous forme de sous-ensembles hétérogènes basés sur la migration, la localisation tissulaire et les capacités d'auto-renouvellement. Chaque sous-ensemble de mémoire peut participer au maintien de l'immunité à long terme et rappeler les réponses protectrices (17, 18).

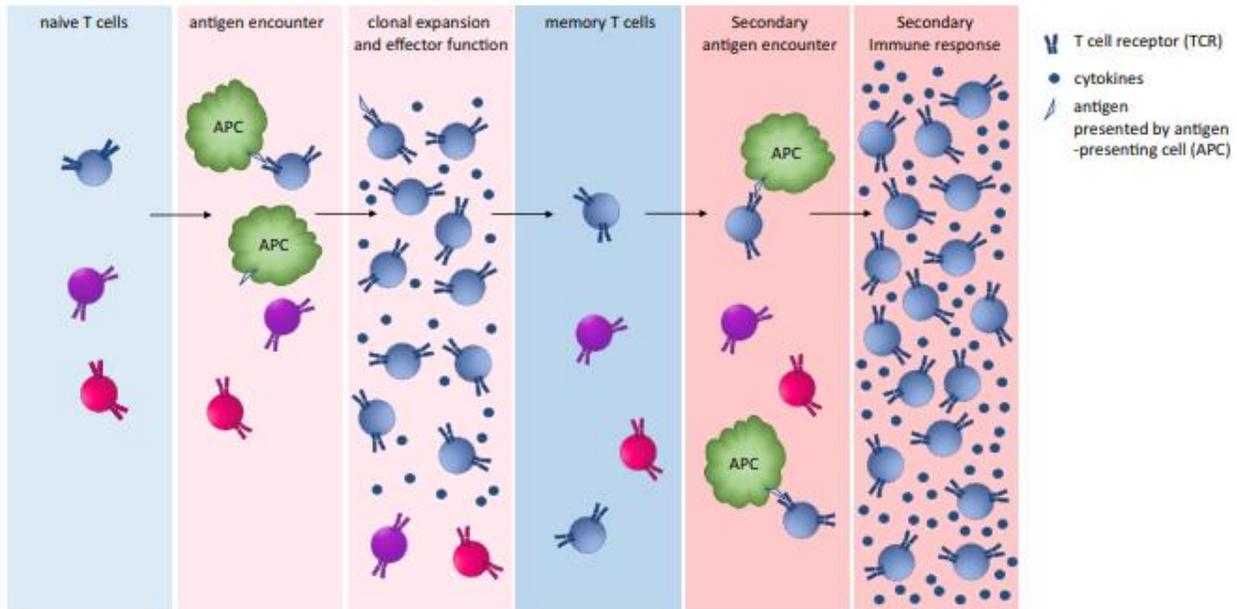


Figure 4 : Reconnaissance antigénique et expansion clonale des cellules T : Les cellules T naïves sont activées par les cellules présentatrice d'antigène, ce qui mène à leur expansion clonale et différenciation en effectrices et mémoires pour éliminer le pathogène en question via la sécrétion de cytokines. La constitution de mémoire est importante vu son rôle de reconnaissance et d'activation d'une réponse encore plus importante et rapide lors d'un 2ème contact avec l'antigène du même pathogène (16).

Cette réaction immunitaire est dirigée par les T-CD4s, qui sont majoritairement des helpers de différentes sous populations, sécrétant des cytokines visant à recruter différentes cellules du système immunitaire, dépendamment du non soi en question (19). Suite à leur activation, les T-CD4s activées secrètent des cytokines permettant leur différenciation en différents sous types selon la nature de l'antigène activant (figure 5) (20, 21). Elles sont donc essentielles dans l'élimination de toute sorte de pathogène, qu'il soit intracellulaire ou extracellulaire. Par la suite, la sous population différenciée recrute, selon le pathogène, les lymphocytes T-CD8s, les lymphocytes B, ou les macrophages, neutrophiles, éosinophiles et basophiles, en sécrétant une multitude de cytokines spécifiques à la population à activer. Ces cellules jouent aussi un rôle important dans l'induction et le contrôle des réactions allergiques (21, 22). La figure 5 illustre les différentes sous population des T-CD4s et le domaine d'interférence de chacune.

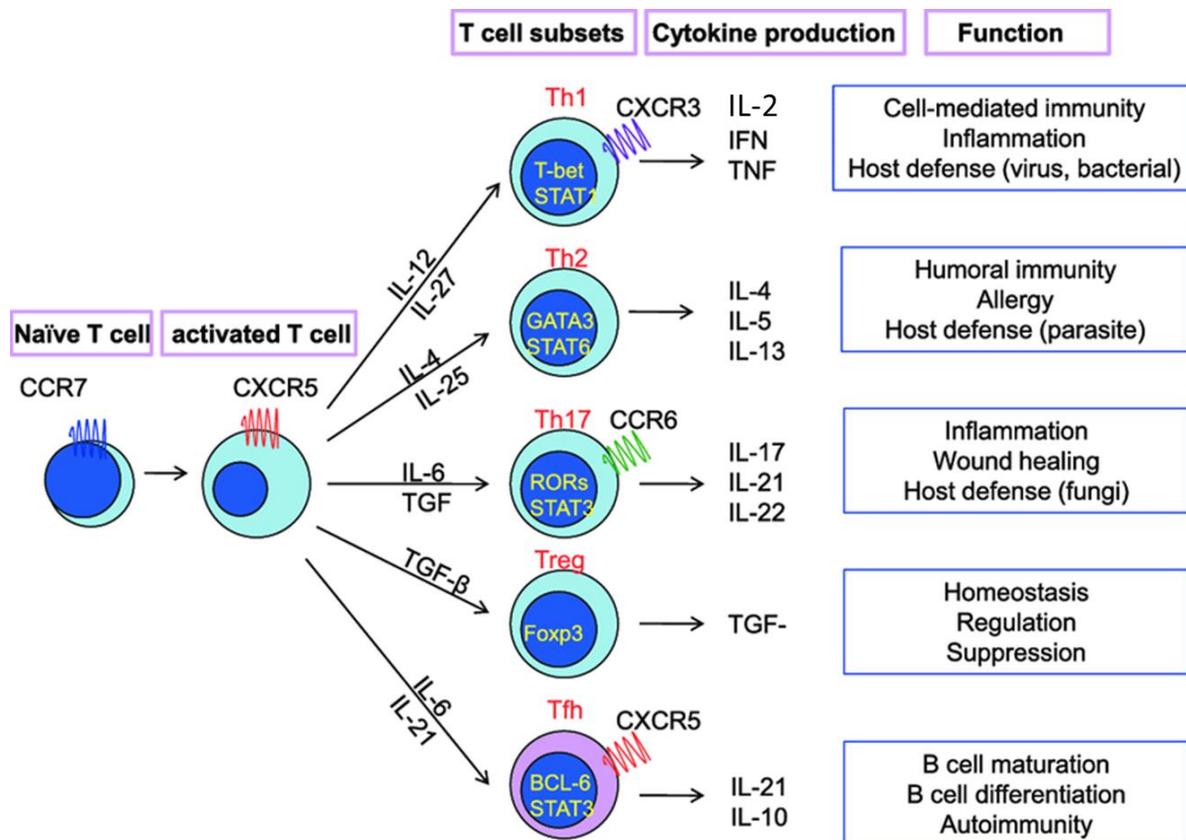


Figure 5 : Présentation des différentes sous populations des T-CD4s, les cytokines produites par chacune et leur rôle dans l'élimination des pathogène et la maintenance de l'homéostasie. La cellule T-CD4 naïve est activée par la présence d'antigène, et se différencie en l'une des sous populations en sécrétant un ensemble de cytokines bien défini. Une fois différenciée, cette sous population va sécréter un autre mix de cytokine spécifique à la population qu'elle veut recruter ou au rôle qu'elle doit jouer (23).

Comme illustré par la figure 6, dans le cas d'une infection virale, la sous population des T-CD4s concernée est la Th1. Afin d'assurer une clairance virale, ces cellules s'activent et produisent des cytokines antivirales induisant entre autres des réactions d'inflammation, la production d'anticorps par les lymphocytes B, et des réactions de cytotoxicité médiées par les T-CD8s cytotoxiques. Les T-CD8s produisent elles aussi des cytokines antivirales afin de combattre le pathogène en question (20, 24).

En fin de réaction immunitaire, des cytokines anti inflammatoires sont produites, et on retrouve des cellules mémoires circulantes dans le sang, dotées d'une capacité de reconnaissance plus raffinée pour le même pathogène en cas de second contact (18).

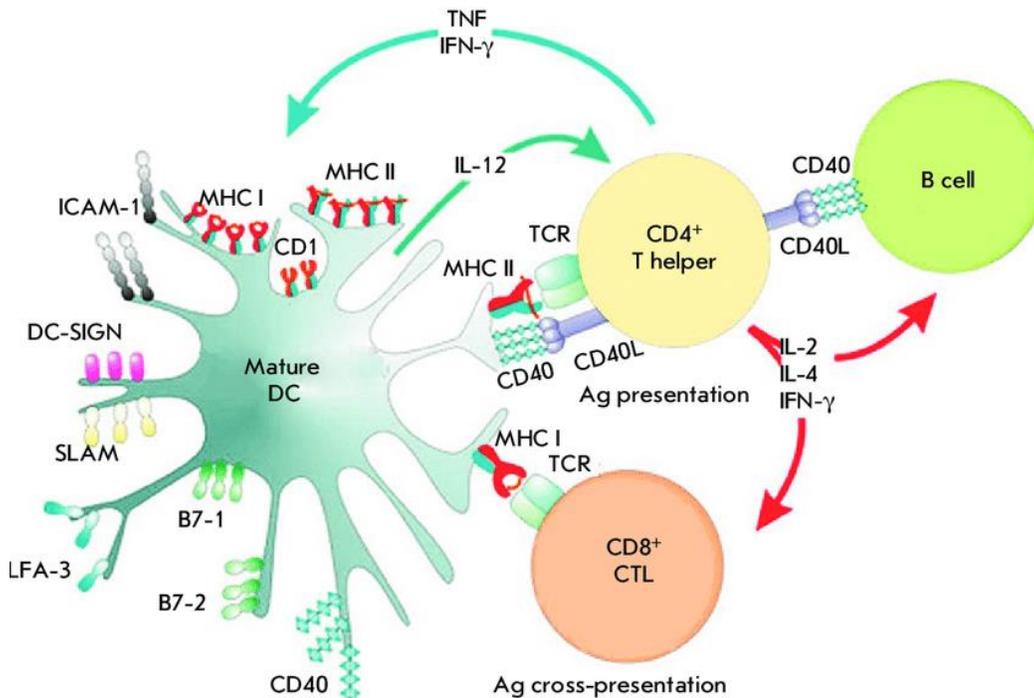


Figure 6 : Rôle des T-CD4s dans l'activation des cellules B et T : suite à leur activation par une cellule présentatrice d'antigène, les T-CD4s sécrètent des cytokines pour activer les lymphocytes T et B, et les activent directement suite à des interactions ligand-récepteurs dépendantes (25).

1.2.2. La production de cytokines par les T-CD8s et les T-CD4s :

La polyfonctionnalité cytokinique est définie par la capacité de la cellule à produire plusieurs (3 ou plus) cytokines de manière simultanée. Cette polyfonctionnalité est normalement retrouvée chez les lymphocytes T cytotoxiques ainsi que mémoires. Elle relève d'une plasticité métabolique, et confère aux cellules immunitaires un avantage protecteur contre les différentes infections virales et bactériennes, ainsi que contre les cancers et certaines maladies chroniques (26-29).

Plusieurs études concernant le rôle des lymphocytes T lors d'une infection virale montrent que l'expansion clonale et la différenciation des lymphocytes T joue un rôle crucial dans la réponse pro-inflammatoire, le contrôle de l'infection, ainsi que l'établissement de mémoire (30). Certaines études montrent d'autant plus qu'un déséquilibre dans la polyfonctionnalité des différentes sous populations de lymphocytes T, T-CD8s ou T-CD4s, peut être à la base du passage de l'infection d'un état symptomatique léger/bénin à sévère (31).

Pour notre étude, les cytokines pro-inflammatoires auxquelles on s'intéresse sont l'Interféron gamma (IFN γ), l'Interleukine-2 (IL-2), et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF α), qui sont sécrétées par les T-CD8s et les T-CD4s mémoires (18).

Ces cytokines sont connues pour leur rôle crucial dans la réponse cellulaire antivirale comme suit :

- L'IFN γ est crucial dans les fonctions protectrices contre les infections aiguës et/ou chroniques et les cancers. Pour la réponse antivirale, cette cytokine a des effets immunomodulateurs tel que le traitement et la présentation des antigènes, l'augmentation du flux de leucocytes, et l'induction d'un état antiviral. Il contribue aussi à renforcer les fonctions antimicrobiennes en affectant la prolifération cellulaire et l'apoptose (32-34). Quant à la réponse antitumorale, les fonctions cytostatiques, pro-apoptiques et antiprolifératives de l'IFN γ lui permettent d'inhiber l'angiogenèse dans le tissu tumoral, d'induire l'apoptose régulatrice des lymphocytes T et de stimuler l'activité des macrophages pro-inflammatoires pour surmonter la progression tumorale (35, 36). Ces fonctionnalités sont considérées potentiellement utiles pour l'immunothérapie adjuvante pour différents types de cancer (37, 38).
- Le TNF α est un régulateur clé des réponses immunitaires des mammifères chez les organismes sains et dans des conditions pathologiques (39). Il module le développement du système immunitaire, les voies de signalisation de la survie cellulaire, la prolifération cellulaire et la régulation des processus métaboliques. Cette cytokine aux effets pro-inflammatoires possède aussi une facette immunosuppressive, ou elle régule le ratio des cellules T naïves, effectrices, et régulatrice et peut induire l'apoptose des cellules T effectrices hautement activées (40). TNF α est étudié principalement dans le contexte de cancers, ainsi que de maladies auto-immunes et d'infections chroniques, ou cette cytokine est considéré comme point de contrôle immunitaire dans les thérapies dirigées contre l'hôte (41-43). Plusieurs études ont montré que le déséquilibre de la production de cette cytokine est délétère dans plusieurs maladies auto-immunes, ainsi que dans les réponses aux infections virales (44).
- L'IL-2 est une cytokine cruciale pour l'homéostasie du système immunitaire, plus particulièrement des lymphocytes T (45). Cette cytokine est un facteur de croissance des cellules T, essentielle à leur prolifération et à la génération de cellules effectrices et mémoires. Elle favorise la génération, la survie et l'activité fonctionnelle des cellules T régulatrices (Treg) et a donc des fonctions doubles : maintenir les cellules Treg pour contrôler les réponses immunitaires et stimuler les cellules T conventionnelles pour favoriser les réponses immunitaires (46). Outre le contrôle de transcription génomique, IL-2 assure ses différents rôles en régulant les programmes métaboliques des différentes

cellules cibles (47). Vu sa pléiotropie, plusieurs stratégies thérapeutiques innovantes basées sur des dérivés d'IL-2 sont à l'étude pour améliorer ou inhiber la réponse immunitaire (48).

La cytotoxicité cellulaire est définie par la capacité d'une cellule de tuer d'autres cellules. Ce mécanisme effecteur important du système immunitaire pour lutter contre les infections virales et le cancer est médié principalement par les cellules T cytotoxiques et les cellules tueuses naturelles (NK), secrétant des granules lytiques dont la biogenèse est un processus hautement régulé pour prévenir les dommages lors de la synthèse de ces molécules cytotoxiques (49, 50).

En plus, des études ont montré que les T-CD4s sont aussi dotés d'un potentiel cytolytique, leur permettant en plus de leur action antivirale cytokinique, d'engendrer la lyse directe de la cellule infectée (51).

Dans notre étude de la réponse cytotoxique, on s'intéresse à la Perforine et à la Granzyme B, principales composantes des granules lytiques, pour leur rôle crucial dans la réponse cytolytique, reflétant le potentiel cytotoxique des cellules T effectrices.

- La Perforine (Prf) est une glycoprotéine responsable de la formation de pores dans les membranes cellulaires des cellules cibles en se polymérisant pour former un canal dans la membrane cellulaire cible permettant le transport libre, non sélectif, et passif d'ions, d'eau, de substances à petites molécules et d'enzymes. La formation de ces canaux perturbe la barrière protectrice de la membrane cellulaire et détruit l'intégrité de la cellule cible (52, 53). Les dérégulations touchant à la Perforine résultent principalement en des maladies auto-immunes sévères (54, 55).
- La Granzyme B (GrzB) est molécule pro-inflammatoire multifonctionnelle qui contribue à la pathogenèse de différentes affections inflammatoires, y compris les maladies inflammatoires, aiguës et chroniques et le cancer (56, 57). Cette sérine protéase produite par une variété de cellules immunitaires, non immunitaires et tumorales a des fonctions intracellulaires apoptotiques et extracellulaires multiples tel que sa capacité à cliver les composants de la matrice extracellulaire (ECM), les cytokines, les récepteurs cellulaires et les protéines de coagulation, d'où son caractère pro-apoptotique (58, 59). Cette cytokine joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie immunitaire, et son déséquilibre, majoritairement dans le sens d'augmentation, peut induire plusieurs maladies auto-immunes sévères tel que les maladies Pemphigoides (60) ainsi qu'une réponse altérée aux inflammations chroniques et aux lésions tissulaires due entre autres

au clivage des protéines de la matrice extracellulaire (61, 62). Dans un contexte d'infection, la production de Granzyme B est cruciale, et indicative du bon fonctionnement de la réponse immunitaire (63) vu que les cellules T-CD8s spécifiques de l'antigène jouent un rôle majeur dans le contrôle de la plupart des infections virales bactériennes ou parasitaires, principalement par l'apoptose médiée par Granzyme B, tout comme pour les réponses antitumorales (64-66).

1.2.3. La plasticité métabolique des cellules T :

De plus en plus d'études s'intéressent à la reprogrammation métabolique médiant le changement fonctionnel des cellules immunitaires suite à leur activation polyclonale ou antigène-spécifique.

La reprogrammation métabolique aux stades d'activation des cellules immunitaires innées et adaptatives se fait principalement de deux manières :

1) la production d'énergie et la reprogrammation de la biosynthèse, y compris une glycolyse accrue et une phosphorylation oxydative réduite, afin d'accélérer la production et la biosynthèse d'ATP pour la défense et la réparation des dommages

2) la reprogrammation épigénétique, y compris l'amélioration de l'acétylation des histones et la suppression de la méthylation de l'ADN, en raison de l'accessibilité altérée du donneur de groupe acétyle/méthyle et de l'activité enzymatique modulée par les métabolites (67).

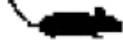
Dans une revue récente, notre équipe a détaillé l'impact profond de la plasticité du métabolisme mitochondrial sur l'activation, la différenciation, la quiescence et la fonction des lymphocytes T (52).

La respiration cellulaire, aussi appelée phosphorylation oxydative mitochondriale (OxPhoS), permet la production et la libération contrôlée d'énergie sous forme d'ATP à partir de diverses sources de molécules à base de carbone telles que les glucides, les lipides et les substrats énergétiques protéiques.

Dans leur état de repos, les cellules T naïves utilisent préférentiellement l'OxPhoS mitochondrial pour la production d'énergie. La sortie de l'état de quiescence et l'activation des lymphocytes T est métaboliquement exigeante: les cellules passent leur programmation métabolique de l'OxPhoS à la glycolyse caractérisée par son taux de génération d'ATP plus élevé et par sa fonctionnalité dans des conditions cellulaires hostiles tel que l'hypoxie (68, 69). Malgré que la glycolyse est la source principale d'énergie pour les cellules T activées, des études supplémentaires montrent qu'ils sont capables d'utiliser d'autres nutriments environnementaux

tels que la glutamine, la leucine, la sérine, l'alanine et l'arginine, ainsi que l'oxydation des acides gras (70, 71).

Tableau 1 : Les voies métaboliques des différents phénotypes des lymphocytes T à travers la littérature

Metabolic/ Catabolic player	T-cell phenotype	Experimental Model
Glycolysis	Lck-dependent T-cell activation	
	Polyfunctionality (IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺)	
	Effector memory CD8 T-cells functionality, Cytolytic activity & proliferation	
	Up-regulation of IFN- γ , GM-CSF, Granzyme B, Cyclin D2	
	Increased Naive CD8 T-cells CD69 ⁺ frequency	
	Increased Effector memory CD8 T-cells CD45RA ⁺ CD62L ⁻ IFN- γ production	
Naive CD4 T-cell; IL-2 Production Akt Lck-dependent		
OxPhos/FAO	CD8 T-cell long-term memory survival	
	Memory T-cell IL-15 induced generation	
	Prevent proinflammatory CD4 differentiation	
	Naive CD4 T cell IL-2 Production STAT5 Lck-dependent	
	effector CD4 T cell IFN- γ ⁺ & Treg differentiation High Foxp3 expression & AMPK phosphorylation, low Glut1 expression	
	enhanced memory CD8 T cell TRAF ⁺ Bcl-2 ^{low} Cpt1 ^{high}	
	Down-regulation of effector CD8 T-cells response IFN- γ ⁺	
	Memory CD8 ⁺ T-cell development LA1 ^{high}	

1.3. Effet des cannabinoïdes sur les lymphocytes T :

La consommation de drogues en général, et de cannabinoïdes en particulier, a plusieurs effets sur le système neuronal ainsi qu'immunitaire. Dans une revue récente, notre équipe a fait la synthèse des effets des cannabinoïdes sur les différentes cellules dans un contexte d'infection virale, en portant le focus sur la mitochondrie.

Une étude menée par Muthumalage et al. a montré que le CBD engendre une suppression de la production individuelle d'IL-2, d'IFN γ et de TNF α (72).

Les mitochondries jouent un rôle crucial dans l'apoptose de diverses manières intrinsèques et extrinsèques (73, 74). Les études concernant donc l'effet du cannabinoïdes sur les mitochondries tournent donc pour la plupart autour de l'apoptose. L'une de ces études a été menée par Wu et al. a montré que le CBD engendre l'apoptose chez les monocytes en modifiant le potentiel mitochondrial ainsi qu'en augmentant la libération du cytochrome c (75).

Concernant les effets non apoptotiques de la mitochondrie suite au traitement au cannabinoïdes, des études concernent principalement la production des espèces réactives d'oxygène et la modulation de la respiration mitochondriale (72). Dans leur article, Schultze et al. démontrent que le CBD réduit à la fois la respiration maximale et la capacité respiratoire de réserve des monocytes THP-1 (76). Une autre voie non apoptotique potentielle que modulent les cannabinoïdes chez les mitochondries est la signalisation calcique qui est connu pour être cruciale pour des réponses immunitaires appropriées (77). Ceci est particulièrement intéressant étant donné que l'apport de Ca²⁺ est nécessaire pour la stimulation des récepteurs des lymphocytes T (78). Dans ce contexte, Olivas-Aguirre et al. ont démontré que le CBD favorise l'absorption mitochondriale du Ca²⁺ dans la leucémie lymphoblastique aiguë des cellules de la lignée T, ce qui conduit à une perte de potentiel membranaire mitochondrial et à une perturbation des crêtes et à la production d'ATP, entraînant par conséquent une mitophagie. À une concentration sub-létale, ils démontrent que le CBD induit une conversion de LC3-I en LC3-II, montrant une activation de l'autophagie (79).

La disponibilité d'études concernant l'effet du CBD sur le système immunitaire, et non pas celles du THC, nous pousse à nous intéresser d'avantage aux effets potentiels du THC, autre cannabinoïde majeur consommé pour son effet psychotrope, sur le système immunitaire, et en particulier les cellules T-CD8s et T-CD4s (Th1).

2. Méthodologie :

2.1. Matériel chimique :

2.1.1. Licence d'utilisation de cannabis :

La plante de cannabis, ainsi que les substances cannabinoïdes qui en sont extraites sont réglementée par le gouvernement du Canada.

Afin de conduire une étude où ces substances sont utilisées, une licence d'utilisation doit être obtenue. Pour ce faire, un dossier doit être soumis à « Santé Canada » et approuvé par un représentant légal du gouvernement. Ce dossier contient des informations sur le détenteur de la licence demandée, les membres du laboratoire et toute personne susceptible à rentrer en contact avec la substance en question, ainsi que sur le sujet de recherche, les protocoles utilisés, Il prend aussi en considération le fournisseur et les mesures de sécurité quant au lieu de stockage.

D'autant plus, pour s'assurer que le détenteur de licence ne dépasse pas ses limites de détention, de stockage, et d'utilisation de cannabis qu'il a présentées lors de la soumission de sa demande, fiche de suivi d'utilisation du cannabis et des substances cannabinoïdes.

Notre licence de détention de cannabis, ainsi que la fiche de suivi d'utilisation sont respectivement présentées en annexe 1 et 2.

2.1.2. Dose utilisée :

Tout au long de notre étude, une dose de 10 μ M de THC a été utilisée pour le traitement de nos cellules. Cette dose est la même utilisée dans d'autres études en immuno- et neuro- toxicologie s'intéressant aux effets du THC.

2.2. Matériel biologique :

2.2.1. Certificat d'éthique :

Afin de collecter, de stocker, et de manipuler du matériel humain, une certification de conformité aux normes d'éthiques du centre de recherche doit être allouée au projet. Pour l'obtention de ce certificat, une demande couvrant les différents aspects de la recherche en question, le matériel biologique à manipuler, ainsi que les personnes menant la recherche et ceux participants, doit être déposée et approuvée par le comité d'éthique en recherche. D'autant plus, ce certificat

assurance la confidentialité des données collectées, ainsi que leur destruction une fois le projet terminé.

Le certificat nous permettant de travailler avec du matériel biologique provenant des participants de notre centre INRS-AFSB nous a été accordée le 20 novembre 2020 (Annexe 3).

2.2.2. Manipulation du matériel biologique :

a. Préparation et stockage des CMSPs

Les cellules mononuclées du sang périphérique (CMSPs), sont principalement des lymphocytes (Lymphocytes T, B et NK), des monocytes en moyenne quantité, et en un plus faible pourcentage des cellules dendritiques.

Nos CMSPs proviennent principalement de donneurs appartenant au réseau SIDA et maladies infectieuses, ainsi que de chez nos collaborateurs, et de nos donneurs locaux de l'INRS-AFSB.

Une fois la récolte du sang des donneurs est faite, les CMSPs sont isolées du reste des constituants du sang selon un protocole d'isolement par un gradient de Ficoll.

Les CMSPs sont ensuite transférés dans des cryovials, et sont stockés dans un tank à azote liquide, en utilisant un milieu de congélation composé à 80% de RPMI, à 10% de Sérum Foetal Bovin (FBS), et à 10% de Diméthylsulfoxyde (DMSO), suivant ce protocole désigné pour une concentration cellulaire de 100 millions de cellules par ml.

Pour notre projet, nos cellules sont stockées dans des vials codifiées, organisés en différentes boites dans plusieurs racks d'un tank à Azote liquide. Leur température est donc maintenue à -80°C. Les concentrations en CMSPs de nos vials peuvent varier, et sont d'habitude de l'ordre de 50, 100, ou 200 millions de CSMPs par millilitre. En moyenne, Une vial contient entre 1 et 1.5 ml.

Afin de conduire une expérience, les CMSPs de 6 individus différents, sont récoltés des boites du tank d'Azote et décongelés selon le protocole suivant :

b. Purification des T-CD8s :

Les T-CD8s étant nos cellules d'intérêt, on procède pour certaines expériences, principalement celles d'immunometabolisme, à leur purification. Ceci se fait grâce au kit de purification à sélection négative EasyStep des T-CD8s, vendu par la compagnie StemCell, utilisant 2 solutions A et B, et un aimant selon le principe suivant : La solution A est une solution d'anticorps reconnaissant toutes les populations cellulaires à l'exception de notre population d'intérêt, étant les lymphocytes T. La solution B est une solution de billes magnétiques qui se fixent sur les

anticorps de la solution A ayant reconnu des cellules. Sous l'effet du champ magnétique créé par l'aimant, les billes magnétiques fixées aux anticorps couplés aux cellules seront fixées sur la paroi du tube, et nos cellules d'intérêt seront les seules restantes dans la solution élue.

2.3. Marquage cytométrique :

Marquage cellulaire

La principale voie de marquage utilisée lors de nos expériences est la coloration par immunofluorescence. Cette technique d'immunomarquage est basée sur l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes qui sont des substances chimiques émettant de la lumière si excités à une certaine longueur d'onde, permettant ainsi de révéler la présence d'une protéine spécifique directement dans la cellule, par émission de fluorescence (80).

Polyfonctionnalité et activité cytotoxique

Pour cibler ~~simultanément nos cellules ainsi que nos cytokines~~ nos cellules ainsi que nos cytokines dont des fonctionnalités d'intérêt, on a procédé à un marquage de ces dernières en utilisant un cocktail d'anticorps couplés à des fluorochromes à différents spectres d'émissions.

Pour les cellules, on procède à un marquage de surface, vu que les cellules expriment leurs marqueurs cellulaires à leurs surfaces. Cependant, pour discerner nos cytokines d'intérêt, on procède en premier à une étape de fixation cellulaire en utilisant du 4% Paraformaldéhyde (PFA), un agent chimique qui préserve les tissus en formant des liaisons croisées covalentes entre les molécules, suivie d'une étape perméabilisation membranaire à la saponine avant de passer à un marquage intracellulaire vu que les cytokines sont exprimées dans les cellules avant d'être expulsées dans l'environnement cellulaire. Cette sécrétion des cytokines de l'environnement intracellulaire à l'extracellulaire est bloquée grâce à l'ajout de GolgiPlug/GolgiStop, qui est constitué de Brefeldin A et Monensin, capable de bloquer le flux vésiculaire de l'appareil de Golgi.

Pour notre projet, nos cellules d'intérêts étant les T-CD8s et mémoires T-CD4s, on a utilisé les marqueurs de surface suivants : CD3-AF700, CD4-BV650, CD8-PE, et le CD45RA-APC-H7 pour étudier les cellules mémoires. Pour quantifier la viabilité de nos cellules, on a utilisé le 7AAD. Pour l'étude du pouvoir cytolytique ainsi que la polyfonctionnalité des cellules, on s'est focalisé sur les cytokines marquées suivantes : IFN γ -AF647, IL-2-FITC, TNF α -V450, Granzyme B-PE CF594, et Perforine-PerCP Cy5.5.

Expression d'un marqueur du métabolisme lipidique

Pour la vérification de l'effet du THC sur le métabolisme lipidique, on a utilisé la plateforme de cytométrie en flux pour évaluer l'expression du CPT1a, qui est un récepteur mitochondrial des acides gras. L'anticorps utilisé pour ce récepteur est couplé au fluorochrome AF488.

2.4. Plateformes d'analyse des données :

2.4.1. La cytométrie en flux :

a. Définition :

La cytométrie en flux est un système de détection de cellules contenues dans une solution saline physiologique grâce à leur marquage avec des anticorps couplés à des fluorochromes, qui excités par un laser, émettent une fluorescence qui est mesurée et convertie en données numérisées (81).

b. Principe :

Parallèlement au passage de la suspension cellulaire à travers le canal central du cytomètre, un fluide de gaine à écoulement plus rapide est utilisé pour focaliser hydro-dynamiquement la suspension cellulaire à travers une petite buse. Ce minuscule flux de fluide fait passer les cellules à travers une lumière laser, une cellule à la fois. Ceci se fait dans des conditions optimales d'écoulement laminaire, où le fluide dans la chambre centrale ne se mélangera pas avec le fluide gaine (82).

Par la suite, la lumière diffusée par les fluorochromes couplés aux anticorps fixés aux cellules est détectée lorsqu'elles traversent le faisceau de laser. Pour avoir différentes informations concernant nos cellules, plusieurs détecteurs de photons sont mis en place : Un détecteur devant le faisceau lumineux mesurant la diffusion vers l'avant (FS) ainsi que des détecteurs sur le côté mesurant la diffusion latérale (SS).

Lorsque la lumière frappe un photodétecteur, un très faible courant de quelques microampères, dont la tension a une amplitude proportionnelle au nombre total de photons lumineux reçus par le détecteur est généré. Cette tension est ensuite amplifiée par une série d'amplificateurs, linéaires ou logarithmiques, et des convertisseurs analogiques-numériques, en signaux électriques suffisamment pour être tracés graphiquement.

c. Utilité :

La plateforme de cytométrie est d'une utilité majeure dans notre projet. Grâce à la disponibilité des différents anticorps couplés à des fluorochromes à spectre d'émission distincts, cette technique nous permet d'évaluer plusieurs cytokines intracellulaires simultanément. D'autant plus, cette technique nous permet de regarder différentes populations cellulaires à partir du sang périphérique sans avoir à effectuer des étapes préalables de purification. Ce marquage à base d'anticorps permet aussi d'identifier des populations minoritaires, quantitativement moins représentées dans le sang.

Pour notre étude, cette plateforme a été utilisée pour cibler différentes sous populations des lymphocytes T, étant les T-CD8s et T-CD4s et la production cytokinique associée à chacune, qu'elle soit individuelle ou simultanée.

d. Approche d'analyse des données :

Les mesures obtenues grâce aux détecteurs, par exemple la diffusion vers l'avant, diffusion latérale ou fluorescence sont appelées des « paramètres ». Les données acquises dans chaque paramètre sont appelées « événements » et se réfèrent au nombre de cellules affichant la caractéristique physique ou le marqueur d'intérêt.

L'analyse des données se fait comme suit :

- La sélection de la population des lymphocytes T : Cette sélection se fait en premier en se basant sur la taille et la granulosité des cellules. Pour ce faire, on utilise les données des détecteurs FSC = f (SSC). Par la suite, on procède à l'annulation des doublets, étant 2 lectures de la même cellule.
- La sélection des cellules vivantes : Pour ce faire, on utilise les données relatives au marquage au 7AAD. Le 7AAD est un agent chimique capable de s'intercaler entre les bases d'ADN de la double hélice des cellules mortes. Pour sélectionner nos cellules vivantes, on crée une fenêtre de tri (gating) sur les cellules non marquées au 7AAD, qu'on appellera 7AAD^{neg}.
- La sélection de la population d'intérêt : Pour notre étude, notre population d'intérêt est les lymphocytes T-CD8s. La sélection de cette population lymphocytaire se fait en se basant sur leurs clusters de différenciations exprimés à leurs surfaces et donc marqués par nos différents marqueurs de surface. La sélection des lymphocytes T se fait en sélectionnant

les CD3+, et celle des lymphocytes T-CD8s se fait sur la population CD3+ en ajoutant le marqueur CD8.

- L'étude de l'expression des molécules d'intérêts : Pour la partie cytokinique du projet, le focus a été porté principalement sur l'Interféron gamma (IFN γ), l'Interleukine 2 (IL2) et la Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) comme cytokines antivirales, ainsi que sur la Granzyme B (GrzB) et la Perforine (Prf) comme cytokines cytolytiques. Ceci se fait en se basant sur l'émission de fluorescence par les fluorochromes couplés aux marqueurs intracellulaire, et en comparant cette fluorescence à la fluorescence de base du fluorochrome en procédant par un marquage isotopique d'un tube marquant chaque condition étudiée.

Les figures 9 et 10 du chapitre Résultats illustrent la stratégie de gating utilisée lors de nos expériences.

2.4.2. Le Seahorse

a. Principe:

Le test de stress Agilent Seahorse XF Cell Mito mesure les paramètres clés de la fonction mitochondriale en mesurant directement le taux de consommation d'oxygène (OCR) des cellules sur les analyseurs de flux extracellulaires Seahorse XFe et XF. Il s'agit d'un test de cellules vivantes sur plaque qui permet de surveiller l'OCR en temps réel.

La capacité d'évaluer la fonction mitochondriale a permis aux chercheurs de faire progresser leur compréhension du rôle clé du métabolisme dans la physiologie cellulaire, la pathologie de la maladie et l'étiologie. Le Seahorse XF Cell Mito Stress Test est le test de référence et est largement utilisé pour mesurer la fonction mitochondriale dans les cellules.

Ce test donne un aperçu de la cause du dysfonctionnement mitochondrial et une compréhension approfondie des voies métaboliques, des signaux et des phénotypes.

Le test utilise les ports d'injection intégrés sur les cartouches de capteur XF pour ajouter des modulateurs de respiration dans le puits cellulaire pendant le test afin de révéler les paramètres clés de la fonction mitochondriale. Les modulateurs inclus dans ce kit de dosage sont :

- L'oligomycine inhibe l'ATP synthase (complexe V) et est injectée en premier dans le dosage après les mesures basales. Il affecte ou diminue le flux d'électrons à travers l'ETC,

entraînant une réduction de la respiration mitochondriale ou OCR. Cette diminution de l'OCR est liée à la production d'ATP cellulaire.

- Le cyanure de carbonyle-4 (trifluorométhoxy) phénylhydrazone (FCCP) est un agent de découplage qui effondre le gradient de protons et perturbe le potentiel membranaire mitochondrial. C'est la 2ème injection après l'Oligomycine. En conséquence, le flux d'électrons à travers l'ETC n'est pas inhibé et la consommation d'oxygène par le complexe IV atteint le maximum. L'OCR stimulée par FCCP peut ensuite être utilisée pour calculer la capacité respiratoire disponible, définie comme la différence entre la respiration maximale et la respiration basale. La capacité respiratoire de réserve est une mesure de la capacité de la cellule à répondre à une demande énergétique accrue ou à un stress.
- La troisième injection est un mélange de roténone, un inhibiteur du complexe I, et d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III. Cette combinaison arrête la respiration mitochondriale et permet le calcul de la respiration non mitochondriale entraînée par des processus extérieurs aux mitochondries.

b. Expériences réalisées :

Pour le profil/côté d'immunométabolisme de notre étude, on a utilisé cette plateforme pour tester l'effet d'une dose de 10µM de THC sur la voie de la beta oxydation des lipides assurant la plasticité métabolique des cellules T.

Ceci a été fait en incorporant les différentes drogues agissant sur les différentes voies métaboliques investiguées comme montré dans la figure 5. L'évaluation des différents profils métaboliques se fait en mesurant les composantes suivantes de la respiration mitochondriale :

- Respiration mitochondriale : Consommation d'oxygène utilisée pour répondre à la demande cellulaire en ATP résultant de la fuite de protons mitochondriaux. Affiche la demande énergétique de la cellule dans des conditions de base.
- Production d'ATP : la diminution du taux de consommation d'oxygène lors de l'injection de l'oligomycine, inhibiteur de l'ATP synthase, représente la partie de la respiration basale qui était utilisée pour stimuler la production d'ATP. Montre l'ATP produit par les mitochondries qui contribue à répondre aux besoins énergétiques de la cellule.

- Fuite H⁺ (Proton) : Respiration basale restante non couplée à la production d'ATP. Une fuite de protons peut être le signe d'une lésion mitochondriale ou peut être utilisée comme mécanisme pour réguler la production d'ATP mitochondrial.
- Respiration maximale : Le taux de consommation maximale d'oxygène atteint en ajoutant le découpleur FCCP. Le FCCP imite une « demande énergétique » physiologique en stimulant la chaîne respiratoire à fonctionner à sa capacité maximale, ce qui provoque une oxydation rapide des substrats (sucres, graisses et acides aminés) pour relever ce défi métabolique. Affiche le taux de respiration maximal que la cellule peut atteindre.
- Capacité respiratoire de réserve : Cette mesure indique la capacité de la cellule à répondre à une demande énergétique ainsi que la proximité de la cellule à respirer à son maximum théorique. La capacité de la cellule à répondre à la demande peut être un indicateur de l'aptitude ou de la flexibilité de la cellule.
- Respiration non mitochondriale : consommation d'oxygène qui persiste en raison d'un sous-ensemble d'enzymes cellulaires qui continuent à consommer de l'oxygène après l'ajout de roténone et d'antimycine A. Ceci est important pour obtenir une mesure précise de la respiration mitochondriale.

Pour l'investigation du profil métabolique relié à la bêta oxydation des lipides, le test de Mitostress a été effectué en apportant quelques modifications pour s'assurer du blocage des autres voies métaboliques possibles. Un prétraitement consistant en une période de «privation» des cellules a été nécessaires pour favoriser la voie d'oxydation lipidique comme source principale d'énergie cellulaire.

Experimental Design Immunometabolism

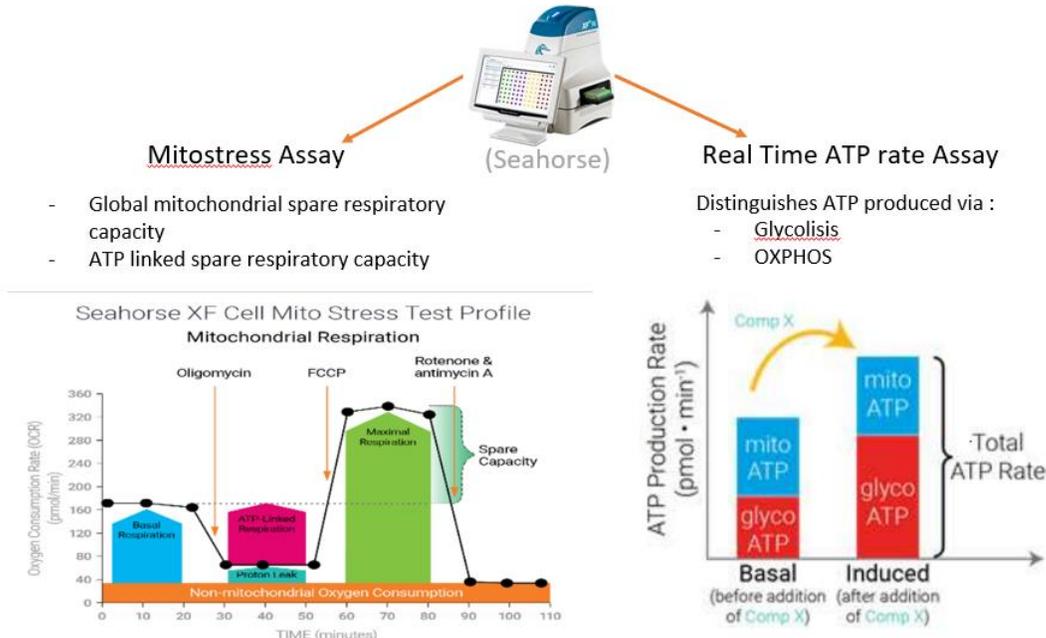


Figure 7 : Les différentes expérimentations possibles par le Seahorse.

c. Protocole suivi :

Le protocole général de Seahorse utilisé dans notre laboratoire a été adapté et optimisé par Hamza Loucif, à partir du protocole fourni par la compagnie Agilent, pour pouvoir travailler avec des cellules primaires, de petites tailles, et non fixées.

Ce protocole a été d'autant plus optimisé par Hamza Loucif, Xavier Dagenais Lussier et moi-même Cherifa Beji pour pouvoir incorporer une nouvelle drogue, étant le THC, dans le processus utilisé.

2.5. Conditions expérimentales :

Nos expériences, dont le design est illustré dans la figure 6, ont été chacune effectuée en utilisant les CMSPs de 6 patients homogènes (adultes, hommes, HIV⁻, CMV⁻) et répétées 3 fois dans des conditions similaires pour assurer leur reproductibilité.

Pour l'étude de l'effet du THC sur la plasticité métabolique des CD8s assurée par la voie de bêta oxydation des lipides, une étape de purification des CD8s a été nécessaire afin de pouvoir évaluer précisément les effets sur cette population d'intérêt.

Pour ce qui suit, on va référer aux différentes conditions comme suit :

Tableau 2 Conditions expérimentales

Condition	Appellation
Non activation – sans traitement THC	NA
Activation polyclonale – sans traitement THC	TcR
Non activation + sans traitement THC	NA-THC
Activation polyclonale + sans traitement THC	TcR-THC

Et aux différents patients comme suit :

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et démographiques des donneurs participant à l'étude

Patient	ID	Age (ans)	Sexe	Conditions immunologiques
1	IAF2422	28	M	HIV ⁻ , CMV ⁻
2	IAF2433	41	M	HIV ⁻ , CMV ⁻
3	IAF2442	40	M	HIV ⁻ , CMV ⁻
4	HP1	30	M	HIV ⁻ , CMV ⁻
5	HP55	59	M	HIV ⁻ , CMV ⁻
6	HP62	61	M	HIV ⁻ , CMV ⁻

Experimental Design

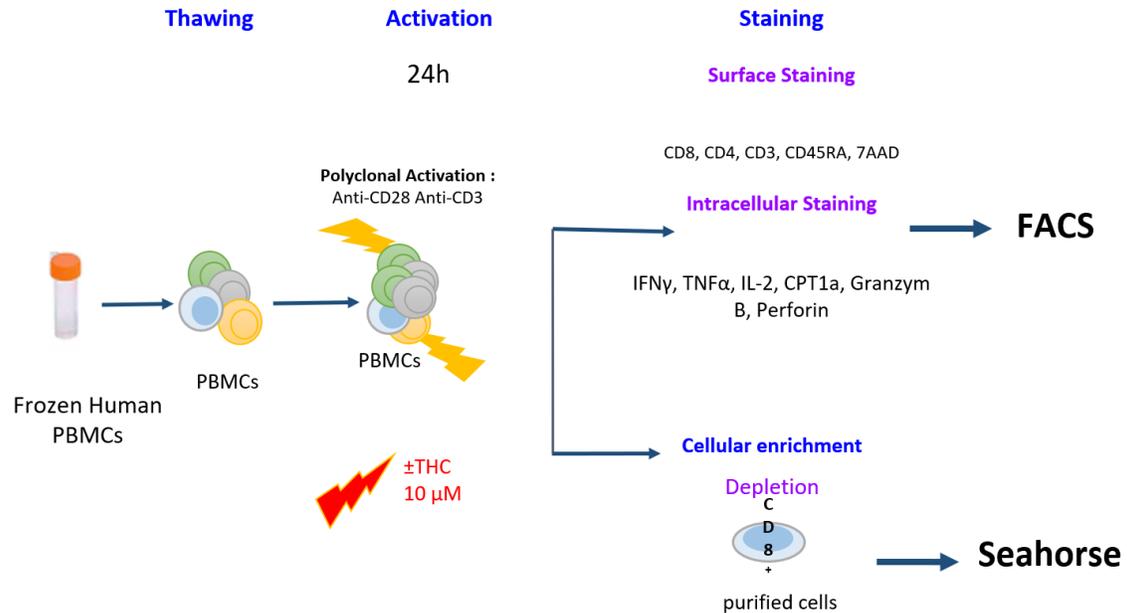


Figure 8 : Schématique de l'étude : les CMSPs sont décongelées et activées de manière polyclonale pendant 24h en présence ou en absence d'une dose de $10 \mu\text{M}$ de THC. Elles sont par la suite soit :

- a. marquées en cellules et en intracellulaires grâce aux anticorps fluorescents pour être analysées au FACS, ou
- b. purifiées grâce au kit d'isolation des T-CD8s pour effectuer des tests métaboliques dans les perspectives de l'étude.

2.6. Logiciels utilisés et tests statistiques :

L'analyse des données cytométriques a été faite grâce au logiciel BD FACS Diva. Les données brutes de pourcentage de positivité pour l'expression cytokinique et de MFI pour l'expression du CPT1a sont enregistrées sous forme de csv, ensuite organisés dans différents documents Excell ou les moyenne et valeurs d'écart-type (SD) sont déterminés en utilisant les fonctions respectives prédéfinies par Microsoft Excell.

Les figures ont été réalisées sur le logiciel Graphpad Prism, et le calcul statistique a été effectué en utilisant un 'paired t-test' avec une distribution gaussienne utilisant le même logiciel.

3. Résultats

3.1. Analyses cytométriques :

La plateforme de cytométrie en flux nous a permis de regarder, à partir de CMSP, différentes populations lymphocytaires en utilisant un cocktail multiparamétrique d'anticorps permettant de gâter sur les populations et nos cytokines d'intérêt comme montré dans la figure 9 et 10 respectivement.

Le premier gating nous a permis de sélectionner notre population lymphocytaire. Le deuxième gating permet d'enlever les doublets. Par la suite, un gating se fait en fonction du 7AAD, en choisissant la population négative, vu que le 7AAD s'intercale dans l'ADN des cellules mortes. En moyenne, notre pourcentage de viabilité est plus élevé que 95%, ce qui nous permet de valider que notre congélation et décongélation des cellules était faite dans des conditions optimales, sans que les cellules ne soient mortes ou mises sous stress dans les deux processus.

Les réponses cellulaires antivirales sont assurées par les lymphocytes T seulement, la prochaine étape serait donc d'éliminer nos lymphocytes B. Ceci se fait en sélectionnant les populations exprimant à leur surface le CD3.

Comme mentionné dans la littérature, les réponses antivirales à médiation cellulaire, sont assurées par les T-CD4s ainsi que les T-CD8s. En se basant sur les marqueurs CD4 et CD8, on peut séparer nos deux populations pour pouvoir par la suite sélectionner les différents expressions cytokiniques là-dessus comme démontré dans les figure 9 et 10.

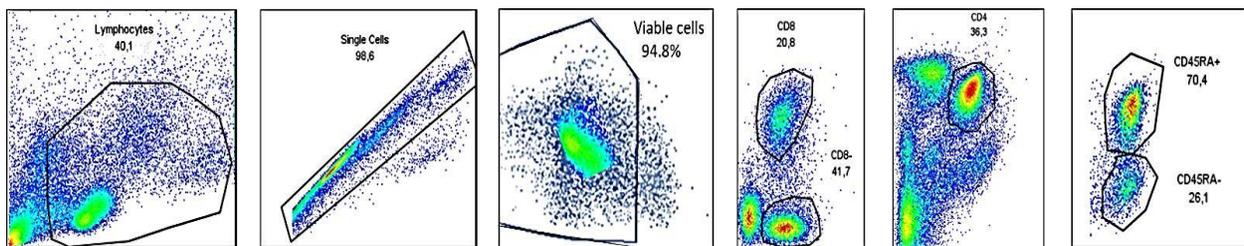


Figure 9 : Stratégie de Gating des lymphocytes T

Pour le gating des cellules exprimant des cytokines, on se fie toujours au marquage d'isotype. Ce marquage se fait dans un tube séparé, ou on met un contrôle isotypique négatif (ISO) pour chaque anticorps spécifique à un cytokine d'intérêt, qui a le même

fluorochrome, mais qui est non-spécifique. Le gating positif, relatif à chaque cytokine se fait à droite de son signal ISO. Comme on peut le voir dans la figure 8, et en comparant les histogrammes pour chaque cytokine par rapport à son ISO, on peut voir qu'il y a un shift général vers la droite dans sa position. Ceci nous confirme un bon marquage positif de la cytokine en question.

Par la suite, en comparant les valeurs d'expression de la cytokine, on remarque que celle-ci augmente suite à l'activation cellulaire polyclonale par rapport à la condition de non-activation, et qu'elle diminue suite au traitement de nos cellules activées par le THC. On remarque aussi qu'en condition de non-activation, le traitement au THC n'a pas d'effet remarquable sur l'expression cytokinique.

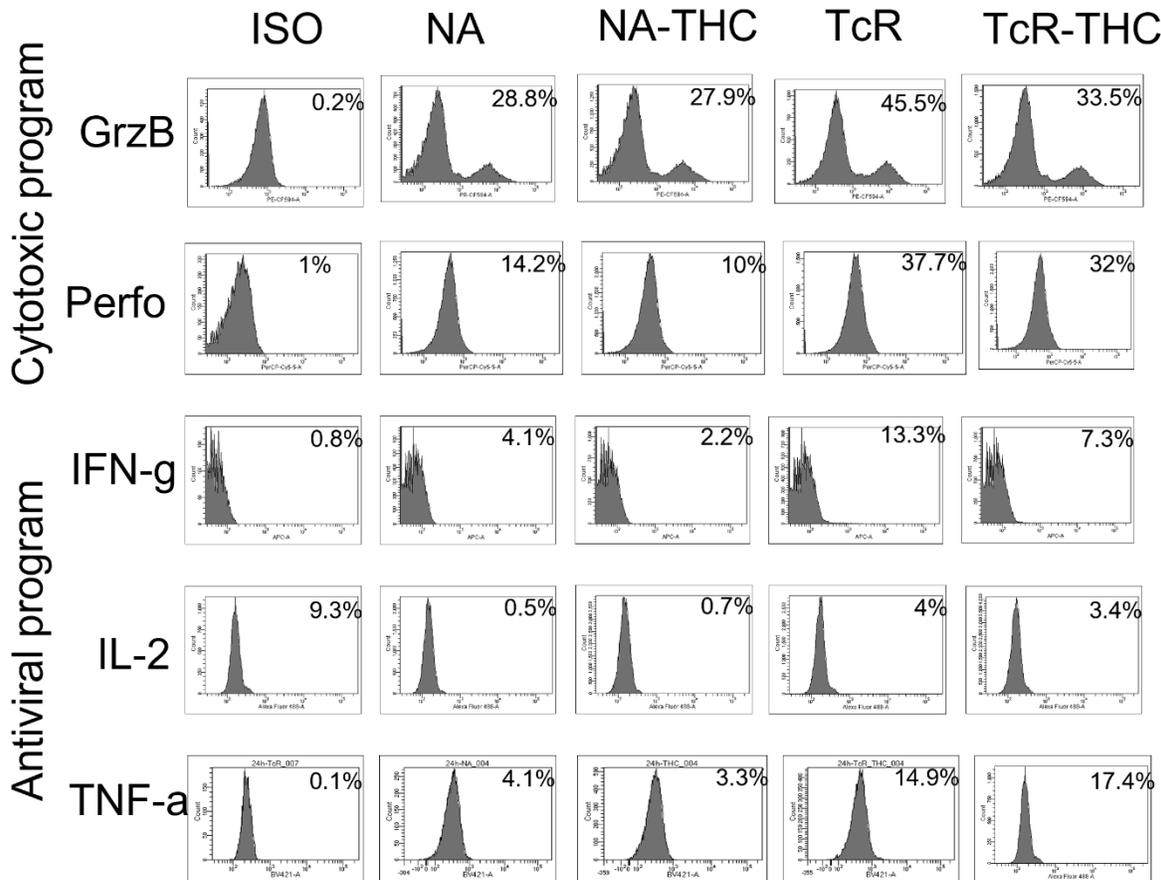


Figure 10 : Stratégie de gating des cytokines d'intérêt. Afin de quantifier la vraie expression cytokinique, on se réfère au contrôle isotypique (première colonne) pour identifier le signal non spécifique (bruit de fond) et négatif du fluorochrome. La partie à sa droite est là où on s'attend à un signal positif d'expression cytokinique, dont l'intensité va varier selon la condition d'activation et de traitement.

3.2. Le THC diminue la polyfonctionnalité :

La polyfonctionnalité étant la réflexion de la production totale des cytokines d'intérêt, on s'est intéressé en premier lieu à l'étude de l'effet du THC sur la production individuelle de ces cytokines.

On rappelle que nos différents tests ont été fait sur 6 échantillons provenant d'une cohorte homogène de 6 patients. Les figures ont été réalisées sur le logiciel Graphpad Prism, et le calcul statistique a été effectué en utilisant un 'paired t-test 'avec une distribution gaussienne. La significativité de nos résultats pour chaque cytokine antivirale étudiée est exprimée numériquement sur les tableaux annexés 8 et 9, ainsi que les valeurs individuelles d'expression cytokiniques et leur moyenne pour chaque condition.

Nos résultats montrent que la production individuelle de chacune des 3 cytokines, en condition de non-activation n'est pas statistiquement affectée par le traitement au THC. Cette production augmente de manière très significative à la suite de l'activation polyclonale de 24h. On remarque par la suite une diminution de cette production par les cellules activées lors du traitement au THC.

Concernant l'effet du THC sur ces cytokines en condition d'activation, on a trouvé une inhibition individuelle de la production de l'IFN γ et de l'IL-2. Cependant, la production individuelle de TNF α a été augmenté à la suite du traitement au THC. Ceci concorde avec ce qu'on a retrouvé dans la littérature. Cette production a été principalement mesurée en pourcentage de positivité chez les T-CD8s totales comme indiqué dans les figures 11, 12 et 13 représentant respectivement les pourcentages d'expression et les MFI de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL-2. Les données brutes sont présentées dans les annexes 4,5 et 6.

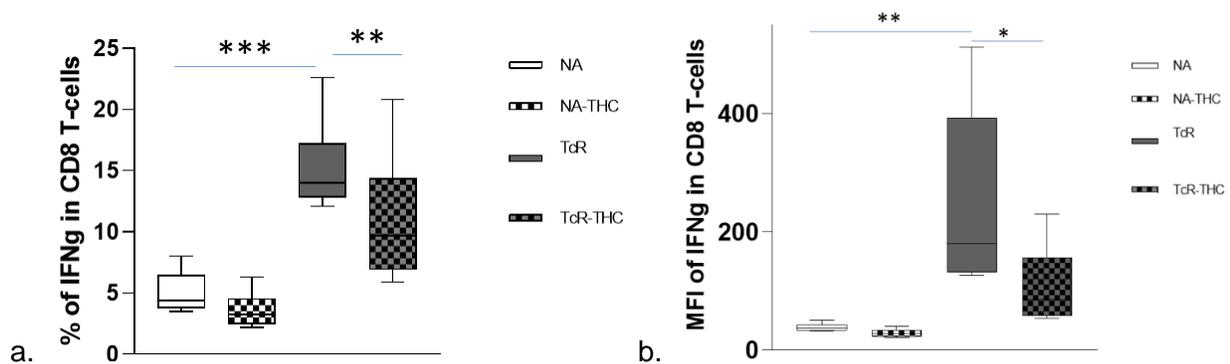


Figure 11 : Effet d'un traitement de THC à 10 μ M pendant 24h sur la production de l'IFN γ chez les T-CD8s : a. en Pourcentage d'expression b. en MFI

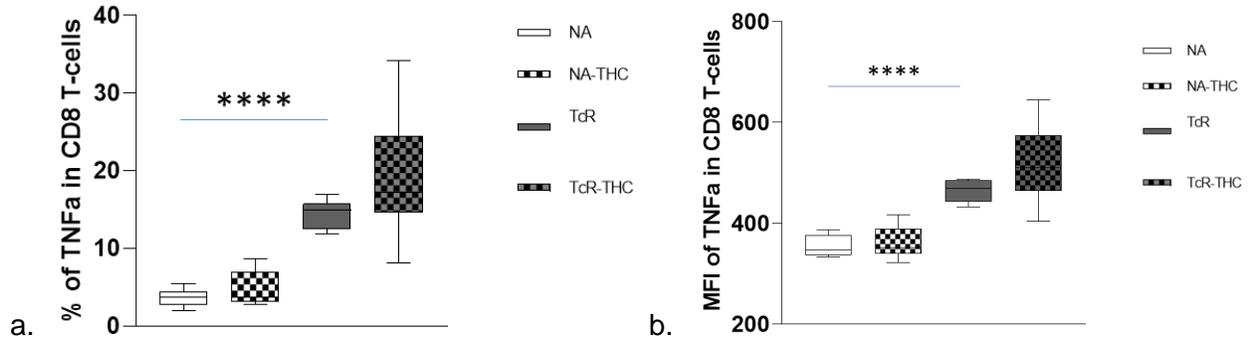


Figure 12 : Effet d'un traitement de THC à 10 μ M pendant 24h sur la production du TNF α chez les T-CD8s : a. en Pourcentage d'expression b. en MFI

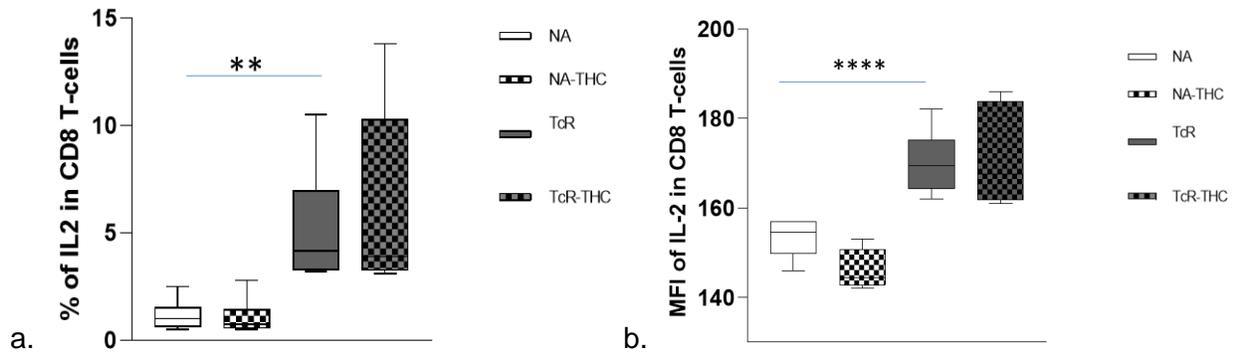


Figure 13 : Effet d'un traitement de THC à 10 μ M pendant 24h sur la production de l'IL-2 chez les T-CD8s : a. en Pourcentage d'expression b. en MFI

La polyfonctionnalité a été évaluée en déterminant la capacité de la cellule à produire 1 ou 2 cytokines supplémentaires à l'IFN γ . La production d'une seule cytokine est donc celle de l'IFN γ toute seule. La production de 2 cytokines est la somme de la production d'IFN γ +IL-2 et de la production d'IFN γ +TNF α . La production triple, et donc la polyfonctionnalité cellulaire, est la production des 3 cytokines en même temps. Les données brutes sont présentées en annexe7.

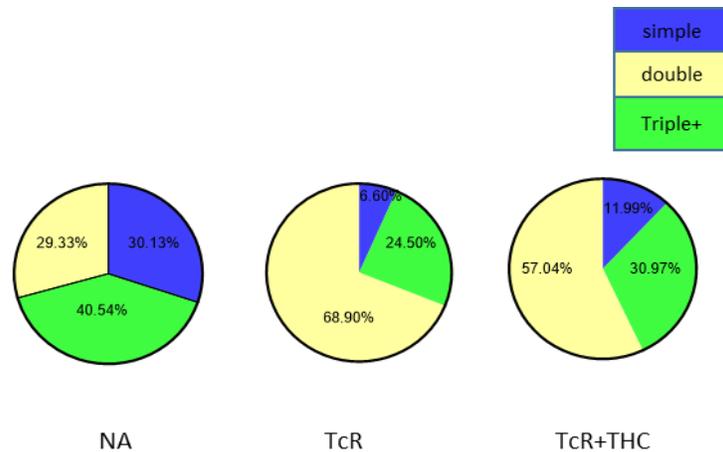


Figure 14 : Effet d'un traitement de 10 μ M de THC pendant 24h sur la polyfonctionnalité cellulaire antivirale des T-CD8s : Production simple (IFN γ seule), production double (IFN γ + TNF α ou IFN γ + IL-2), Production triple (IFN γ + TNF α + IL-2)

Comme le montre les figures 11,12 et 13 la production cytokinique est assez basse pour les T-CD8s allant de 2 a 5% pour les différentes cytokines antivirales. malgré cette production non élevée, on peut voir dans la figure 14 que nos cellules quiescentes sont dotées d'un potentiel antiviral important et que moins de 30% d'entre elles sont capable de produire 3 cytokines simultanément. Cependant, une production singulière ou double de cytokine reste majoritaire.

Suite a activation polyclonal, la production singuliere de cytokines s`eleve aux alentours de 20% pour chaque cytokine (figures 11, 12) et la polyfonctionnalite devient majoritaire pour atteindre les 70% (figure 14) suivie par une double production cytokinique. Seules 6.60% des cellules activées produisent une seule cytokine a la fois.

On peut voir dans les données brutes annexées que le traitement au THC n'a pas d'effet apparent sur cette production en condition de non activation. Cependant, ce meme traitement de THC lors de l'activation polyclonale, résulte en un shift de la production cytokinique : la polyfonctionnalité diminue aux alentours de 57%, et la production d'une cytokine a la fois double pour atteindre les 12%.

Cette même analyse a été conduite sur les T-CD4s mémoires, vu leur rôle crucial dans la réponse antigénique, surtout dans le cas d'un deuxième contact avec l'antigène, et ont donné les résultats suivants, présentées dans la figure 15.

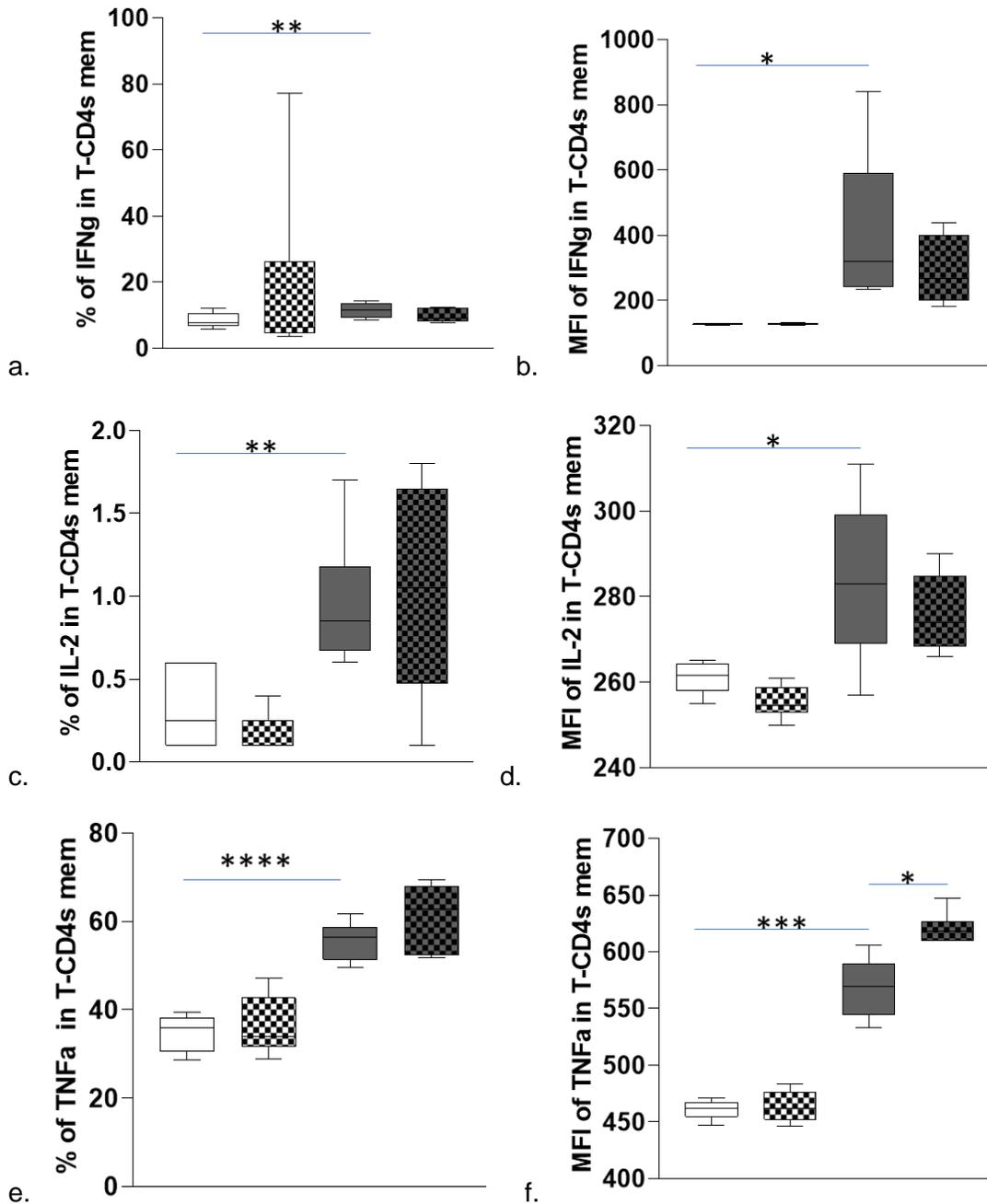


Figure 15 : Effet d'une dose de 10 μ M de THC sur l'expression individuelle des cytokines d'intérêt chez les T-CD4s mémoires en condition de quiescence, d'activation, en présence ou absence du THC : a. Expression de l'IFN γ ; b. MFI de l'IFN γ ; c. Expression de de l'IL-2 ; d. MFI de l'IL-2 ; e. Expression de la TNF α ; f. MFI de la TNF α

Contrairement aux T-CD8s, et à ce dont on s'attendrait depuis la littérature, la production cytokinique d'IL-2 a été très faible, même en condition d'activation polyclonale, comme le montre la figure 15 c et d. La même figure montre que le THC n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression des différentes cytokines.

Cependant, en essayant d'évaluer la polyfonctionnalité, on a retrouvé que pour chaque combinaison possible, il y avait plusieurs patients dont l'expression cytokinique d'IL-2 n'était pas assez pour trouver un double ou triple positivité. On n'a donc pas de données pour effectuer le rôle du THC sur la polyfonctionnalité chez les T-CD4s.

3.3. Le THC diminue le potentiel cytotoxique :

Dans notre étude des cytokines cytotoxiques, on s'intéresse à la Perforine et à la Granzyme B, principales composantes des granules lytiques, pour leur rôle crucial dans la réponse cytolytique, reflétant le potentiel cytotoxique des cellules T effectrices.

On rappelle que nos différents tests ont été fait sur 6 échantillons provenant d'une cohorte homogène de 6 patients. Les figures ont été réalisées sur le logiciel Graphpad Prism, en utilisant la fonction 'impaired t-test' comme test statistique. La significativité de nos résultats de cytotoxicité est exprimée numériquement sur les tableaux annexés 8 et 9, ainsi que les valeurs individuelles d'expression cytokiniques et leur moyenne pour chaque condition.

Nos résultats, illustrés par les figures 16 et 17, montrent que le potentiel cytolytique des T-CD8s totales est négativement affecté par le THC, la production singulière de Granzyme B et de Perforine étant inhibée tout comme leur production simultanée par la même cellule (figure18). Les données brutes permettant de construire les deux figures suivantes sont présentées en annexes 8 et 9.

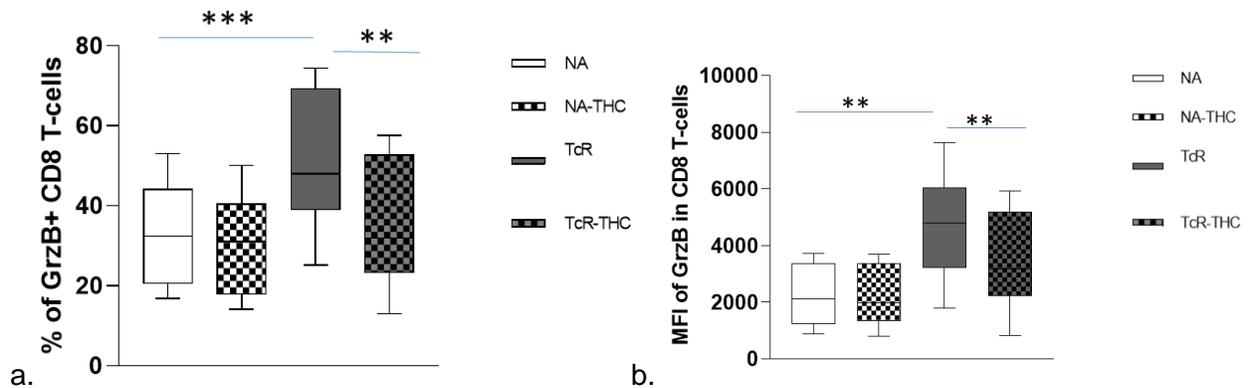


Figure 16 : Effet d'un traitement de 10µM de THC pendant 24h sur la production de Granzyme B chez les T-CD8s en condition de quiescence, d'activation, en présence ou absence d'une dose de 10µM de THC: a. en pourcentage d'expression ; b. en MFI

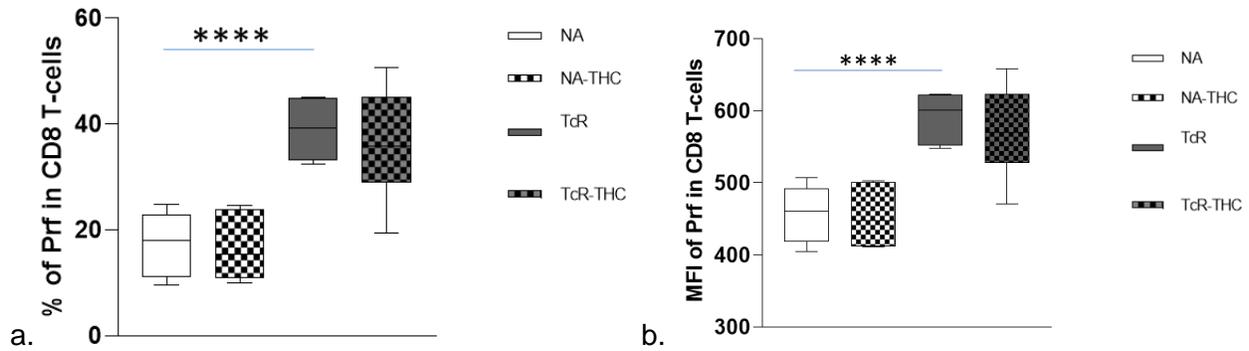


Figure 17 : Effet d'un traitement de 10µM de THC pendant 24h sur la production de Perforine T-CD8s en condition de quiescence, d'activation, en présence ou absence d'une dose de 10µM de THC: a. en pourcentage d'expression ; b. en MFI

Tout comme mentionné dans la littérature, les T-CD8s quiescents ont une production minimale de Perforine et de Granzyme B. Lors de l'activation polyclonale, cette production augmente de manière très importante, et diminue significativement lors du traitement au THC.

Pour étudier plus strictement le potentiel cytotoxique, on a mesuré la production simultanée de Perforine et de Granzyme par la même cellule. La figure 18 résume les résultats qu'on a trouvés, quant à l'inhibition de ce potentiel par le THC. Les données brutes de la double expression sont présentées dans l'annexe 10.

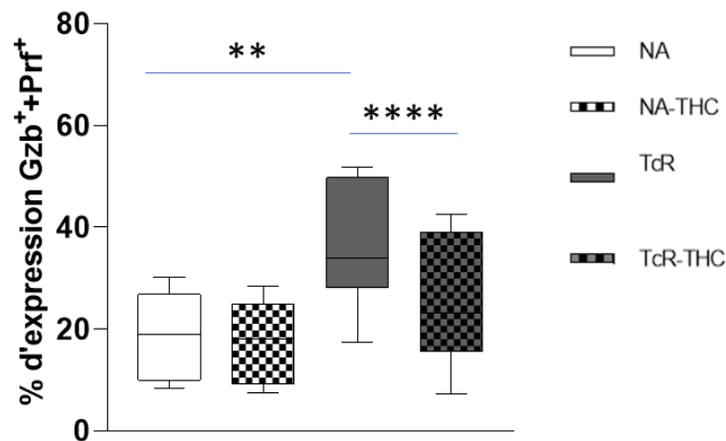


Figure 18 : Effet d'un traitement de 10µM de THC pendant 24h sur le potentiel cytotoxique des T-CD8s : Le potentiel cytotoxique est plus prononcé suite à l'activation polyclonale de 24h. Le THC diminue de manière significative cette cytotoxicité en inhibant la production cellulaire simultanée de granzyme B et de perforine.

Cette même analyse a été conduite sur les T-CD4s mémoires, vu leur rôle crucial dans la réponse antigénique, surtout dans le cas d'un deuxième contact avec l'antigène, et ont donné les résultats suivants, présentés dans la figure 19.

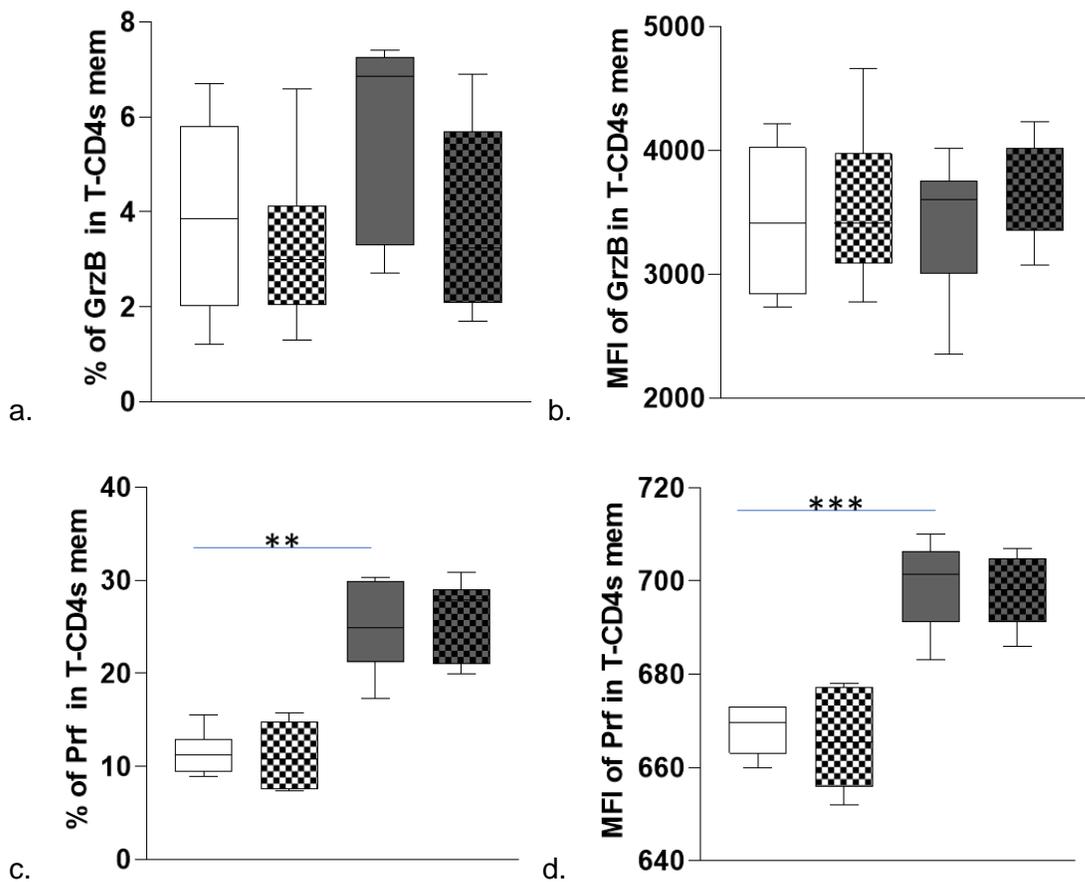


Figure 19 : Effet d'un traitement de 10µM de THC pendant 24h sur l'expression individuelle des cytokines d'intérêt chez les T-CD4s mémoires en condition de quiescence et d'activation: a. Pourcentage d'expression de la granzyme B. b. MFI d'expression de la granzyme B. c. Pourcentage d'expression de la perforine. d. MFI d'expression de la perforine.

Les cellules T-CD4s sont connues principalement pour leur production cytokinique via laquelle s'effectue l'activation des différentes composantes du système immunitaire. Cependant, elles sont aussi dotées d'un potentiel cytotoxique. L'analyse de la double expression de la perforine et de la granzyme B chez les T-CD4s mémoires confirme la présence de ce potentiel cytotoxique suite à l'activation polyclonale des cellules, et montre sa diminution suite au traitement au THC pendant 24h, comme le montre la figure 20 ci-après.

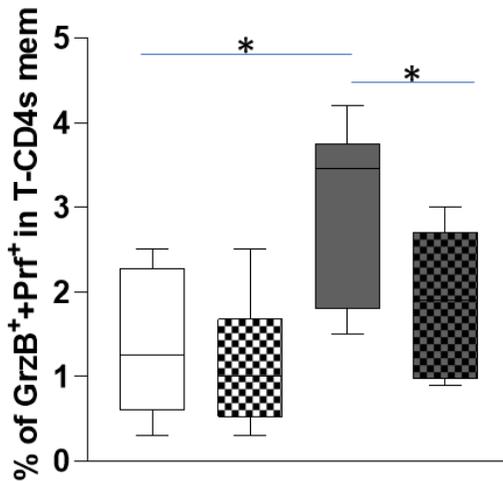


Figure 20 : Effet d'un traitement de 10 μ M de THC pendant 24h sur le potentiel cytotoxique des T-CD4s mémoires en condition de quiescence et d'activation.

Ayant obtenu ce résultat, on a pensé à vérifier si ces cellules cytotoxiques étaient capables de produire encore plus de cytokines simultanément. Ceci nous a mené à trouver une sorte de polyfonctionnalité cytotoxique en incorporant l'IFN γ et la TNF α comme le montre la figure 21. Encore une fois, aucun résultat n'a été trouvé en incorporant l'IL-2 dans le mix à analyser.

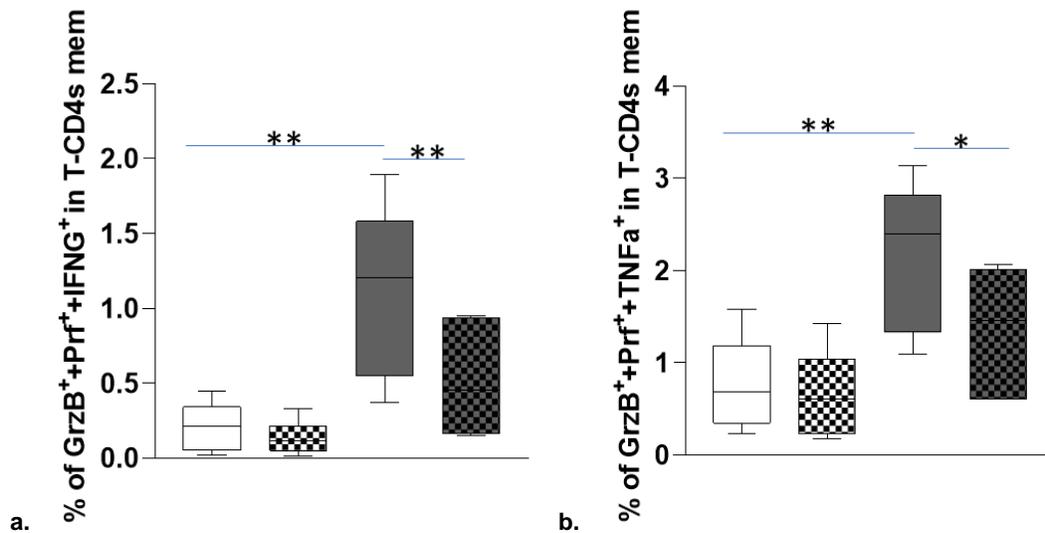


Figure 21 : Effet d'un traitement de 10 μ M de THC pendant 24h sur la polyfonctionnalité cytotoxique des T-CD4s mémoires en condition de quiescence et d'activation

3.4. Polyfonctionnalité et potentiel cytotoxique chez les T-CD4s mémoires et T-CD8s totales:

Les expériences concernant l'effet du THC sur la production singulière de cytokines, sur la polyfonctionnalité ainsi que sur le potentiel cytotoxique des cellules ont été effectués sur des échantillons de CMSPs, en utilisant les marqueurs mentionnés dans la partie méthodologie. Ceci nous a permis d'analyser cet effet sur les T-CD8s et T-CD4s totales et leurs sous populations mémoires. Faute de présence du marqueur CCR7 dans notre mix d'anticorps, on ne peut pas cibler les lymphocytes naives, activés pour la première fois lors de notre expérience.

Les analyses faites sur les populations T-CD4s totales ainsi que T-CD8s mémoires ont montré une augmentation de la sécrétion cytokinique suite à l'activation polyclonale, cependant, ils n'ont pas donné de résultats significatifs quant à l'effet du THC sur les cellules activées, des graphes pour ces résultats n'ont donc pas été présentés lors du chapitre résultat, mais les données brutes des résultats obtenus sont présentées en annexe 29 à 38.

3.5. Le THC inhibe l'immunité des cellules T-CD8s en affectant leur apport énergétique :

La plasticité métabolique des cellules T est très importante, et leur permet à la suite d'une infection virale, de passer d'un état de quiescence à un état d'expansion et de prolifération. L'une des composantes majeures de cette plasticité est la capacité des cellules d'assurer leurs besoins énergétiques en utilisant la voie d'oxydation des acides gras. Cette voie est modulée principalement par le CPT1a et le CD36, qui sont les récepteurs mitochondriaux des acides gras.

Pour mieux comprendre l'effet du THC sur la polyfonctionnalité et le potentiel cytolytique des T-CD8s, on a vérifié l'effet du THC sur cette voie métabolique. Nos résultats montrent que l'expression du CPT1a est inhibée par le THC. Le CPT1a étant un récepteur présent sur toutes les cellules, la mesure de l'effet du THC a été sous forme de MFI et pas de pourcentage de production, comme montré dans l'annexe 39.

Comme on peut le constater dans le tableau annexé, ainsi que dans la figure 22, l'expression de CPT1a n'est pas très importante dans la condition de non-activation, et le traitement au THC n'a pas d'effet là-dessus. À la suite de l'activation polyclonale, l'expression de ce récepteur est devenue très importante, et le traitement au THC l'a diminué de manière significative.

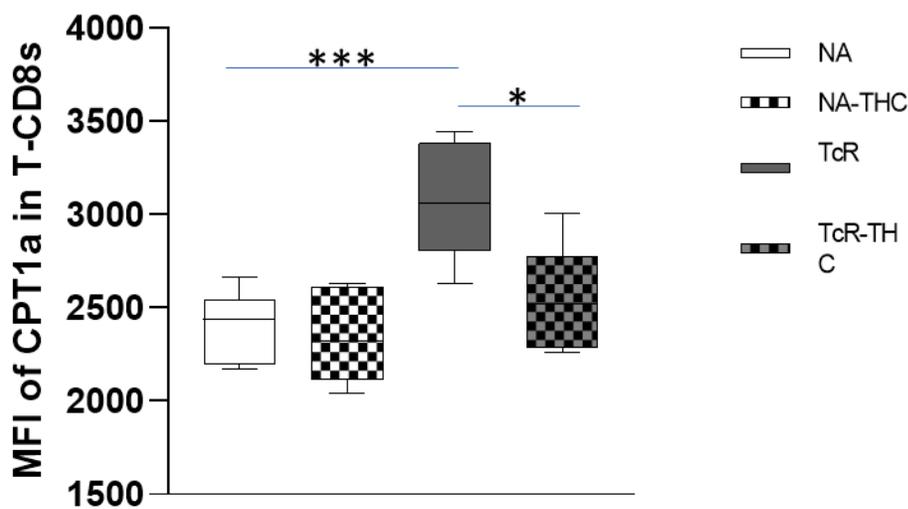


Figure 22 : Effet d'un traitement de 10µM de THC pendant 24h sur l'expression de CPT1a chez les T-CD8s

Les T-CD4s mémoires jouant un rôle crucial dans l'organisation de la réponse immunitaire cellulaire, on a évalué l'effet du THC sur l'apport métabolique de ces derniers en mesurant, lors de la même expérience et conditions que les CD8s, l'expression du CPT1a à leur surface.

Comme le montre la figure 23, le THC a un effet inhibiteur sur l'expression du CPT1a sur les T-CD4s mémoires, tout aussi significatif que trouvé sur les T-CD8s. Les données brutes pour ce résultat sont présentées en annexe 40.

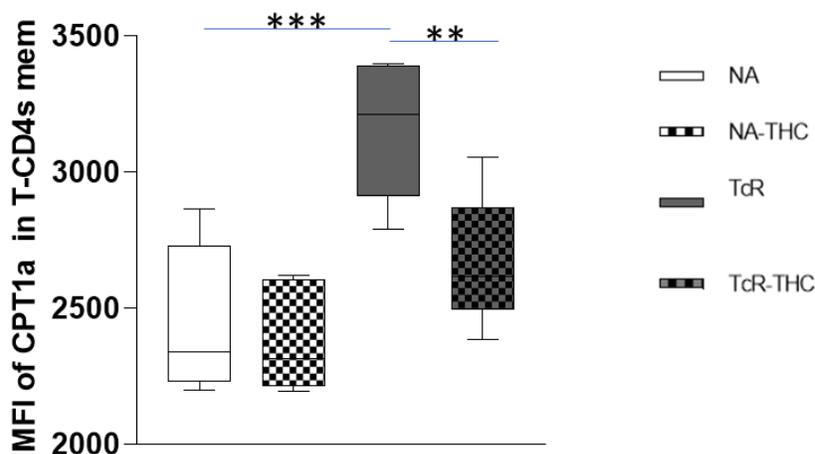


Figure 23: Effet d'un traitement de 10µM de THC pendant 24h sur l'expression du CPT1a chez les T-CD4s mémoires

Pour confirmer d'autant plus nos résultats, on a essayé de conduire des essais métaboliques en utilisant la plateforme Seahorse. Cette plateforme n'étant pas au pré-avant utilisé pour des tests de drogues sur des cellules primaires, des essais d'optimisation effectués principalement par Hamza Loucif et moi-même nous ont permis de mettre en place un système où il serait possible de déterminer l'effet du THC sur quelques activités mitochondriales des lymphocytes T-CD8s, principalement la respiration mitochondriale et l'oxydation des acides gras.

Ce système devrait être utilisé dans les prochaines étapes de l'étude pour comprendre les mécanismes permettant la modulation métabolique induite par le THC.

4. Discussion

Notre étude montre les effets inhibiteurs du THC sur le potentiel antiviral de l'immunité à médiation cellulaire dans le contexte d'activation polyclonale. Cet effet a été évalué par la mesure de la production des principales cytokines intervenant dans la réponse immunitaire des lymphocytes T.

Nos résultats d'inhibition individuelle cytokinique suite au traitement THC (figures 11,12,13,16 et 17) concordent avec la littérature, dans un contexte d'inflammation chronique (83, 84) ainsi que dans des systèmes expérimentaux contrôlés d'activation cellulaire aigüe(85-87). Dans une étude menée par Henriquez et al. concernant l'activation des astrocytes par les cellules T-CD8s, on retrouve que le THC diminue la production cytokinique individuelle de l'IFN γ et de TNF α (88). Dans une étude similaire, l'effet du THC sur la production de IFN γ et de l'IL-2 a été montré inhibiteur dans le contexte d'activation spécifique à la gp120 (84).

La modulation de la polyfonctionnalité (figure14) ainsi que du potentiel cytotoxique est donc un résultat auquel on s'attendrait suite à l'atteinte de la production cytokinique individuelle. Néanmoins, ces atteintes restent tout de même nécessaires à étudier, vu l'importance de ces 2 composantes dans la réponse immunitaire.

Afin de potentiellement détourner l'effet inhibiteur du THC sur le système immunitaire, il est important de comprendre les voies de signalisation affectées par cette substance. Des études montrent que le THC module à la baisse l'expression du TcR lors de l'activation cellulaire (14, 89), ainsi que la diminution de la présentation des antigènes viraux par les cellules présentatrices d'antigène, en particulier les cellules dendritiques (90). Il a aussi été démontré que le THC influence le processus de différenciation des lymphocytes T, en particulier le ratio Th1/Th2 (87, 91), résultant en un déséquilibre phénotypique, ce qui pourrait expliquer la production différentielles des cytokines chez la population T-CD4 ou l'expression d'IL-2 était minimale (92).

Ces atteintes de l'activation des cellules peuvent être à la base de la production individuelle des cytokines et molécules cytotoxiques étudiées, et expliquerait donc leur baisse en condition d'activation en présence du THC pour les T-CD8s totales ainsi que les T-CD4s mémoires.

Nos résultats dévoilent que la modulation des T-CD8s totales et les T-CD4s mémoires relève aussi d'une atteinte de leur plasticité métabolique (figure 22, 23), au niveau du récepteur mitochondrial aux acides gras CPT1a. L'expression de ce récepteur est censée être régulée à la hausse suite à l'activation cellulaire pour assurer les apports carbonés nécessaires à la

mitochondrie pour la production d'ATP (93, 94). Cette atteinte concorde avec ce qui est mentionné dans la littérature quant à l'effet du THC sur différentes cellules, ou le CPT1a a aussi été modulé à la baisse comparé aux cellules non traitées au THC (95, 96). Cette dérégulation résulte probablement en une dérégulation mitochondriale (97) ce qui expliquerait la baisse de la production des différentes cytokines suite à l'inhibition de l'activation cellulaire.

Afin de déterminer les dommages cellulaires engendrés par le THC, d'avantages de tests métaboliques devraient être effectués, afin de mesurer les différents types de respiration mitochondriale assurant la plasticité métabolique des cellules T-CD8s (98, 99).

La plateforme de Seahorse, nécessaire à l'étude du côté métabolique, offre une technique d'une haute sensibilité ce qui est avantageux et désavantageux en même temps. Cette haute sensibilité permet l'obtention de résultats métaboliques diversifiés et précis. Cependant, un stress induit par la manipulation des cellules (purification, incubation), aux conditions environnementales de manipulations (mouvement, présence de bulles d'aires) ainsi qu'aux conditions expérimentales (ajout de drogues externes au Kit prédéfini par la compagnie Agilent) peuvent falsifier nos résultats. Une attention très particulière, ainsi que des essais d'optimisation quant à l'ajout du THC dans le mix cellulaire, doivent donc être pris en compte.

Dans le cadre de la campagne vaccinale actuelle contre le virus du SRAS-Cov19, l'efficacité des réponses vaccinales sont au centre des discussions. Une suite logique de notre étude, serait donc de vérifier si l'effet inhibiteur du THC obtenu lors d'activation polyclonale transparaîtrait aussi lors d'une réponse vaccinale. Pour ce faire, il faudrait recruter un ensemble homogène d'individus vaccinés, et d'effectuer une activation spécifique à l'antigène de la protéine Spike du virus de la covid-19, et de comparer la production cytokinique pour les lymphocytes T-CD4 mémoires et T-CD8 totales et mémoires en absence et en présence du THC. L'effet du THC sur le potentiel cytolytique devrait aussi être observé chez ces 2 populations, mais en portant le focus sur les T-CD8s effectrices vu que ce sont les cellules cytotoxiques par excellence.

D'autant plus, sachant que la mémoire vaccinale diminue naturellement au cours du temps, il serait intéressant de vérifier l'effet du THC sur l'éventualité d'infection par un virus contre lequel la plupart de la population canadienne, voire mondiale, a été vaccinée à l'enfance. Pour ce faire, une stimulation antigénique spécifique avec le pool de peptides CEF, en présence et absence du THC serait intéressante à étudier.

La plante de Cannabis contient plus que 400 molécules différentes, les 2 cannabinoïdes majoritairement présents étant le THC et le CBD. Comme mentionné, l'effet neurotrophique

recherché par les consommateurs est dû au THC, présent en haute dose dans les produits achetés et consommé. Ceci n'annule pas l'effet que le CBD peut avoir sur le système immunitaire dans un contexte d'activation polyclonale ou spécifique à l'antigène. Il serait donc intéressant d'aborder notre étude, ainsi que les différentes études mentionnées dessus en mixant le THC et le CBD.

5. Conclusion

Le THC est habituellement prescrit comme palliatif dans le cas de stades terminaux de maladies chroniques pour assurer une meilleure qualité de vie pour les patients. La prise répétitive de THC comme drogue récréationnelle, par des personnes saines risque d'inhiber leurs capacités immunitaires, via la diminution de leur polyfonctionnalité et potentiel cytotoxique, en modulant à la baisse la plasticité métabolique des cellules T.

Dans une ère où le développement de vaccins est le moyen ultime d'éradiquer de diverses maladies, et surtout dans le cadre d'une pandémie, l'obtention de réponses immunitaires humorales, cytotoxiques et formant une mémoire est cruciale. Selon les résultats de notre étude, qui concordent avec la littérature, la prise régulière de THC pourrait donc diminuer en particulier l'intensité des réponses vaccinales, et plus en général celle des réponses du système immunitaire suivant une infection virale, bactérienne, ou parasitaires, ainsi que les réponses anti-tumorales.

Afin d'avoir une idée plus complète concernant l'effet du THC sur la réponse immunitaire, il serait intéressant de compléter l'évaluation de l'aspect immunométaboliques des cellules T, ainsi que de vérifier l'effet de cette substance à consommation relativement haute au Canada sur l'immunité à voie humorale en évaluant la modulation de la production d'anticorps et d'IgG/IgM.

6. Références

1. <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/marijuana-legalization-in-canada>.
2. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/drogues-medicaments/cannabis/lois-reglementation/groupe-travail-legalisation-reglementation-cannabis/cadre-legalisation-reglementation-cannabis-canada.html>.
3. <https://www.canada.ca/fr/services/sante/campagnes/cannabis/canadiens.html#a3>.
4. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/drogues-medicaments/cannabis/recherches-donnees/enquete-canadienne-cannabis-2020-sommaire.html>.
5. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/11-627-m/11-627-m2020014-fra.htm>.
6. <https://fr.wikipedia.org/wiki/T%C3%A9trahydrocannabinol>.
7. Andre CM, H. J., Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front Plant Sci.* 2016;7:19. Published 2016 Feb 4. doi:10.3389/fpls.2016.00019.
8. Baron EP, L. P., Eades J, Hogue O. Patterns of medicinal cannabis use, strain analysis, and substitution effect among patients with migraine, headache, arthritis, and chronic pain in a medicinal cannabis cohort. *J Headache Pain.* 2018;19(1):37. Published 2018 May 24. doi:10.1186/s10194-018-0862-2.
9. Schilling S, M. R., McCabe PF. Cannabis sativa. *Curr Biol.* 2020 Jan 6;30(1):R8-R9. doi: 10.1016/j.cub.2019.10.039. PMID: 31910378.
10. ElSohly MA, R. M., Gul W, Chandra S, Galal A. Phytochemistry of Cannabis sativa L. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017;103:1-36. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9_1. PMID: 28120229.
11. <https://shop.luffbrands.com/endocannabinoid-system-101/>.
12. Beji, C., H. Loucif, R. Telittchenko, D. Olagnier, X. Dagenais-Lussier, and J. van Grevenynghe. 2020. Cannabinoid-Induced Immunomodulation during Viral Infections: A Focus on Mitochondria. *Viruses* 12.
13. Gorey, C. K., L.; Smaragdi, E.; Kroon, E.; Cousijn, J. 2019. Age-related differences in the impact of cannabis use on the brain and cognition: A systematic review. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 269: 37–58.
14. Börner C, S. M., Höllt V, Schraven B, Kraus J. Cannabinoid receptor type 1- and 2-mediated increase in cyclic AMP inhibits T cell receptor-triggered signaling. *J Biol Chem.* 2009 Dec 18;284(51):35450-60. doi: 10.1074/jbc.M109.006338. PMID: 19858202; PMCID: PMC2790974.
15. Raphael Mechoulam, M. P., Eric Murillo-Rodriguez, Lumír O. Hanuš. 2017. Cannabidiol – Recent Advances. *Chemistry and Biodiversity*.
16. Kumar, B. V., T. J. Connors, and D. L. Farber. 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48: 202-213.
17. Netea MG, S. A., Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. . 2019. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe*.

18. Laidlaw BJ, C. J., Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2016 Feb;16(2):102-11. doi: 10.1038/nri.2015.10. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26781939; PMCID: PMC4860014.
19. Zhu J, P. W. C. T. c. f., functions, and faults. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1557-69. doi: 10.1182/blood-2008-05-078154. PMID: 18725574; PMCID: PMC2518872.
20. Human, C. A. 2016. CD4(+) T-Cells: A Role for Low-Affinity Fc Receptors. . *Front Immunology.*
21. Lee HG, C. M., Choi JM. Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med.* 2020 Aug;52(8):1255-1263. doi: 10.1038/s12276-020-00486-7. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32859954; PMCID: PMC8080565.
22. Tay RE, R. E., Toh HC. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther.* 2021 Feb;28(1-2):5-17. doi: 10.1038/s41417-020-0183-x. Epub 2020 May 27. PMID: 32457487; PMCID: PMC7886651.
23. Zhang X, I. S., Fraser A, Chen M, Khan O, Zakem J, Davis W, Quinet R. Follicular helper T cells: new insights into mechanisms of autoimmune diseases. *Ochsner J.* 2013 Spring;13(1):131-9. PMID: 23531878; PMCID: PMC3603176.
24. Koutsakos M, N. T., Kedzierska K. With a Little Help from T Follicular Helper Friends: Humoral Immunity to Influenza Vaccination. *J Immunol.* 2019 Jan 15;202(2):360-367. doi: 10.4049/jimmunol.1800986. PMID: 30617117.
25. Markov OV, M. N., Vlasov VV, Zenkova MA. Molecular and Cellular Mechanisms of Antitumor Immune Response Activation by Dendritic Cells. *Acta Naturae.* 2016 Jul-Sep;8(3):17-30. PMID: 27795841; PMCID: PMC5081705.
26. Lewinsohn DA, L. D., Scriba TJ. Polyfunctional CD4+ T Cells As Targets for Tuberculosis Vaccination. *Front Immunol.* 2017 Oct 5;8:1262. doi: 10.3389/fimmu.2017.01262. PMID: 29051764; PMCID: PMC5633696.
27. Li D, L. N., Zhang YF, Fu H, Feng M, Schneider D, Su L, Wu X, Zhou J, Mackay S, Kramer J, Duan Z, Yang H, Kolluri A, Hummer AM, Torres MB, Zhu H, Hall MD, Luo X, Chen J, Wang Q, Abate-Daga D, Dropulic B, Hewitt SM, Orentas RJ, Greten TF, Ho M. Persistent Polyfunctional Chimeric Antigen Receptor T Cells That Target Glypican 3 Eliminate Orthotopic Hepatocellular Carcinomas in Mice. *Gastroenterology.* 2020 Jun;158(8):2250-2265.e20. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.011. Epub 2020 Feb 12. Erratum in: *Gastroenterology.* 2021 Mar;160(4):1433. PMID: 32060001; PMCID: PMC7282931.
28. Steel KJA, S. U., Ridley M, Durham LE, Wu SY, Ryan SE, Hughes CD, Chan E, Kirkham BW, Taams LS. Polyfunctional, Proinflammatory, Tissue-Resident Memory Phenotype and Function of Synovial Interleukin-17A+CD8+ T Cells in Psoriatic Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2020 Mar;72(3):435-447. doi: 10.1002/art.41156. Epub 2020 Feb 4. PMID: 31677365; PMCID: PMC7065207.
29. Keskin DB, A. A., Sun J, Tirosh I, Mathewson ND, Li S, Oliveira G, Giobbie-Hurder A, Felt K, Gjini E, Shukla SA, Hu Z, Li L, Le PM, Allesøe RL, Richman AR, Kowalczyk MS, Abdelrahman S, Geduldig JE, Charbonneau S, Pelton K, Iorgulescu JB, Elagina L, Zhang W, Olive O, McCluskey C, Olsen LR, Stevens J, Lane WJ, Salazar AM, Daley H, Wen PY, Chiocca EA, Harden M, Lennon NJ, Gabriel S, Getz G, Lander ES, Regev A, Ritz J, Neuberg D, Rodig SJ, Ligon KL, Suvà ML, Wucherpfennig KW, Hacohen N, Fritsch EF, Livak KJ, Ott PA, Wu CJ, Reardon DA. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature.* 2019 Jan;565(7738):234-239. doi:

- 10.1038/s41586-018-0792-9. Epub 2018 Dec 19. PMID: 30568305; PMCID: PMC6546179.
30. Meckiff BJ, R.-S. C., Fajardo V, Chee SJ, Kusnadi A, Simon H, Eschweiler S, Grifoni A, Pelosi E, Weiskopf D, Sette A, Ay F, Seumois G, Ottensmeier CH, Vijayanand P. Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4+ T Cells in COVID-19. *Cell*. 2020 Nov 25;183(5):1340-1353.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.001. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33096020; PMCID: PMC7534589.
 31. Gajewski T, R. S., Trujillo J, Pyzer A, Yu J, Fessler J, Cabanov A, Higgs E, Cron K, Zha Y, Lu Y, Bloodworth J, Abasiyanik M, Okrah S, Flood B, Hatogai K, Leung M, Pezeshk A, Kozloff L, Reschke R, Strohschein G, Chervin CS, Kumar M, Schrantz S, Madariaga ML, Beavis K, Yeo KT, Sweis R, Segal J, Tay S, Izumchenko E, Mueller J, Chen L. Severe COVID-19 infection is associated with aberrant cytokine production by infected lung epithelial cells rather than by systemic immune dysfunction. *Res Sq [Preprint]*. 2021 Nov 24;rs.3.rs-1083825. doi: 10.21203/rs.3.rs-1083825/v1. PMID: 34845442; PMCID: PMC8629200.
 32. Yang X, A. M., Liu X, Song H, Du M, Li Y, Zhang Z. IFN- γ establishes interferon-stimulated gene-mediated antiviral state against Newcastle disease virus in chicken fibroblasts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020 Mar 18;52(3):268-280. doi: 10.1093/abbs/gmz158. PMID: 32047904; PMCID: PMC7109688.
 33. Liu Q, Y. Y., Wang HY, Wang JF, He XJ. The IFN- γ -induced immunoproteasome is suppressed in highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected alveolar macrophages. *Vet Immunol Immunopathol*. 2020 Aug;226:110069. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110069. Epub 2020 May 17. PMID: 32535163.
 34. Chen J, L. Y., Lai F, Wang Y, Sutter K, Dittmer U, Ye J, Zai W, Liu M, Shen F, Wu M, Hu K, Li B, Lu M, Zhang X, Zhang J, Li J, Chen Q, Yuan Z. Functional Comparison of Interferon- α Subtypes Reveals Potent Hepatitis B Virus Suppression by a Concerted Action of Interferon- α and Interferon- γ Signaling. *Hepatology*. 2021 Feb;73(2):486-502. doi: 10.1002/hep.31282. PMID: 32333814.
 35. Kak G, R. M., Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomol Concepts*. 2018 May 30;9(1):64-79. doi: 10.1515/bmc-2018-0007. PMID: 29856726.
 36. Jorgovanovic D, S. M., Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res*. 2020 Sep 29;8:49. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x. PMID: 33005420; PMCID: PMC7526126.
 37. Castro F, C. A., Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol*. 2018 May 4;9:847. doi: 10.3389/fimmu.2018.00847. PMID: 29780381; PMCID: PMC5945880.
 38. Zhang X, Z. Y., Qu Q, Zhu J, Liu Z, Ning W, Zeng H, Zhang N, Du W, Chen C, Huang JA. PD-L1 induced by IFN- γ from tumor-associated macrophages via the JAK/STAT3 and PI3K/AKT signaling pathways promoted progression of lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2017 Dec;22(6):1026-1033. doi: 10.1007/s10147-017-1161-7. Epub 2017 Jul 26. PMID: 28748356.
 39. Varfolomeev E, V. D., Intracellular regulation of TNF activity in health and disease. *Cytokine*. 2018 Jan;101:26-32. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.035. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27623350.

40. Mehta AK, G. D., Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018 Jan;101:14-18. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.003. Epub 2016 Aug 13. PMID: 27531077; PMCID: PMC5305780.
41. Wang X, Y. L., Huang F, Zhang Q, Liu S, Ma L, You Z. Inflammatory cytokines IL-17 and TNF- α up-regulate PD-L1 expression in human prostate and colon cancer cells. *Immunol Lett*. 2017 Apr;184:7-14. doi: 10.1016/j.imlet.2017.02.006. Epub 2017 Feb 14. PMID: 28223102; PMCID: PMC5362328.
42. Godfrey MS, F. L., Tuberculosis and Biologic Therapies: Anti-Tumor Necrosis Factor- α and Beyond. *Clin Chest Med*. 2019 Dec;40(4):721-739. doi: 10.1016/j.ccm.2019.07.003. PMID: 31731980.
43. Rodriguez-Garcia E, Z. N., Gil-Farina I, Gonzalez-Aparicio M, Echeverz M, Bähre H, Solano C, Lasa I, Gonzalez-Aseguinolaza G, Hommel M. AdrA as a Potential Immunomodulatory Candidate for STING-Mediated Antiviral Therapy That Required Both Type I IFN and TNF- α Production. *J Immunol*. 2021 Jan 15;206(2):376-385. doi: 10.4049/jimmunol.2000953. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33298616.
44. Salomon BL, L. M., Tosello J, Ronin E, Piaggio E, Cohen JL. Tumor Necrosis Factor α and Regulatory T Cells in Oncoimmunology. *Front Immunol*. 2018 Mar 12;9:444. doi: 10.3389/fimmu.2018.00444. PMID: 29593717; PMCID: PMC5857565.
45. Abbas AK, T. E., R Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol*. 2018 Jul 6;3(25):eaat1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482. PMID: 29980618.
46. Pol JG, C. P., Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20191247. doi: 10.1084/jem.20191247. PMID: 31611250; PMCID: PMC7037245.
47. Ross SH, C. D. 2018. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol*.
48. Wrangle JM, P. A., Johnson CB, Neitzke DJ, Mehrotra S, Denlinger CE, Paulos CM, Li Z, Cole DJ, Rubinstein MP. IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy. *J Interferon Cytokine Res*. 2018 Feb;38(2):45-68. doi: 10.1089/jir.2017.0101. PMID: 29443657; PMCID: PMC5815463.
49. Prager I, W. C. M. o. n. k. c.-m. c. c. J. L. B. J.-d. J. M.-R.
50. Benmebarek MR, K. C., Cadilha BL, Lesch S, Endres S, Kobold S. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 14;20(6):1283. doi: 10.3390/ijms20061283. PMID: 30875739; PMCID: PMC6470706.
51. Marshall NB, S. S., Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:954602. doi: 10.1155/2011/954602. Epub 2011 Nov 22. PMID: 22174559; PMCID: PMC3228492.
52. Osińska I, P. K., Demkow U. Perforin: an important player in immune response. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(1):109-15. doi: 10.5114/ceji.2014.42135. Epub 2014 Apr 17. PMID: 26155110; PMCID: PMC4439970.
53. Prager I, W., Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2019 Jun;105(6):1319-1329. doi: 10.1002/JLB.MR0718-269R. Epub 2019 May 20. PMID: 31107565.

54. Noe MH, M. R., Diagnosis and management of Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis. *Clin Dermatol.* 2020 Nov-Dec;38(6):607-612. doi: 10.1016/j.clindermatol.2020.06.016. Epub 2020 Jun 30. PMID: 33341195.
55. Darrah E, A. F., Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol.* 2018 Jan;30(1):72-78. doi: 10.1097/BOR.0000000000000452. PMID: 28937414; PMCID: PMC5848217.
56. Turner CT, L. D., Granville DJ. Granzyme B in skin inflammation and disease. *Matrix Biol.* 2019 Jan;75-76:126-140. doi: 10.1016/j.matbio.2017.12.005. Epub 2017 Dec 14. PMID: 29247692.
57. Shao C, Z. C., Zhu Y, Hao J, Li Y, Hu H, Si L, Zhong F, Wang X, Wang H. Decrease of peripheral blood mucosal-associated invariant T cells and impaired serum Granzyme-B production in patients with gastric cancer. *Cell Biosci.* 2021 Jan 9;11(1):12. doi: 10.1186/s13578-020-00518-9. PMID: 33422137; PMCID: PMC7796455.
58. Sula Karreci E, E. S., Dotiwala F, Routray SK, Kurdi AT, Assaker JP, Luckyanchikov P, Mihali AB, Maarouf O, Borges TJ, Alkudhayri A, Patel KR, Radwan A, Ghobrial I, McGrath M, Chandraker A, Riella LV, Elyaman W, Abdi R, Lieberman J, Azzi J. Human regulatory T cells undergo self-inflicted damage via granzyme pathways upon activation. *JCI Insight.* 2017 Nov 2;2(21):e91599. doi: 10.1172/jci.insight.91599. PMID: 29093262; PMCID: PMC5690280.
59. Velotti F, B. I., Cimini FA, Cavallo MG. Granzyme B in Inflammatory Diseases: Apoptosis, Inflammation, Extracellular Matrix Remodeling, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrosis. *Front Immunol.* 2020 Nov 11;11:587581. doi: 10.3389/fimmu.2020.587581. PMID: 33262766; PMCID: PMC7686573.
60. Hiroyasu S, Z. M., Zhao H, Pawluk MA, Turner CT, Kasprick A, Tateishi C, Nishie W, Burleigh A, Lennox PA, Van Laeken N, Carr NJ, Petersen F, Crawford RI, Shimizu H, Tsuruta D, Ludwig RJ, Granville DJ. Granzyme B inhibition reduces disease severity in autoimmune blistering diseases. *Nat Commun.* 2021 Jan 12;12(1):302. doi: 10.1038/s41467-020-20604-3. PMID: 33436591; PMCID: PMC7804321.
61. Turner CT, H. S., Granville DJ. Granzyme B as a therapeutic target for wound healing. *Expert Opin Ther Targets.* 2019 Sep;23(9):745-754. doi: 10.1080/14728222.2019.1661380. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31461387.
62. Shen Y, Z. M., Turner CT, Raithatha SA, Wu Z, Russo V, Oram C, Hiroyasu S, Nabai L, Zhao H, Bozin T, Westendorf K, Kopko I, Huang R, Arns S, Tan J, Zeng H, Boey A, Liggins R, Jaquith J, Cameron DR, Papp A, Granville DJ. Topical small molecule granzyme B inhibitor improves remodeling in a murine model of impaired burn wound healing. *Exp Mol Med.* 2018 May 30;50(5):1-11. doi: 10.1038/s12276-018-0095-0. PMID: 29849046; PMCID: PMC5976625.
63. Capaccione KM, D. M., Bhatt N, Mintz A, Molotkov A. Granzyme B PET Imaging of the Innate Immune Response. *Molecules.* 2020 Jul 7;25(13):3102. doi: 10.3390/molecules25133102. PMID: 32646038; PMCID: PMC7411671.
64. Migueles SA, R. D., Gavil NV, Kelly EP, Toulmin SA, Wang LT, Lack J, Ward AJ, Pryal PF, Ludwig AK, Medina RG, Apple BJ, Toumanios CN, Poole AL, Rehm CA, Jones SE, Liang CJ, Connors M. Antigenic Restimulation of Virus-Specific Memory CD8+ T Cells Requires Days of Lytic Protein Accumulation for Maximal Cytotoxic Capacity. *J Virol.* 2020 Nov 9;94(23):e01595-20. doi: 10.1128/JVI.01595-20. PMID: 32907983; PMCID: PMC7654275.

65. Boussoffara T, B. M., Ben Ahmed M, Mokni M, Feriani S, Ben Salah A, Louzir H. Activated cytotoxic T cells within zoonotic cutaneous leishmaniasis lesions. *Immun Inflamm Dis*. 2019 Sep;7(3):95-104. doi: 10.1002/iid3.240. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30997749; PMCID: PMC6688079.
66. Jiang L, W. Y., Zhao J, Uehara M, Hou Q, Kasinath V, Ichimura T, Banouni N, Dai L, Li X, Greiner DL, Shultz LD, Zhang X, Sun ZJ, Curtin I, Vangos NE, Yeoh ZC, Geffken EA, Seo HS, Liu ZX, Heffron GJ, Shah K, Dhe-Paganon S, Abdi R. Direct Tumor Killing and Immunotherapy through Anti-SerpineB9 Therapy. *Cell*. 2020 Nov 25;183(5):1219-1233.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.045. PMID: 33242418; PMCID: PMC7927154.
67. Sun (孙李哲) L, Y. 杨. X., Yuan (袁祖贻) Z, Wang (王虹) H. Metabolic Reprogramming in Immune Response and Tissue Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020 Sep;40(9):1990-2001. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314037. Epub 2020 Jul 23. PMID: 32698683; PMCID: PMC7484156.
68. A.V. Menk, N. E. S., R.S. Moreci, X. Zeng, C. Guy, S. Salvatore, H. Bae, H. A. Y. J. Xie, S.G. Wendell, G.M. Delgoffe, Early TCR signaling induces rapid, C. R. aerobic glycolysis enabling distinct acute T cell effector functions, and 1509–1521.
69. Hamza Loucif, X. D.-L., Cherifa Beji, R. Telittchenko, J.-P. Routy, and J. v. Grevenynghea. 2020. Plasticity in T-cell mitochondrial metabolism: A necessary peacekeeper during the troubled times of persistent HIV-1 infection. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 55.
70. S.R. Jacobs, C. E. H., N.J. Maciver, J.A. Wofford, H.L. Wieman, J.J. Hammen, G. u. i. l. i. T. c. a. a. r. C.-. J.C. Rathmell, J. I. mediated Akt-dependent and independent pathways, and 4476–4486.
71. R. Geiger, J. C. R., T. Wolf, C. Basso, Y. Feng, T. Fuhrer, M. Kogadeeva, F. M. P. Picotti, M. Mann, N. Zamboni, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, LArginine, modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity, and C. e13.
72. Muthumalage, T. R., I. 2019. Cannabidiol differentially regulates basal and LPS-induced inflammatory responses in macrophages, lung epithelial cells, and fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 382, 114713.
73. Bock, F. J. T., S.W.G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2020,, and 21.
74. Estaquier, J. V., F.; Vayssiere, J.L.; Mignotte, B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv. Exp., and Med. Biol*. 2012, 157–183.
75. Wu, H. Y. H., C.H.; Lin, Y.H.; Wang, C.C.; Jan, T.R. Cannabidiol induced apoptosis in human monocytes through mitochondrial permeability transition pore-mediated ROS production. *Free Radic. Biol. Med*. 2018, 124, 311–318.
76. Schultze, N. W., H.; Zwicker, P.; Lindequist, U.; Haertel, B. Mitochondrial functions of THP-1 monocytes following the exposure to selected natural compounds. *Toxicology* 2017, 377, 57–63.
77. Trebak, M. K., J.P. Calcium signalling in T cells. *Nat. Rev. Immunol*. 2019, 19, 154–169.
78. Hoth, M. F., C.M.; Lewis, R.S. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J. Cell Biol*. 1997, 137, 633–648.

79. Olivas-Aguirre, M. T.-L., L.; Valle-Reyes, J.S.; Hernandez-Cruz, A.; Pottosin, I.; Dobrovinskaya, O. Cannabidiol directly targets mitochondria and disturbs calcium homeostasis in acute lymphoblastic leukemia. *Cell Death Dis.* 2019, 10, 779.
80. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Immunofluorescence>.
81. <https://www.sinobiological.com/category/fcm-facs-facs>.
82. <https://www.sinobiological.com/category/fcm-facs-what-is-fcm>.
83. Katz D, K. I., Porat-Katz BS, Shoenfeld Y. Medical cannabis: Another piece in the mosaic of autoimmunity? *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Feb;101(2):230-238. doi: 10.1002/cpt.568. Epub 2016 Dec 20. PMID: 27859024.
84. Chen W, C. R., Kaplan BL, Kaminski NE. Modulation of HIVGP120 Antigen-Specific Immune Responses In Vivo by Δ 9-Tetrahydrocannabinol. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 Jun;10(2):344-55. doi: 10.1007/s11481-015-9597-x. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25900076.
85. Ellis RJ, P. S., Li Y, Schrier R, Iudicello J, Letendre S, Morgan E, Tang B, Grant I, Cherner M. Recent cannabis use in HIV is associated with reduced inflammatory markers in CSF and blood. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2020 Jun 17;7(5):e809. doi: 10.1212/NXI.0000000000000809. PMID: 32554630; PMCID: PMC7309527.
86. Al-Ghezi ZZ, B. P., Alghetaa H, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Combination of cannabinoids, delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), mitigates experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by altering the gut microbiome. *Brain Behav Immun.* 2019 Nov;82:25-35. doi: 10.1016/j.bbi.2019.07.028. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31356922; PMCID: PMC6866665.
87. Moretti S, C. M., Franchi S, Raggi MA, Micolini L, Protti M, Somaini L, Panerai AE, Sacerdote P. Δ 9-Tetrahydrocannabinol-induced anti-inflammatory responses in adolescent mice switch to proinflammatory in adulthood. *J Leukoc Biol.* 2014 Oct;96(4):523-34. doi: 10.1189/jlb.3HI0713-406RR. Epub 2014 Apr 17. PMID: 24744434.
88. Henriquez JE, B. A., Matos-Fernandez KM, Crawford RB, Kaminski NE. Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) Impairs CD8+ T Cell-Mediated Activation of Astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2020 Dec;15(4):863-874. doi: 10.1007/s11481-020-09912-z. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32215844; PMCID: PMC7529688.
89. Robinson RH, M. J., Breslow-Deckman JM, Gaughan J, Adler MW, Eisenstein TK. Cannabinoids inhibit T-cells via cannabinoid receptor 2 in an in vitro assay for graft rejection, the mixed lymphocyte reaction. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Dec;8(5):1239-50. doi: 10.1007/s11481-013-9485-1. Epub 2013 Jul 4. PMID: 23824763; PMCID: PMC3864984.
90. Roth MD, C. J., Kiertscher SM. Exposure to Δ 9-Tetrahydrocannabinol Impairs the Differentiation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells and their Capacity for T cell Activation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2015 Jun;10(2):333-43. doi: 10.1007/s11481-015-9587-z. Epub 2015 Jan 23. PMID: 25614186; PMCID: PMC4470806.
91. Yuan M, K. S., Cheng Q, Zoumalan R, Tashkin DP, Roth MD. Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J Neuroimmunol.* 2002 Dec;133(1-2):124-31. doi: 10.1016/s0165-5728(02)00370-3. PMID: 12446015.
92. Newton CA, C. P., Perkins I, Klein TW. CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors mediate different aspects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced T helper cell shift

- following immune activation by *Legionella pneumophila* infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2009 Mar;4(1):92-102. doi: 10.1007/s11481-008-9126-2. Epub 2008 Sep 16. PMID: 18792785.
93. van der Windt GJ, E. B., Chang CH, Curtis JD, Freitas TC, Amiel E, Pearce EJ, Pearce EL. Mitochondrial respiratory capacity is a critical regulator of CD8+ T cell memory development. *Immunity.* 2012 Jan 27;36(1):68-78. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.007. Epub 2011 Dec 28. PMID: 22206904; PMCID: PMC3269311.
 94. Raud B, M. P., Jones RG, Sparwasser T, Berod L. Fatty acid metabolism in CD8+ T cell memory: Challenging current concepts. *Immunol Rev.* 2018 May;283(1):213-231. doi: 10.1111/imr.12655. PMID: 29664569; PMCID: PMC6691976.
 95. Zhang YF, Y. Z., Song DG, Zhou XH, Wang YZ. Effects of cannabinoid receptor 1 (brain) on lipid accumulation by transcriptional control of CPT1A and CPT1B. *Anim Genet.* 2014 Feb;45(1):38-47. doi: 10.1111/age.12078. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23914904.
 96. Huang H, M. A., Martin GG, Dangott LJ, Kier AB, Schroeder F. Structural and Functional Interaction of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol with Liver Fatty Acid Binding Protein (FABP1). *Biochemistry.* 2018 Oct 16;57(41):6027-6042. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00744. Epub 2018 Oct 3. PMID: 30232874.
 97. Athanasiou A, C. A., Turner AE, Kumaran NM, Vakilpour S, Smith PA, Bagiokou D, Bradshaw TD, Westwell AD, Fang L, Lobo DN, Constantinescu CS, Calabrese V, Loesch A, Alexander SP, Clothier RH, Kendall DA, Bates TE. Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Dec 7;364(1):131-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.09.107. Epub 2007 Oct 2. PMID: 17931597.
 98. Schurich A, P. L., Jajbhay D, Wijngaarden J, Otano I, Gill US, Hansi N, Kennedy PT, Nastouli E, Gilson R, Frezza C, Henson SM, Maini MK. Distinct Metabolic Requirements of Exhausted and Functional Virus-Specific CD8 T Cells in the Same Host. *Cell Rep.* 2016 Aug 2;16(5):1243-1252. doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.078. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27452473; PMCID: PMC4977274.
 99. Renner K, G. A., Fante M, Bruss C, Färber S, Schönhammer G, Peter K, Singer K, Andreesen R, Hoffmann P, Oefner P, Herr W, Kreutz M. Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions. *Eur J Immunol.* 2015 Sep;45(9):2504-16. doi: 10.1002/eji.201545473. Epub 2015 Jul 20. PMID: 26114249.

7. Annexes

7.1. Licence du cannabis :



PROTECTED B / PROTÉGÉ B

Licence No. - N° de licence
LIC-ZDGZIUJ3TA-2021

LICENCE

This licence is issued in accordance with the *Cannabis Act* and *Cannabis Regulations*

LICENCE

Cette licence est délivrée conformément à la *Loi sur le cannabis* et le *Règlement sur le cannabis*

Licence Holder / Titulaire de la licence :
Institut National de la Recherche Scientifique

The above-mentioned person is authorized to conduct, at the site specified on this licence, the activities listed below for the following licence classes and subclasses:

- Research

Site and authorized activities

Site	Activities	Activités
531 BOULEVARD DES PRAIRIES LABO 18-B016 LAVAL, QC, CANADA, H7V1B7	<ul style="list-style-type: none"> • to possess cannabis for the purpose of research 	<ul style="list-style-type: none"> • aux fins de recherche, avoir du cannabis en sa possession

Conditions

This licence is restricted, in addition to all other applicable conditions, in that all research conducted under this licence is based on the Research Protocol "Effet immunosuppresseur du THC sur le système immunitaire" provided to Health Canada on January 12, 2021.	Cette licence est restreinte, en plus des autres conditions qui s'appliquent, du fait que toute la recherche effectuée sous cette licence est basée sur le protocole de recherche « Effet immunosuppresseur du THC sur le système immunitaire », fourni à Santé Canada le 12 janvier 2021.
The maximum quantity of cannabis to be stored for the purpose of research at the address indicated on this licence is: 8 mg of dried cannabis (or equivalent) at any given time.	La quantité maximale de cannabis pour des fins de recherche qui peut être entreposé à l'adresse indiquée sur cette licence est : 8 mg de cannabis séché (ou équivalent) en tout temps.
The researcher may only be in possession of cannabis if such possession is to use in accordance with the research protocol submitted.	Le chercheur peut posséder du cannabis seulement si la possession est pour une utilisation en conformité avec le protocole de recherche soumis.
At the end of the research, all cannabis must be destroyed in accordance with s.43 of the <i>Cannabis Regulations</i> unless distributed in a manner authorized by the <i>Cannabis Regulations</i> .	A la fin de la recherche, tout cannabis doit être détruit en conformité avec l'article 43 du <i>Règlement sur le cannabis</i> à moins d'être distribué d'une manière autorisée par le <i>Règlement sur le cannabis</i> .
All record keeping requirements pertaining to this research licence must be met in accordance with Part 11 of the <i>Cannabis Regulations</i> .	Toutes les exigences relatives à la tenue des dossiers de cette licence de recherche doivent être satisfaites conformément à la partie 11 du <i>Règlement sur le cannabis</i> .

Effective date of the licence:

This licence is effective as of **February 22, 2021**

Date d'entrée en vigueur de la licence:

Cette licence entre en vigueur à compter du **22 février 2021**

Expiry date of the licence:

This licence expires on **February 22, 2026**

Date d'expiration de la licence:

La présente licence expire le **22 février 2026**

Director, Specialized Authorizations, Controlled Substances and Cannabis Branch
Directeur, Autorisations spécialisées, Direction générale des substances contrôlées et du cannabis

Canada

Activer Window
Accédez aux param

Activer Window
Accédez aux param

7.2. Fiche de suivi de l'utilisation des substances cannabinoïdes

Research Activities for Cannabis (Please keep original copy in controlled substance log book and copy in lab notebook)

License Holder Name: Julien Van Grevenynghe

Performed by:
(a) Cherifa Beji

Controlled
Substance Supplier: Sigma Aldrich

(b) Xavier Dagenais-Lussier

Date: _____

Time: _____

Type of Inventory (circle correct response): INITIAL; EXPERIMENTAL USE;
QUARTERLY; WEEKLY ANNUAL

Name of Controlled Substance (Strength and Size)	Stock Quantity on Hand at time of use	Stock Quantity Dispensed for Research Use	Stock Quantity Left	Date
THC (1mg/ml): 1 ml	1mg	100µg	900 µg	1/12/2021
THC (1mg/ml): 1 ml	900µg	180µg	720 µg	2/16/2021

Summary of the experiment to be carried and rationale:

In order to comprehend THC effect on the immune system, PBMCs will be activated or not, and treated or not with THC. The cellular response to activation in the presence of THC will be compared to their response in the absence of such a treatment, by focusing on certain cytokines secreted by our immune cells.

Information in the controlled substance book will be retained for a least two (2) years after the day it is prepared.

7.3. Certificat d'éthique



CERTIFICAT D'ÉTHIQUE

Le Comité d'éthique en recherche avec des êtres humains a examiné le projet de recherche identifié ci-dessous.

Titre du projet : Effet immunosuppresseur du THC sur les cellules T

Nom du chercheur principal (ou de l'étudiant) : Julien Van Grevenynghe

Centre : INRS-AFSB

Noms des étudiants inscrits à l'INRS dont les mémoires et/ou thèses découleront du projet, le cas échéant :

Cherifa Beji	Xavier Dagenais Lussier	

Nom du directeur de recherche, le cas échéant :

Nom du co-directeur de recherche, le cas échéant :

Nom de l'organisme subventionnaire ou de commandite : Bourse FRQ-S, CRSNG, Bourse Mitacs Fellowship

Le Comité d'éthique en recherche avec des êtres humains atteste que la recherche proposée impliquant des êtres humains répond aux normes de l'INRS en matière d'éthique.

Le présent certificat d'éthique est valide jusqu'au 26 novembre 2021

 Signature du président	27 novembre 2020 Date d'émission initiale du certificat
---	---

CER-20-587

7.4. Pourcentage d'expression de l'IFN γ chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	4.7	3.4	13.1	5.9
2	5.9	2.6	14.7	12.2
3	3.9	3.9	12.1	8.8
4	4.1	2.2	13.3	7.3
5	8	6.3	22.6	20.8
6	3.5	3.1	15.4	10.6
mean	5.0	3.6	15.2	10.9
SD	1.7	1.5	3.8	5.3
p value	0.0306		0.0042	
Stat (/THC)	ns		**	
p value			0.0083	
Stat (/TcR)			**	

7.5. MFI d'expression de l'IFN γ chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	38	32	127	62
2	41	23	219	132
3	34	29	141	59
4	35	21	133	54
5	51	40	353	230

6	32	26	512	110
mean	38.5	28.5	247.5	107.8
SD	6.9	6.9	155.5	67.7
p value			0.0464	
Stat (/THC)			*	
p value			0.0214	
Stat (/TcR)			*	

7.6. Pourcentage d'expression du TNF α chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	3	2.7	12.7	8.2
2	4.1	3.8	15	16.9
3	3.4	6.4	15.3	16.7
4	4.1	3.3	14.9	17.4
5	5.4	8.6	16.9	34.2
6	1.9	3.7	11.9	21.3
mean	3.7	4.8	14.5	19.1
SD	1.2	2.3	1.8	8.5
p value	0.1928	/	0.1931	/
Stat (/THC)	ns	/	ns	/
p value	<0.0001	0.0036	/	/
Stat (/TcR)	****	**	/	/

7.7. MFI d'expression du TNF α chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	338	321	447	404
2	372	356	475	497
3	344	379	487	551
4	352	346	463	485
5	387	417	485	644
6	333	346	432	522
mean	354.3	360.8	464.8	517.2
SD	21.0	33.3	21.9	79.4
p value	0.5178		0.1227	
Stat (/THC)	ns		ns	
p value			<0.0001	
Stat (/TcR)			****	

7.8. Pourcentage d'expression de l'IL-2 chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	1.2	0.6	5.8	3.3
2	0.8	0.5	3.2	4.4
3	0.7	0.8	3.3	3.1
4	0.5	0.7	4	3.4

5	1.2	1	4.3	9.1
6	2.5	2.8	10.5	13.8
mean	1.2	1.1	5.2	6.2
SD	0.7	0.9	2.8	4.4
p value	0.5777	/	0.4033	/
Stat (/THC)	ns	/	ns	/
p value	0.0053	0.0175	/	/
Stat (/TcR)	**	*	/	/

7.9. MFI d'expression de l'IL-2 chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	157	143	173	161
2	153	142	165	172
3	151	146	162	163
4	146	143	168	162
5	156	153	171	183
6	157	150	182	186
mean	153.3	146.2	170.2	171.2
SD	4.3	4.4	7.0	11.1
p value	0.0113		0.791	
Stat (/THC)	*		ns	
p value			0.0007	
Stat (/TcR)			***	

7.10. Polyfonctionnalité chez les T-CD8s

	24h											
	Triple				Double				Single			
	NA		TcR		NA		TcR		NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC	NT	THC	NT	THC	NT	THC	NT	THC
1	1.5	2	6.4	7	4.7	9.4	31.9	29.8	93.8	88.6	61.8	63.2
2	0.7	2.1	4.8	4.3	5.2	10.4	28.5	34.2	94	87.5	66.7	61.5
3	1.8	2.2	6	4.5	6.6	12.3	33	39.3	91.6	85.4	61	56.3
4	1.9	2.2	5.4	6.9	5.3	6.2	24.9	36.6	92.8	91.6	69.7	56.5
5	1.8	1.9	5.8	11.3	9	12.3	26.7	43.6	89.2	85.7	67.5	45
6	0	3.3	5.5	11.8	7.2	10.2	34.6	38	92.9	86.5	59.8	50.3
mean	1.3	2.3	5.7	7.6	6.3	10.1	29.9	36.9	92.4	87.6	64.4	55.5
SD	0.8	0.5	0.6	3.2	1.6	2.3	3.8	4.7	1.8	2.3	4.1	6.8
p value	0.0995	/	0.1903	/	0.0033	/	0.0488	/	0.0025	/	0.0452	/
Stat (/THC)	ns	/	ns	/	**	/	*	/	**	/	*	/
p value	<0.0001	0.0076	/	/	<0.0001	<0.0001	/	/	<0.0001	<0.0001	/	/
Stat (/TcR)	****	**	/	/	****	****	/	/	****	****	/	/

7.11. Pourcentage d'expression de la GrzB chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	16.8	14.1	25.2	13
2	53	50.1	74.4	57.6
3	36.1	34.4	43.6	30.4

4	28.8	27.9	45.5	33.5
5	41.3	37.2	67.6	51.1
6	21.8	19.2	50.6	26.7
mean	33.0	30.5	51.2	35.4
SD	13.3	13.0	17.7	16.4
p value	0.0026	/	0.0004	/
Stat (/THC)	ns	/	***	/
p value	0.0042	0.1234	/	/
Stat (/TcR)	**	ns	/	/

7.12. MFI d'expression de la GrzB chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	879	805	1799	824
2	3726	3244	7636	5923
3	3238	3679	5439	3492
4	1713	1512	3685	2837
5	2550	2433	5504	4946
6	1350	1519	4133	2695
mean	2242.7	2198.7	4699.3	3452.8
SD	1115.6	1114.9	1978.9	1799.8
p value	0.7479		0.0024	
Stat (/THC)	ns		**	
p value			0.0019	

Stat (/TcR)			**	
-------------	--	--	----	--

7.13. Pourcentage d'expression de la Prf chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	11.7	12	32.4	19.4
2	22.2	18.9	45.1	43.2
3	21.9	23.6	40.6	33.9
4	14.2	10	37.7	32
5	24.8	24.7	44.9	50.8
6	9.5	11.2	33.5	37.8
mean	17.4	16.7	39.0	36.2
SD	6.4	6.5	5.5	10.7
p value	0.5560	/	0.3728	/
Stat (/THC)	ns	/	ns	/
p value	<0.0001	0.0024	/	/
Stat (/TcR)	****	**	/	/

7.14. MFI d'expression de la Prf chez les T-CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	424	430	548	471
2	487	465	622	612

3	485	500	623	564
4	437	411	580	546
5	507	503	622	658
6	404	412	553	575
mean	457.3	453.5	591.3	571.0
SD	41.2	42.0	35.7	63.2
p value	0.6005		0.3153	
Stat (/THC)	ns		ns	
p value			<0.0001	
Stat (/TcR)			****	

7.15. Pourcentage de la double expression (GrzB⁺, Prf⁺) chez les T- CD8s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	8.3	7.4	17.3	7.2
2	30.2	28.4	51.7	42.6
3	24	23.9	34.5	24.2
4	14	12.1	31.6	21.9
5	25.7	23.9	49.1	38
6	10.4	9.8	33.6	18.3
mean	18.8	17.6	36.3	25.4
SD	9.0	8.8	12.6	13.0
p value	0.0123		<0.0001	
Stat (/THC)	*		****	
p value			0.0011	
Stat (/TcR)			**	

7.16. Pourcentage d'expression de l'IFN γ chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	10.1	77.3	14.2	9.1
2	7.3	3.5	10.5	9.2
3	5.9	5.8	8.5	7.6
4	8.1	4.8	13.3	8.2
5	12.2	9.2	12.4	12.5
6	7.2	6.7	9.5	12.1
mean	8.5	17.9	11.4	9.8
SD	2.3	29.2	2.2	2.0
p value			0.2468	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.0084	
Stat (/TcR)			**	

7.17. MFI d'expression de l'IFN γ chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	129	130	508	438
2	128	124	243	280
3	125	127	350	181
4	126	125	235	206
5	130	130	290	251

6	124	131	840	389
mean	127.0	127.8	411.0	290.8
SD	2.4	2.9	232.8	102.2
p value			0.1543	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.0310	
Stat (/TcR)			*	

7.18. Pourcentage d'expression du TNF α chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	37.7	34.2	55.5	51.8
2	31.3	28.9	57.4	59.2
3	28.6	33.9	52	52.6
4	37.4	32.6	61.8	67.3
5	39.4	47.1	57.7	69.5
6	34.6	41.3	49.5	66.3
mean	34.8	36.3	55.7	61.1
SD	4.2	6.6	4.4	7.7
p value			0.1389	
Stat (/THC)			ns	
p value			<0.0001	
Stat (/TcR)			****	

7.19. MFI d'expression du TNF α chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	466	462	606	617
2	457	446	564	610
3	447	462	584	610
4	462	454	574	620
5	471	483	548	620
6	461	474	533	647
mean	460.7	463.5	568.2	620.7
SD	8.2	13.4	26.0	13.7
p value	0.3115		0.0003	
Stat (/THC)	ns		***	
p value			0.0169	
Stat (/TcR)			*	

7.20. Pourcentage d'expression de l'IL-2 chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	0.6	0.2	1.7	0.1
2	0.1	0.1	1	1.3
3	0.1	0.1	0.6	0.6
4	0.2	0.1	0.9	0.8
5	0.3	0.1	0.7	1.6
6	0.6	0.4	0.8	1.8
mean	0.3	0.2	1.0	1.0

SD	0.2	0.1	0.4	0.6
p value			0.8369	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.0055	
Stat (/TcR)			**	

7.21. MFI d'expression de l'IL-2 chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	259	250	276	273
2	264	255	311	269
3	265	261	295	290
4	263	254	290	266
5	260	258	273	283
6	255	254	257	275
mean	261.0	255.3	283.7	276.0
SD	3.7	3.8	19.0	9.0
p value			0.0162	
Stat (/THC)			*	
p value			0.4345	
Stat (/TcR)			ns	

7.22. Pourcentage d'expression de GrzB chez les T-CD4s mémoires

	24h	
	NA	TcR

	NT	THC	NT	THC
1	6.7	6.6	6.7	6.9
2	1.2	1.3	7.2	2.2
3	5.5	3.2	3.5	2.5
4	2.3	2.3	2.7	1.7
5	4.7	3.3	7.4	4
6	3	2.8	7	5.3
mean	3.9	3.3	5.8	3.8
SD	2.1	1.8	2.1	2.0
p value			0.0501	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.1826	
Stat (/TcR)			ns	

7.23. MFI d'expression de GrzB chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	2734	2775	4019	3075
2	3962	3745	2354	3442
3	4210	4664	3582	4228
4	3526	3307	3666	3948
5	3301	3519	3224	3746
6	2871	3193	3627	3599
mean	3434.0	3533.8	3412.0	3673.0
SD	585.5	642.7	576.7	401.4
p value	0.3115		0.4296	
Stat (/THC)	ns		ns	
p value			0.8813	

Stat (/TcR)			ns	
-------------	--	--	----	--

7.24. Pourcentage d'expression de la Prf chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	12.1	14.4	26.6	19.9
2	9.6	7.4	29.8	28.4
3	10.9	11.6	22.5	21.4
4	11.5	7.6	30.3	28
5	15.5	15.8	23.2	30.9
6	8.9	10	17.3	27.8
mean	11.4	11.1	25.0	26.1
SD	2.3	3.5	4.9	4.4
p value	0.1345		0.6942	
Stat (/THC)	ns		ns	
p value			0.0015	
Stat (/TcR)			**	

7.25. MFI d'expression de la Prf chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	673	678	710	686

2	660	652	699	693
3	673	677	705	698
4	669	657	704	698
5	670	666	694	704
6	664	665	683	707
mean	668.2	665.8	699.2	697.7
SD	5.2	10.4	9.6	7.6
p value			0.8325	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.0002	
Stat (/TcR)			***	

7.26. Pourcentage de la double expression (GrzB⁺, Prf⁺) chez les T- CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	2.5	2.5	4.2	3
2	0.3	0.3	3.6	1
3	2.2	1.4	1.9	1.4
4	0.8	0.6	1.5	0.9
5	1.7	1.3	3.6	2.4
6	0.7	0.7	3.3	2.6
mean	1.4	1.1	3.0	1.9
SD	0.9	0.8	1.1	0.9
p value	0.1345		0.0161	
Stat (/THC)	ns		*	
p value			0.0263	
Stat (/TcR)			*	

7.27.

7.28. Pourcentage de l'expression (GrzB⁺, Prf⁺, IFN γ) chez les T- CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	0.45	0.33	1.89	0.95
2	0.02	0.01	1.09	0.17
3	0.31	0.15	0.61	0.30
4	0.16	0.06	0.37	0.15
5	0.27	0.18	1.32	0.93
6	0.06	0.08	1.48	0.61
mean	0.2	0.1	1.1	0.5
SD	0.2	0.1	0.6	0.4
p value				0.0068
Stat (/THC)				**
p value	0.0404		0.0088	
Stat (/TcR)	*		**	

7.29. Pourcentage de l'expression (GrzB⁺, Prf⁺, TNF α) chez les T- CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	1.58	1.42	3.14	2.07

7.31. MFI d'expression de l'IFN γ chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	136	136	693	679
2	140	137	405	341
3	132	142	438	337
4	134	134	408	287
5	142	138	473	371
6	134	141	1611	649
3.5	136.3	138.0	671.3	444.0
SD	3.9	3.0	472.8	172.8
p value			0.1845	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.0396	
Stat (/TcR)			*	

7.32. Pourcentage d'expression du TNF α chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	5.7	5.1	18.3	15.2
2	7.5	8	22.5	24.9
3	4.1	6.4	18.3	18.8

4	7.6	5.5	20.5	24.4
5	7.2	10	17.6	29.3
6	7.5	12.2	19.9	36.1
mean	6.6	7.9	19.5	24.8
SD	1.4	2.8	1.8	7.4
p value			0.1358	
Stat (/THC)			ns	
p value			<0.0001	
Stat (/TcR)			****	

7.33. MFI d'expression du TNF α chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	1107	1178	1257	1414
2	1037	960	1168	1270
3	1378	1117	1316	1449
4	1001	1064	1140	1309
5	1082	948	1141	1267
6	947	963	1121	1358
mean	1092.0	1038.3	1190.5	1344.5
SD	151.3	96.3	78.1	75.8
p value			0.0005	
Stat (/THC)			***	
p value			0.0401	
Stat (/TcR)			*	

7.34. Pourcentage d'expression de l'IL-2 chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	1.7	0.9	1.4	0.7
2	2.6	1.8	3.7	4.1
3	0.9	0.9	1.5	1.2
4	1.2	0.7	1.4	1.1
5	1.7	1	1.7	1.9
6	1.8	1.7	3.6	5.6
mean	1.7	1.2	2.2	2.4
SD	0.6	0.5	1.1	2.0
p value			0.6034	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.1338	
Stat (/TcR)			ns	

7.35. MFI d'expression de l'IL-2 chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	441	436	410	380
2	424	394	397	380
3	413	411	414	398
4	379	390	399	383
5	414	371	392	389

6	381	368	381	368
mean	408.7	395.0	398.8	383.0
SD	24.4	25.6	12.0	10.0
p value			0.0065	
Stat (/THC)			**	
p value			0.2818	
Stat (/TcR)			ns	

7.36. Pourcentage d'expression de la GrzB chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	6.2	6.7	10.1	9.4
2	2.3	2.5	22.7	6.1
3	13.2	12.4	15.2	9.8
4	3.5	3.9	9.2	4.2
5	8.8	8.5	21.2	13.5
6	4	4.3	17.3	9.3
mean	6.3	6.4	16.0	8.7
SD	4.1	3.6	5.6	3.2
p value			0.0203	
Stat (/THC)			*	
p value			0.0198	
Stat (/TcR)			*	

7.37. MFI d'expression de la GrzB chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	2929	3079	5490	4344
2	5404	5511	2678	5022
3	5850	7720	6368	7777
4	4932	4776	4777	6136
5	4511	4961	3551	4497
6	3902	5433	5251	5798
mean	4588.0	5246.7	4685.8	5595.7
SD	1058.8	1498.3	1350.8	1280.2
p value			0.1156	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.9016	
Stat (/TcR)			ns	

7.38. Pourcentage d'expression de la Prf chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	17.6	20.3	42.8	31.6
2	18.6	16.5	46.2	44.1
3	20.2	22.7	38.9	36.5
4	19.4	14.1	45.8	39.4
5	24.5	25.4	40.3	48.4
6	17.9	23.8	38.1	49.5
mean	19.7	20.5	42.0	41.6
SD	2.5	4.4	3.5	7.0

p value			0.9067	
Stat (/THC)			ns	
p value			<0.0001	
Stat (/TcR)			****	

7.39. MFI d'expression de la Prf chez les T-CD4s totales

	24h			
	NA		TcR	
	NT	THC	NT	THC
1	717	702	756	722
2	750	732	745	743
3	722	759	772	776
4	736	708	751	734
5	747	715	734	756
6	744	742	736	763
mean	736.0	726.3	749.0	749.0
SD	13.7	21.9	14.1	19.8
p value			0.9999	
Stat (/THC)			ns	
p value			0.2820	
Stat (/TcR)			ns	

7.40. MFI de positivité du CPT1a chez les T-CD8s totales

	24h	
	NA	TcR

	NT	THC	NT	THC
1	2666	2631	3444	2296
2	2488	2211	3361	3006
3	2202	2608	2863	2257
4	2173	2138	2633	2385
5	2388	2436	2898	2701
6	2503	2044	3223	2665
mean	2403.3	2344.7	3070.3	2551.7
SD	173.2	227.5	291.9	265.1
p value	0.6472			0.0149
Stat (/THC)	ns			*
p value			0.0001	
Stat (/Act)			***	

7.41. MFI de positivité du CPT1a chez les T-CD4s mémoires

	24h			
	NA		TcR	
	NA-NT	THC	TCR-NT	TCR-THC
1	2862	2604	3400	2580
2	2408	2200	3350	3055
3	2200	2621	3076	2386
4	2245	2256	2790	2534
5	2268	2374	2952	2660
6	2685	2223	3390	2810
mean	2444.7	2379.7	3159.7	2670.8
SD	246.4	173.5	235.9	214.2
p value	0.6315		0.0042	
Stat (/THC)	ns		**	

p value			0.0001	
Stat (/Act)			***	