

# **Méthodes en immunologie**

**Des principes aux bonnes applications**

## *Chez le même éditeur*

---

### *Du même auteur :*

Guides des analyses en immunologie : indications, critères de réalisation et limites, 284 pages, 2014.

Immunologie fondamentale et immunopathologie. Enseignements thématique et intégré - Tissu lymphoïde et sanguin/Immunopathologie et immuno-intervention, 280 pages, 2013.

### *Autres ouvrages :*

Bactériologie médicale, 2<sup>e</sup> édition, par François Denis, Marie-Cécile Ploy, Christian Martin, Edouard Bingen, Roland Quentin, 640 pages, 2011.

Gaz du sang facile, par Iain A M Hennessey, Alan G Japp, Éric Raynaud de Mauverger, 152 pages, 2010.

Le bilan biochimique facile, Jeremy Hughes, Ashley Jefferson, Éric Raynaud de Mauverger, 248 pages, 2009.

Guide thérapeutique 2014, 7<sup>e</sup> édition, par Léon Perlemuter et Gabriel Perlemuter, 2 368 pages, à paraître.

Dictionnaire médical, 6<sup>e</sup> édition, version électronique et atlas anatomique inclus, par Jacques Quevauvilliers, 1 608 pages, 2009.

# Méthodes en immunologie

## Des principes aux bonnes applications

Collège des enseignants d'immunologie (Assim)

Coordinateurs de l'ouvrage :

Marie Christine Béné

Christian Drouet

Sylvain Fisson

Estelle Seillès



ELSEVIER  
MASSON



Ce logo a pour objet d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, tout particulièrement dans le domaine universitaire, le développement massif du « photo-copillage ». Cette pratique qui s'est généralisée, notamment dans les établissements d'enseignement, provoque une baisse brutale des achats de livres, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.

Nous rappelons donc que la reproduction et la vente sans autorisation, ainsi que le recel, sont passibles de poursuites. Les demandes d'autorisation de photocopier doivent être adressées à l'éditeur ou au Centre français d'exploitation du droit de copie : 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris. Tél. 01 44 07 47 70.

Tous droits de traduction, d'adaptation et de reproduction par tous procédés, réservés pour tous pays. Toute reproduction ou représentation intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, des pages publiées dans le présent ouvrage, faite sans l'autorisation de l'éditeur est illicite et constitue une contrefaçon. Seules sont autorisées, d'une part, les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective et, d'autre part, les courtes citations justifiées par le caractère scientifique ou d'information de l'œuvre dans laquelle elles sont incorporées (art. L. 122-4, L. 122-5 et L. 335-2 du Code de la propriété intellectuelle).

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés

ISBN : 978-2-294-74022-0

ISBN numérique : 978-2-294-74159-3

Dépôt légal : septembre 2014

---

Elsevier Masson SAS, 62, rue Camille-Desmoulins, 92442 Issy-les-Moulineaux cedex

[www.elsevier-masson.fr](http://www.elsevier-masson.fr)

# Liste des collaborateurs

*Ce livre a été rédigé sous l'égide de l'ASSIM, Association des Collèges des Enseignants d'Immunologie.*

*L'ensemble de l'ouvrage a été coordonné par :*

**Marie Christine Béné**, PU-PH en Hématologie, CHU de Nantes & Faculté de Médecine, Université de Nantes.

**Christian Drouet**, PU-PH en Immunologie, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405, Faculté de Pharmacie & CHU de Grenoble.

**Sylvain Fisson**, Professeur des Universités en Immunologie, Faculté des Sciences Fondamentales Appliquées, Université d'Évry Val d'Essonne (UEVE).

**Estelle Seillès**, PU-PH en Immunologie, CHU de Besançon & Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche-Comté.

*La rédaction de chaque chapitre a été pilotée par un ou plusieurs coordonnateurs et sa rédaction réalisée par un groupe d'auteurs.*

## Introduction générale

Marie Christine Béné, Christian Drouet, Sylvain Fisson et Estelle Seillès.

## Partie I – Techniques immunologiques

*Coordonnateurs* : Sandrine Billaud, Stéphane Birklé, Sylvie Chollet-Martin, Cécile Contin-Bordes, Ludovic Freyburger, Brigitte Gubler, Gilles Thibault

*Auteurs* :

**Patricia Amé-Thomas**, Université de Rennes 1 Faculté de Médecine et CHU de Rennes Pontchaillou.

**Karim Arafah**, Université Joseph-Fourier, Plateforme BioPark d'Archamps, Archamps.

**Jacques Aubry**, l'UNAM Nantes Faculté de Pharmacie.

**Jean-Luc Aymeric**, Université de Montpellier 2 Faculté des Sciences.

**Marie Christine Béné**, l'UNAM Nantes Faculté de Médecine et CHU de Nantes.

**Sandrine Billaud**, l'UNAM Angers Faculté de Pharmacie.

**Stéphane Birklé**, l'UNAM Nantes Faculté de Pharmacie.

**Philippe Bulet**, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405, Grenoble.

**Claude Capron**, Université de Versailles St Quentin en Yvelines Faculté de Médecine et Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt.

**Guislaine Carcelain**, Université Pierre et Marie Curie Faculté de Médecine et Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Paris.

**Alain Chevailler**, l'UNAM Angers Faculté de Médecine & CHU d'Angers.

**Sylvie Chollet-Martin**, Université Paris Sud Faculté de Pharmacie et Hôpital Bichat, Paris.

**Cécile Contin-Bordes**, Université Bordeaux Segalen Faculté de Médecine et CHU de Bordeaux.

**Marie-Hélène Delfau-Larue**, Université Paris-Est Créteil Faculté de Médecine et Hôpital Henri Mondor, Créteil.

**Olivier Diaz**, Université Claude Bernard Lyon 1 INSERM U1111.

**Christian Drouet**, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405 Faculté de Pharmacie et CHU de Grenoble.

**Sylvain Dubucquoi**, Université de Lille 2 Faculté de Médecine et CHU de Lille.

**Sylvie Chollet-Martin**, Université Paris Sud Faculté de Pharmacie et Hôpital Bichat, Paris.

- Sylvain Fisson**, Université d'Évry Val d'Essonne (UEVE), Faculté des Sciences Fondamentales Appliquées.
- Bertrand Favier**, Université Joseph-Fourier Grenoble FRE CNRS 3405.
- Ludovic Freyburger**, VetAgro Sup Campus vétérinaire de Lyon.
- Jean-Pol Frippiat**, Université de Lorraine Faculté des sciences Nancy.
- Marie-Anne Gougerot-Pocidalò**, Université Denis-Diderot Faculté de Médecine et Hôpital Bichat, Paris.
- Brigitte Gubler**, Université de Picardie Jules Verne Faculté de Médecine et CHU d'Amiens.
- Christine Legrand-Frossi**, Université de Lorraine Faculté des Sciences et technologies.
- Brigitte Le Mauff**, Université de Caen Basse-Normandie Faculté de Médecine et CHU de Caen.
- François Lemoine**, Université Pierre et Marie Curie Faculté de Médecine et Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Paris.
- Damien Masson**, l'UNAM Nantes Faculté de Médecine et CHU de Nantes.
- Jeanne Moreau**, Université de Limoges, Faculté de Pharmacie.
- Jean-François Nicolas**, Université Claude Bernard Lyon 1 Faculté de Médecine et Hospices Civils de Lyon.
- Olivier Nüsse**, Université Paris Sud.
- Franck Pagès**, Université René Descartes Faculté de Médecine et Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris.
- Denise Ponard**, Université Joseph-Fourier et CHU de Grenoble.
- Philippe Robert**, Bioprojet Biotech.
- Paul Rouzaire**, Université d'Auvergne Faculté de Pharmacie et CHU de Clermont-Ferrand.
- Géraldine Schlecht-Louf**, Université Paris Sud.
- Nabila Seddiki**, Université Paris-Est Créteil Faculté de Médecine et Hôpital Henri-Mondor, Créteil.
- Ghislaine Sterkers**, Université Denis Diderot Faculté de Médecine et Hôpital Robert Debré, Paris.
- Gilles Thibault**, Université François Rabelais Faculté de Pharmacie et CHU Bretonneau, Tours.
- Arlette Tridon**, Université d'Auvergne Faculté de Pharmacie et CHU de Clermont-Ferrand.
- Florence Velge-Roussel**, Université François Rabelais Faculté de Pharmacie, Tours.
- Joana Vitte**, Université de la Méditerranée Aix-Marseille Faculté de Médecine et Hôpital de la Conception, Marseille.

## Partie II – Exemples d'applications

*Coordonnateurs*: Patricia Amé-Thomas, Jacques Bienvenu, Alain Chevailler, Marie-Agnès Dragon-Duret, Christian Drouet, Myriam Labalette, Marie-Paule Lefranc, Brigitte Le Mauff, Jean-Yves Muller, Estelle Seillès.

### *Auteurs* :

- Eltaf Alamyar**, Université de Montpellier 2 Faculté des Sciences et Techniques.
- Patricia Amé-Thomas**, Université de Rennes 1 Faculté de Médecine et CHU de Rennes Pontchaillou.
- Jacques Bienvenu**, Université Claude Bernard Lyon 2 Faculté de Pharmacie et Hospices Civils de Lyon.
- Marie-Laure Boulland**, CHU de Rennes Pontchaillou et Faculté de Médecine, Université de Rennes 1.
- Delphine Charignon**, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405 et CHU de Grenoble.
- Alain Chevailler**, l'UNAM Faculté de Médecine et CHU d'Angers.
- Jacques Chiaroni**, Université de la Méditerranée Aix-Marseille Faculté de Médecine et EFS Alpes-Méditerranée.
- Federica Defendi**, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405 et CHU de Grenoble.

**Marie-Agnès Dragon-Duret**, Université René Descartes Faculté de Médecine et Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris.

**Christian Drouet**, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405 Faculté de Pharmacie et CHU de Grenoble.

**Patrice Duroux**, Université de Montpellier 2 Faculté des Sciences et Techniques.

**Arije Ghannam**, Université Joseph-Fourier FRE CNRS 3405 et EFS Rhône-Alpes.

**Véronique Giudicelli**, Université de Montpellier 2 Faculté des Sciences et Techniques.

**Myriam Labalette**, Université Lille 2 Faculté de Médecine et CHU de Lille.

**Marie-Paule Lefranc**, Université de Montpellier 2 Faculté des Sciences et Techniques.

**Brigitte Le Mauff**, Université de Caen Basse-Normandie Faculté de Médecine et CHU de Caen.

**Charline Marotel**, Université de Franche-Comté Faculté de Médecine et de Pharmacie et CHU de Besançon.

**Jean-Yves Muller**, l'UNAM Nantes Faculté de Médecine et CHU de Nantes.

**Denise Ponard**, Université Joseph-Fourier et CHU de Grenoble.

**Vanessa Ratié**, Université de Franche-Comté Faculté de Médecine et EFS Bourgogne Franche-Comté, Besançon.

**Marie-Nathalie Sarda**, Université Claude Bernard Lyon 2 Faculté de Médecine et Hospices Civils de Lyon.

**Souphatta Sasorith**, Université de Montpellier 2 Faculté des Sciences et Techniques.

**Estelle Seillès**, Université de Franche-Comté Faculté de Médecine et de Pharmacie et CHU de Besançon.

**Jean-Luc Taupin**, Université Bordeaux Segal Faculté de Médecine et CHU de Bordeaux.

**Arlette Tridon**, Université d'Auvergne Faculté de Pharmacie et CHU de Clermont-Ferrand.

# Abréviations

<b>ABC</b>	<i>Avidin-Biotin Complex</i>	<b>FLISA</b>	<i>Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>Ac</b>	Anticorps	<b>FPIA</b>	<i>Fusion Proteins for Immune Applications</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique	<b>FRO</b>	Formes réactives de l'oxygène
<b>Ag</b>	Antigène	<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>APC</b>	Analyse en Composantes Principales	<b>FT-ICR</b>	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique	<b>GEP</b>	<i>Gene Expression Profile</i>
<b>ASO</b>	<i>Allele Specific Oligonucleotides</i>	<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>ATG</b>	<i>Autophagy related genes</i>	<b>HAT</b>	Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine
<b>BcR</b>	<i>B cell Receptor</i>	<b>HGPRT</b>	Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyl-Transférase
<b>BrdU</b>	Bromodéoxyuridine	<b>HLA</b>	<i>Human Leucocyte Antigens</i>
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>	<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>CAM</b>	Complexe d'Attaque Membranaire	<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i>
<b>CDC</b>	<i>Complement Dependent Cytotoxicity</i>	<b>ICM</b>	ImmunoChromatographie sur Membrane
<b>CDR</b>	<i>Complementarity Determining Regions</i>	<b>IEF</b>	Isoélectrofocalisation
<b>CFSE</b>	CarboxyFluorescéine Diacétate Succinimidyl	<b>IG</b>	Immunoglobuline
<b>CFU</b>	<i>Colony Forming Units</i>	<b>IGT<sup>®</sup></b>	<i>international ImMunoGeneTics information system<sup>®</sup></i>
<b>CGD</b>	<i>Chronic Granulomatous Disease</i>	<b>INN</b>	<i>International Nonproprietary Name</i>
<b>CGH</b>	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>	<b>IP</b>	Indice de Phagocytose
<b>CHO</b>	<i>Chinese hamster ovary</i>	<b>KI</b>	<i>Knock-In</i>
<b>CMF</b>	Cytométrie en flux	<b>KO</b>	<i>Knock-Out</i>
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité	<b>LC</b>	<i>Liquid Chromatography</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation</i>	<b>LCR</b>	Liquide Céphalo-Rachidien
<b>CPA</b>	Cellule Présentatrice d'Antigènes	<b>LDA</b>	<i>Limit Dilution Assay</i>
<b>CPCA</b>	<i>Composite Proteins for Clinical Applications</i>	<b>LLC</b>	Leucémie Lymphoïde Chronique
<b>cpm</b>	Coups par minute	<b>MALDI</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization</i>
<b>Ct</b>	Cycle threshold	<b>MEVB</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>CTL</b>	<i>Cytotoxic T Lymphocytes</i>	<b>MET</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>DCI</b>	Dénomination Commune Internationale	<b>MGUS</b>	<i>Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance</i>
<b>DGVB</b>	<i>Dextrose Gelatin Veronal Buffer</i>	<b>MH</b>	<i>Major Histocompatibility</i>
<b>DO</b>	Densité Optique	<b>MLR</b>	<i>Mixed Lymphocyte Reaction</i>
<b>EBV</b>	<i>Epstein-Barr Virus</i>	<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>ECL</b>	<i>Enhanced chemiluminescence</i>	<b>MS/MS</b>	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tétra-acétique	<b>MSI</b>	<i>Mass Spectrometry Imaging</i>
<b>EIA</b>	<i>Enzyme Immuno Assay</i>	<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	<b>NBT</b>	NitroBleu de Tétrazolium
<b>ELISpot</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot</i>	<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>ESI</b>	<i>ElectroSpray Ionization</i>		
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>		
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>		
<b>FITC</b>	<i>Fluoresceine isothiocyanate</i>		

<b>NHS</b>	N-hydroxysuccinimide	<b>SAGE</b>	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>	<b>SBT</b>	<i>Sequencing Based Typing</i>
<b>NOD</b>	<i>Non-Obese Diabetic</i>	<b>SCID</b>	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé	<b>SDS</b>	Sodium Dodécylsulfate
<b>PAGE</b>	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>	<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
<b>PAL</b>	Phosphatase alcaline	<b>SFC</b>	<i>Spot Forming Cells</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>	<b>SMM</b>	<i>Smoldering Multiple Myeloma</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>pb</b>	Paire de bases	<b>SPR</b>	<i>Surface Plasmonic Resonance</i>
<b>PCA</b>	<i>Principal Component Analysis</i>	<b>SSC</b>	<i>Side scatter</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	<b>SSO</b>	<i>Sequence Specific Oligoprobes</i>
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol	<b>SSP</b>	<i>Sequence Specific Primers</i>
<b>PMF</b>	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>	<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeat</i>
<b>PMT</b>	Photomultiplicateur	<b>SVF</b>	Sérum de Veau Fœtal
<b>PSM</b>	Poste de Sécurité Microbiologique	<b>TAP</b>	<i>Transporter Associated with antigen Processing</i>
<b>PVDF</b>	Polyvinylidène difluorure	<b>TBS</b>	<i>Tris-Buffered Saline</i>
<b>qRT-PCR</b>	<i>Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>	<b>TcR</b>	<i>T cell Receptor</i>
<b>RAI</b>	Recherche des Agglutinines Irrégulières	<b>TR</b>	Récepteur T
<b>Rf</b>	Mobilité relative	<b>RDA</b>	Test Direct à l'Antiglobuline
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	<b>TDR</b>	Test de Diagnostic Rapide
<b>RIA</b>	<i>Radio-Immuno-Assay</i>	<b>TEM</b>	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>	<b>TIA</b>	Test Indirect à l'Antiglobuline
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>	<b>TLR</b>	<i>Toll-Like Receptor</i>
<b>RP</b>	<i>Reversed-Phase</i>	<b>TMA</b>	<i>Tissue MicroArray</i>
<b>RPI</b>	<i>Related Proteins of the Immune System</i>	<b>TOF</b>	<i>Time Of Flight</i>
<b>RT</b>	<i>Reverse Transcription</i>	<b>TROD</b>	Test Rapide à Orientation Diagnostique
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>	<b>UV</b>	Ultraviolets
<b>RU</b>	<i>Resonance Unit</i>	<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine

# Avant-propos

La connaissance du système immunitaire a conduit à développer dans un contexte immunologique des techniques d'analyse moléculaire et cellulaire. Les techniques moléculaires sont utilisées pour l'analyse de la clonalité des réponses immunitaires, pour l'étude des modifications génomiques (ADN) ou transcriptomiques (ARN), en mettant à profit les propriétés des protéines intervenant dans l'immunité avec des dosages quantitatifs ou qualitatifs par les techniques d'immunochimie appliquées à de nombreux ligands. Les techniques cellulaires permettent d'examiner et éventuellement de manipuler les capacités d'expression des gènes et des protéines des cellules de l'immunité. Les propriétés spécifiques des cellules du système immunitaire sont exploitées notamment dans des techniques d'immunophénotypage, de prolifération, de cytotoxicité,

de phagocytose, de bactéricidie ou de migration. À un niveau plus intégré, certaines techniques mettent en jeu tout ou partie des partenaires du système immunitaire dans des tests *in vivo* ou *ex vivo*.

Les principes et caractéristiques majeurs de ces méthodes sont décrits dans la première partie de cet ouvrage, alors que la seconde partie exemplifie dans une série d'applications comment ces technologies peuvent être conjuguées pour des explorations spécifiques.

L'objectif de cet ouvrage est d'apporter aux étudiants, personnels techniques, praticiens et chercheurs, un référentiel méthodologique afin de guider les choix expérimentaux les plus pertinents au regard des questions posées.

*Les coordinateurs*

# Introduction générale

Le système immunitaire est un des grands systèmes physiologiques, intégré, à différents niveaux, à tous les autres systèmes de l'organisme. La protection de l'individu contre les infections a initialement été considérée comme son rôle principal. Ce concept a évolué au fil de l'acquisition des connaissances sur les fonctions du système immunitaire, montrant qu'il est en fait dédié au maintien de l'homéostasie entre l'individu et son environnement. Deux grands cadres régissent l'immunité, respectivement appelés immunité innée et immunité adaptative. L'immunité innée repose sur des barrières mécaniques, chimiques et écologiques (flores microbiennes commensales), ainsi que sur des molécules identifiant des motifs microbiens. L'immunité spécifique, *a contrario*, repose entièrement sur une reconnaissance subtile de motifs moléculaires précis par des récepteurs spécifiques.

La connaissance du système immunitaire permet de :

- étudier la physiologie d'un organisme sain ;
- appréhender le contexte physiopathologique des maladies du système immunitaire et de ses réponses anormales à une agression ;
- l'utiliser comme outil de diagnostic ;
- le mettre à profit en thérapeutique (anticorps monoclonaux, cytokines, cellules...).

Une partie des techniques immunologiques repose sur l'utilisation d'antigènes. Un grand nombre d'entre elles utilise les propriétés des complexes immuns issus de la reconnaissance d'antigènes par des anticorps et fait intervenir les réactions antigène-anticorps. Ces dernières ont des caractéristiques physico-chimiques intrinsèques (précipitation, agglutination) qui permettent la mise en évidence directe du complexe antigène-anticorps. Cette interaction peut également être révélée de façon indirecte (réactions enzymatiques, fluorescence, radio-isotopes).

D'autres techniques analysent les caractéristiques génétiques, protéiques ou fonctionnelles des cellules de l'immunité adaptative ou innée. Enfin, les explorations les plus intégrées appréhendent le système immunitaire dans son ensemble *in vivo*.

La compréhension de ces technologies nécessite un bref rappel des principaux constituants et mécanismes du système immunitaire.

## Points clés du système immunitaire

---

Les **antigènes** sont des substances définies par l'existence d'un récepteur spécifique permettant au système immunitaire de les reconnaître. Ces récepteurs sont fixés à la membrane des lymphocytes T (TCR) ou B (BCR) ou, dans le second cas, également sécrétés et présents sous forme soluble dans les liquides biologiques (anticorps ou immunoglobulines).

Les **récepteurs** des antigènes diffèrent selon la cellule qui les exprime. Une des originalités du système immunitaire est de manipuler le génome des lymphocytes afin de générer une multitude de récepteurs correspondant à tous les antigènes qu'il est susceptible de rencontrer. L'analyse de ce génome modifié permet d'identifier le stade de maturation des lymphocytes et de repérer les proliférations clonales issues de la reconnaissance d'un antigène. Les cellules B reconnaissent directement les antigènes natifs par leurs immunoglobulines de surface, tandis que les lymphocytes T ne reconnaissent que des fragments antigéniques présentés par des molécules spécialisées (restriction par les produits du complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH).

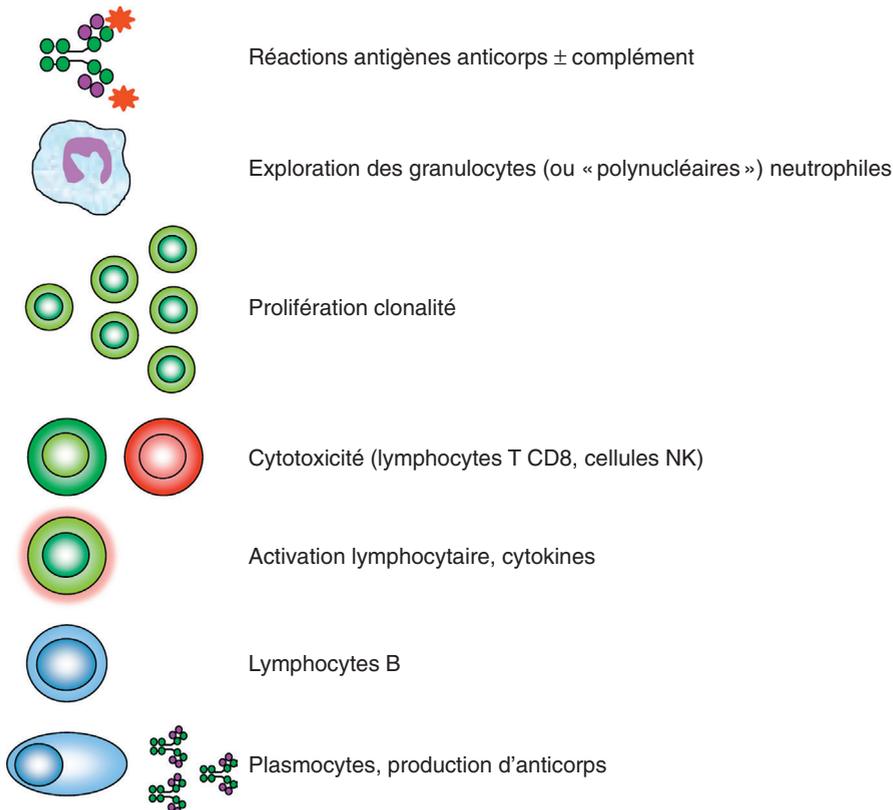
Les **coopérations cellulaires** représentent un élément stratégique du fonctionnement du système immunitaire. Il est ainsi nécessaire que des signaux de danger rendent possible la présentation des

antigènes par les cellules présentatrices professionnelles aux lymphocytes T dans une synapse immunologique. Seules les cellules dendritiques ayant capté et apprêté un antigène sont ainsi capables d'activer les lymphocytes T naïfs spécifiques de ce dernier. Un lymphocyte T, activé et stimulé par des signaux appropriés, devient capable de proliférer et de donner naissance à un clone de cellules possédant le même récepteur pour l'antigène. Une partie de ces cellules se transforme en lymphocytes T mémoire à durée de vie longue qui pourront répondre plus rapidement en cas d'un nouveau contact avec cet antigène. On parle de mémoire immunitaire pour définir cette capacité des lymphocytes à présenter une réponse plus rapide, reposant sur le nombre et les caractéristiques de ces cellules qui ne sont plus naïves. L'autre partie du clone devient des cellules effectrices (fig. 1).

Il faut noter qu'il existe deux grands types de **lymphocytes T** différenciés par la présence à leur

surface de la molécule CD4 qui vérifie que l'antigène (exogène) est présenté par une molécule du CMH de classe II (*e.g.* lymphocytes T auxiliaires ou *helper* : Th), ou de la molécule CD8 qui vérifie que l'antigène (endogène) est présenté par une molécule du CMH de classe I (*e.g.* lymphocytes T cytotoxiques). Les cellules effectrices issues des lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont essentiellement productrices de cytokines, amplifiant les coopérations cellulaires nécessaires au fonctionnement du système immunitaire. Les cellules effectrices issues des lymphocytes CD8<sup>+</sup> sont cytotoxiques et éliminent par contact direct les cellules anormales (infectées par un virus ou tumorales). Les lymphocytes effecteurs ont une durée de vie courte, ils disparaissent par apoptose à la fin de la réponse initiée par l'antigène.

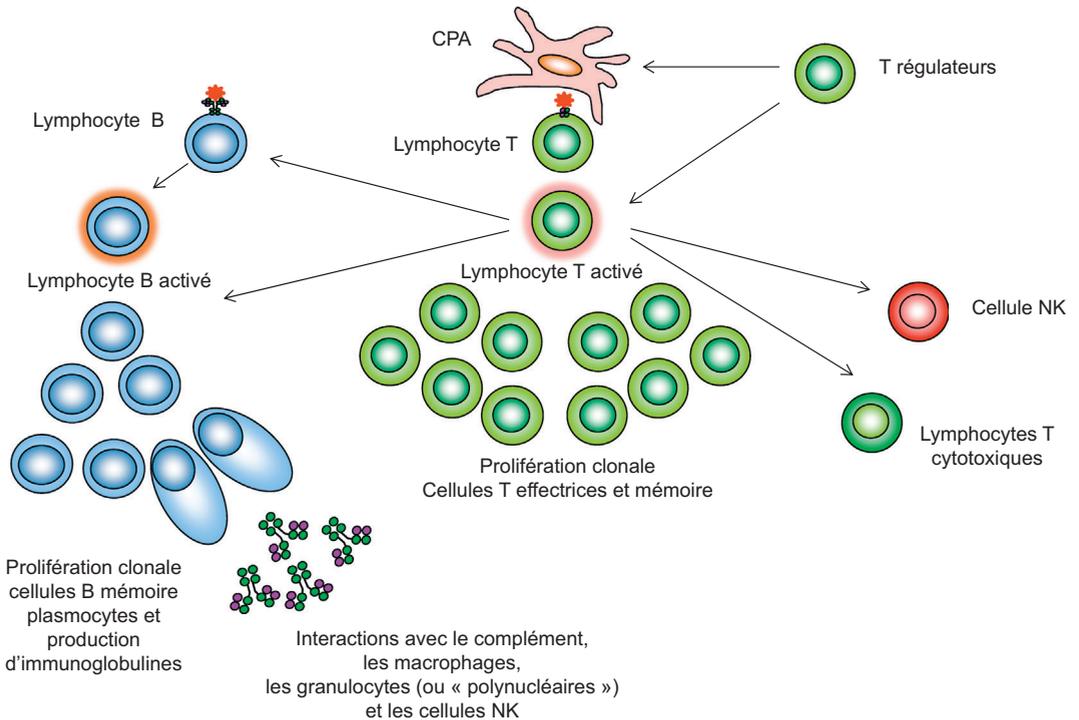
Les **lymphocytes B**, même s'ils ont déjà fixé l'antigène, ont besoin de ces signaux émis par les lymphocytes T auxiliaires pour développer une



**Fig. 1** Réactions mettant en œuvre les acteurs du système immunitaire.

réponse complète. Celle-ci passe également par une étape de prolifération clonale. Comme pour les lymphocytes T, une partie du clone devient des lymphocytes B mémoire. L'autre partie, au sein des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires et après contact avec les cellules dendritiques folliculaires, subit des étapes de remaniement des gènes codant pour les immunoglobulines, de sélection permettant de ne conserver que les cellules douées d'affinité pour l'antigène et de différenciation terminale aboutissant à la formation de plasmocytes. Ces plasmocytes sécrètent de très grandes quantités d'immunoglobulines solubles, puis meurent rapidement par apoptose. Ces immunoglobulines ou anticorps (fig. 2), qui ont une durée de vie de plusieurs semaines, contribuent à l'immunité spécifique humorale dans le sang et les liquides biologiques. Elles sont capables de former des complexes immuns contribuant à l'élimination de l'antigène, à une nouvelle stimulation de lymphocytes B ou T et au processus de sélection dans les centres germinatifs.

**Les réponses immunitaires sont étroitement contrôlées.** Afin de maintenir l'homéostasie, l'ensemble des réponses nécessite une régulation étroite. En premier lieu, il convient d'éviter toute réponse dirigée contre l'hôte, appelée auto-immunité. Ce concept fait l'objet de la sélection négative permettant d'éliminer, dans la moelle osseuse et le thymus, respectivement les lymphocytes B et T dont le BCR ou le TCR possède une très forte affinité contre les antigènes du Soi. En périphérie, plusieurs mécanismes immunorégulateurs maintiennent cette tolérance au Soi (*e.g.* ignorance, anergie, apoptose). En second lieu, il convient de limiter la durée et l'intensité des réponses immunitaires protectrices (contraction) pour éviter qu'elles ne deviennent délétères. Ceci passe par l'apoptose des cellules effectrices mentionnée plus haut, mais également par des cellules spécialisées, telles que les lymphocytes T régulateurs (Treg). De façon générale, la régulation des réponses immunitaires passe aussi par le profil de sécrétion cytokinique des lymphocytes Th. Un profil dit



**Fig. 2** Réponses immunitaires T et B, indiquant quelques cibles cellulaires et les examens immunologiques qui s'y rapportent.

Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ...) favorise les réponses cellulaires des lymphocytes T et active également une autre catégorie de cellules cytotoxiques, les cellules NK (pour *natural killer*). Un profil dit Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13...) favorise les réponses anticorps des lymphocytes B. Ces deux profils sont mutuellement antagonistes. Plusieurs autres profils cytokiniques (*e.g.* Th3, Th17) interviennent dans ce réseau régulateur complexe.

Un autre niveau de complexité pour le maintien de l'homéostasie réside dans les **interactions étroites entre l'immunité innée et l'immunité adaptative**. L'immunité innée préexiste à tout contact avec l'antigène, contrairement à l'immunité adaptative qui est issue d'une amplification des réponses lymphocytaires par activation des récepteurs pour l'antigène. Ces deux types d'immunité peuvent intervenir pour limiter les contacts entre les antigènes exogènes et le système immunitaire en participant à leur exclusion de l'organisme. Par ailleurs, les anticorps réalisent une bonne partie de leur activité en collaborant dans le compartiment soluble avec le complément et en conférant aux macrophages, aux granulocytes (ou « polynucléaires ») et aux cellules NK une spécificité vers des cibles précises. Enfin, certaines sous-populations de lymphocytes T régulateurs coopèrent activement avec des cellules dendritiques dans le contrôle de l'immunité.

## Introduction sur les techniques immunologiques

Les caractères de spécificité et de sensibilité des réponses, leur grande variété d'applications, leur possibilité d'adaptation en nanotechnologie et, plus généralement, la diversité des modes de fonctionnement du système immunitaire offrent de larges possibilités analytiques applicables en laboratoire. Il convient donc dans un premier temps de bien définir la question posée et de choisir la ou les technologies les plus appropriées. Chaque technique présente des avantages, des inconvénients, des limites et des contraintes à considérer dans l'élaboration du schéma expérimental. Il existe souvent plusieurs techniques susceptibles de

répondre à la même question, mais leurs caractéristiques conduisent parfois à des résultats non nécessairement superposables (*e.g.* valeurs absolues différentes, linéarisation d'épitopes conformationnels, spécificité et classe des anticorps...).

Préalablement à toute analyse, il est fondamental de prendre en compte les contraintes dites **pré-analytiques**. Elles concernent d'une part l'échantillon lui-même et, d'autre part, les aspects techniques.

- Pour les **produits biologiques**, il faut préciser :
  - les conditions et le type de prélèvements (choix judicieux de la nature, de la quantité ou du volume d'échantillon, ainsi que de sa représentativité par rapport à la question investiguée);
  - le conditionnement (*e.g.* matériel de recueil, identification);
  - le transport;
  - la préparation des échantillons (*e.g.* inhibiteurs enzymatiques, centrifugation, isolement moléculaire, aliquotage, préparations cellulaires, fixation, inclusion) et leur conservation éventuelle (*e.g.* congélation, lyophilisation, biothèques).
- D'un point de vue **technique**, en sus de la disponibilité du matériel et des réactifs, d'autres éléments sont à considérer :
  - la spécificité des réactifs utilisés (*e.g.* réactions croisées), leur concentration, leur volume, leur quantité;
  - les contrôles positifs et négatifs pertinents;
  - l'utilisation éventuelle de standards (s'ils existent);
  - le nombre de répliquats si nécessaire;
  - l'anticipation des différentes étapes à réaliser et leur durée.

La rédaction détaillée des protocoles (procédures opératoires) est d'une grande utilité dans la préparation des expérimentations. Le **poids financier** de tous ces points, ainsi que les **obligations réglementaires** éventuelles (*e.g.* expérimentation animale, consentements en biologie humaine, manipulation de radio-isotopes) doivent aussi être pris en compte.

Pour la **partie analytique**, il est important de bien maîtriser les conditions d'acquisition des résultats dans leurs aspects biologiques et maté-

riels. Les contraintes des réactions immunologiques s'exercent dans tous les domaines. Ainsi, les réactions antigène-anticorps sur support solide (*e.g.* western-blot, ELISA) doivent comporter une étape de saturation afin d'éviter toute fixation non spécifique. La contrainte en biologie moléculaire (ADN, ARN) est de respecter les conditions de température pour les hybridations, un circuit rigoureux des différentes étapes de préparation, d'amplification et d'analyse des amplicons. En biologie cellulaire, les conditions optimales de culture des cellules imposent toujours une atmosphère contrôlée, des conditions de stérilité maîtrisées et parfois l'utilisation de facteurs de croissance spécifiques. Les concentrations cellulaires et les supports sur lesquels sont cultivées les cellules peuvent avoir un impact sur les résultats de l'expérimentation. Enfin, si la réglementation en vigueur concernant l'expérimentation animale exige de respecter les conditions de stabulation et de manipulation, il est important de considérer la dynamique des réponses induites *in vivo*. Par ailleurs concernant les aspects matériels, il faut prendre en compte les contraintes liées aux détecteurs des instruments (seuils de sensibilité, capacité maximale d'absorption, interférences des émissions lumineuses). Par exemple, l'utilisation d'un spectrophotomètre impose d'une part le choix de filtres appropriés (maximum d'absorbance de l'analyte) et, d'autre part, le respect de la zone de linéarité de la mesure de l'absorbance. De même, le réglage des contraintes électriques et électroniques des photomultiplicateurs des cytomètres en flux doit être adapté aux marquages envisagés et tenir compte de l'autofluorescence des cellules examinées.

Pendant la phase d'**exploitation des résultats** (post-analytique), interviennent tout d'abord le mode d'expression et de représentation des données prenant notamment en compte le bruit de fond (ou *background*), puis la validation des points de contrôle (contrôles positifs et négatifs, s'ils existent), le positionnement par rapport aux

valeurs de référence ou « normales » et l'interprétation des variations et différences observées dans le contexte expérimental ou clinique (notion de réponse individuelle, distribution des valeurs biologiques, définition des seuils avec les significations statistiques). L'élaboration du plan statistique (*e.g.* calcul d'effectifs, tests de comparaison, analyses de performance, significativité des résultats) appliqué à ce stade fait partie de l'étape initiale de préparation de l'expérimentation et les données nécessaires à sa mise en œuvre doivent être validées.

L'utilisation des outils offerts par les acteurs du système immunitaire est donc très vaste mais il faut savoir que ces réponses subissent des contraintes physico-chimiques propres. Ainsi dans la réaction antigène-anticorps, les liaisons non covalentes qui s'établissent dépendent des concentrations respectives des antigènes et des anticorps selon la loi d'action de masse et la portion linéaire d'une courbe d'étalonnage s'inscrit dans une sigmoïde. De même, les réponses cellulaires se déroulent au sein du réseau complexe d'interactions évoquées plus haut et sont éminemment dépendantes des conditions expérimentales (*e.g.* dose des ligands, cinétique de la réponse, particularités individuelles moléculaires ou cellulaires). Une bonne connaissance de ces spécificités immunologiques, des inconvénients, des limites et des contraintes technologiques amène cependant à poursuivre l'amélioration de ces technologies aux applications innombrables.

La réaction antigène-anticorps peut s'objectiver dans de nombreuses applications techniques, elle peut aussi se développer sur les supports des nanotechnologies. L'immunité innée est investiguée par les activités des cellules NK ou des phagocytes (phagocytose, activité des Nox). Chaque population lymphocytaire peut être analysée pour ses caractéristiques immunophénotypiques ou fonctionnelles : lymphocyte T (production de cytokines, cytotoxicité), lymphocyte B (production de cytokines ou d'anticorps).

# Chapitre 1

## L'antigène comme réactif : définition et propriétés

Le terme d'antigène désigne une espèce moléculaire biologique ou synthétique reconnue par un récepteur spécifique du système immunitaire (*e.g.* immunoglobulines, récepteurs des lymphocytes B ou T). L'antigénicité désigne la capacité de la molécule à être reconnue spécifiquement par un récepteur. L'immunogénicité traduit la capacité d'un antigène à induire une réponse immunitaire. Un antigène peut être tolérogène lorsque sa reconnaissance n'induit pas de réponse immunitaire.

### Caractéristiques des antigènes

---

Leur définition sous-entend une interaction spécifique avec le système immunitaire adaptatif et plusieurs critères permettent de caractériser les antigènes.

Les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes B (BCR) peuvent reconnaître des molécules natives, en solution ou particulaires. La plupart des antigènes induisent une réponse lymphocytaire B faisant appel aux lymphocytes T auxiliaires (ou *helper*) et sont appelés antigènes thymo-dépendants. Certaines structures répétitives peuvent induire des réponses lymphocytaires B sans l'intervention (*help*) des lymphocytes T et sont appelées antigènes thymo-indépendants (*e.g.* antigènes polysidiques).

Les récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) reconnaissent des fragments d'antigènes,

le plus souvent des antigènes peptidiques, associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou *human leucocyte antigens* (HLA) chez l'homme.

Un épitope correspond à la structure minimale d'un antigène reconnue par une partie limitée pour le récepteur de l'antigène, appelée paratope. Un antigène peut être constitué d'une mosaïque d'épitopes. La structure d'un épitope dans l'espace (ou structure stéréochimique) peut être séquentielle (ou linéaire) ou conformationnelle (structures secondaire, tertiaire ou quaternaire). Des modifications post-traductionnelles (*e.g.* glycosylation, phosphorylation, méthylation) peuvent changer la structure des épitopes. La structure native d'une protéine est généralement conformationnelle et comprend des modifications post-traductionnelles.

Un antigène mimétique possède un épitope stéréochimique (mimotope) dont la structure peut être proche de ou identique à celle d'un autre épitope porté par une molécule différente. Ce type d'antigènes peut être à l'origine de réactions croisées.

### Nature chimique, origine et localisation des antigènes

---

Les antigènes peuvent être des protéines, des polysaccharides, des lipides, des acides nucléiques, des métaux, des molécules de synthèse ou des molécules complexes (*e.g.* glycolipides, glycoprotéines).

Selon leur origine, on distingue les antigènes non immunogènes ou haptènes, les antigènes propres à une espèce différente ou xéno-antigènes, propres à des individus différents dans la même espèce ou allo-antigènes, propres à un individu donné ou auto-antigènes et les néo-antigènes, formés *de novo* par transformation de l'antigène original ou issus de la combinaison de plusieurs molécules. Les auto-antigènes peuvent être à l'origine de maladies auto-immunes lorsqu'ils sont associés à un signal de danger.

Les antigènes et épitopes cryptiques ont pour particularité d'être inaccessibles aux récepteurs spécifiques du système immunitaire parce qu'ils sont enfouis au sein d'une molécule, d'une cellule ou d'un tissu.

Les super-antigènes présentent une structure moléculaire créant une liaison non spécifique entre des TCR (en dehors des régions de reconnaissance ou CDR) et les molécules du CMH. Ils conduisent ainsi à une réponse immunitaire disproportionnée et secondairement à la mort des cellules qui sont entrées en contact avec cette molécule. Ce sont souvent des toxines produites par des agents pathogènes qui sont considérées comme des facteurs de virulence.

Les allergènes sont des antigènes de l'environnement qui ne déclenchent normalement pas de réaction inflammatoire, sauf chez des sujets allergiques ou atopiques où ils sont à l'origine de manifestations cliniques.

## Thermodynamique de la réaction antigène-anticorps

Les caractéristiques physiques des réactions antigène-anticorps sont très importantes à connaître pour le développement de techniques qui les utilisent car elles conditionnent de nombreux paramètres de l'expérimentation souhaitée.

Épitopes et paratopes engagent des interactions non covalentes, instables et réversibles, de type liaisons de van der Waals, liaisons hydrophiles/hydrophobes, liaisons électrostatiques et liaisons hydrogène. La somme de ces liaisons définit la force d'interaction entre l'antigène et son récepteur.

L'affinité de l'anticorps est évaluée par une constante d'affinité ( $K_a$ ) qui s'exprime en L/mol ( $L \cdot mol^{-1}$ ). Ainsi, un anticorps de faible affinité

possède une constante proche de  $10^{-4} L \cdot mol^{-1}$  et un anticorps de haute affinité, une  $K_a$  proche de  $10^{-12} L \cdot mol^{-1}$ . Une autre façon d'exprimer l'affinité d'un complexe épitope/paratope est de définir la concentration molaire permettant de saturer 50 % des récepteurs présents. On considère qu'une faible affinité est de l'ordre de  $10^{-4} mM$  et une forte affinité de l'ordre de  $10^{-9} mM$ . Cette affinité dépend de la complémentarité entre l'épitope et le paratope.

Les immunoglobulines portent au minimum deux paratopes semblables, capables de reconnaître les mêmes épitopes, si ceux-ci sont répétés au sein du même antigène ou présents sur deux antigènes proches. La valence antigénique correspond au nombre de molécules d'un épitope donné pouvant être reconnues simultanément par des anticorps qui lui sont spécifiques. L'accès des paratopes aux épitopes est par ailleurs contraint par la notion d'encombrement stérique. La valence antigénique est ainsi toujours inférieure ou égale au nombre d'épitopes.

L'avidité représente la résultante des différentes forces d'interaction engagées entre les anticorps et les épitopes. La force d'interaction globale d'un anticorps avec sa cible dépend alors du nombre de paratopes qu'il peut engager. Ainsi, une IgM, pentamérique, qui peut engager ses dix paratopes lors de l'interaction avec un antigène, a une force d'interaction (avidité) plus importante que celle d'une IgG qui ne peut engager que deux paratopes identiques.

## Qualité de l'antigène et interactions antigène-récepteur

Une modification infime de l'épitope peut avoir des conséquences majeures sur la qualité des récepteurs engagés, avec des retentissements parfois importants sur la qualité de la réponse immunitaire qui en découle. Dans le cas des épitopes peptidiques, on peut ainsi définir des motifs :

- **agonistes**, qui présentent une structure proche ou dans lesquels le remplacement d'acides aminés n'affecte en rien la qualité de la reconnaissance par le récepteur et la réponse immunitaire qui en découle ;

- **agonistes partiels**, au sein desquels le remplacement d'acides aminés affecte la reconnaissance et surtout la quantité de signaux transduits par le récepteur. La réponse immunitaire peut être moins intense et/ou aboutir à un autre profil cytokinique (*e.g.* Th1 *versus* Th2);
- **super-agonistes**, si le remplacement d'acides aminés conduit à une réponse amplifiée comparativement à celle obtenue avec la molécule initiale;
- **antagonistes**, lorsque le remplacement d'acides aminés affecte la reconnaissance et conduit à la réponse inverse de celle obtenue avec la molécule initiale.

## Propriétés des antigènes influant sur les méthodes de dosage

L'ensemble des propriétés des antigènes peut avoir un impact dans différents domaines de leur utilisation pratique, que ce soit dans le cadre de la biologie médicale (*e.g.* dosages de protéines, d'anticorps), de la recherche (*e.g.* modèles expérimentaux), de la vaccination ou de l'utilisation de molécules biologiquement actives (*e.g.* immunothérapies). Le [tableau 1.1](#) collige les propriétés d'un antigène influençant ces différents domaines

**Tableau 1.1** Impacts des propriétés de l'antigène dans les réponses immunitaires et en immuno-analyse

Antigènes/propriétés	Implications pratiques	Conséquences en cas de non-respect de la propriété
<b>Épitopes B</b>		
<b>Natifs</b> Par opposition à dénaturés ou dégradés	<i>In vivo</i> , les antigènes ont conservé leur conformation structurale qui peut subir des modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitinylation...). Un antigène est donc natif s'il a conservé l'ensemble de ses propriétés, c'est-à-dire sa conformation et ses modifications	– Dans le cas où les modifications post-traductionnelles sont essentielles à la reconnaissance par le récepteur, produire un épitope recombinant non modifié chez un procaryote peut conduire à perturber la reconnaissance par les anticorps – La dénaturation ou la dégradation d'un antigène peut conduire à une perte de reconnaissance par les récepteurs spécifiques. La dénaturation peut aussi conduire à la formation de néo-antigènes
<b>Répétés</b> (multivalents) Par opposition à monovalents	Facilitent la formation de complexes immuns	Impact sur les méthodes de dosage biologique : – deux sites antigéniques sont nécessaires (au minimum) pour les tests ELISA de type sandwich. Pour les méthodes compétitives, un épitope monovalent peut être utilisé – la multivalence est indispensable pour les méthodes d'agglutination et de précipitation
<b>Épitopes T</b>		
Doivent être présentés par les molécules CMH de l'individu	– Vaccins – Évaluation de la réponse lymphocytaire T <i>in vitro</i>	Inefficacité d'un vaccin si l'épitope sélectionné n'est pas présenté par le CMH de la population vaccinée
<b>Épitopes B ou T</b>		
Spécificité Accessibilité Stabilité		Pour les immunodosages : – manque de spécificité → faux positifs – manque d'accessibilité → faux négatifs – manque de stabilité → faux négatifs
Réintroduction	Impact en vaccination : rappels	– Le tarissement de la source de présentation antigénique conduit à faire disparaître la réponse immunitaire – Perte de la protection vaccinale
Respect de la voie d'introduction	Impact en vaccination : vaccins systémiques ou muqueux	– Inefficacité – Les antigènes vaccinaux administrés par voie muqueuse doivent résister à la dégradation par les sucs digestifs, passer les barrières de la flore, du mucus et des épithéliums – Les propriétés des cellules présentatrices d'antigène peuvent orienter la réponse immunitaire vers la tolérance, plutôt que l'immunisation
Innocuité	Vaccins, biothérapies	Effets secondaires
Faciles à produire		Coût, performances, reproductibilité interlots

d'application. Différentes méthodes de dosage des anticorps sont décrites, en phase liquide ou en phase solide (sur un support). En phase solide, il faut s'assurer que l'épitope n'est pas masqué ou altéré par perte des structures conformation-

nelles. Le [tableau 1.2](#) illustre l'importance de la qualité des antigènes dans le choix de la technique à mettre en œuvre. Le [tableau 1.3](#) présente certaines conditions réactionnelles pouvant influencer l'interprétation des résultats.

**Tableau 1.2** Impact de la propriété des antigènes sur le choix des méthodes immunologiques

Technique		Propriétés des Ag	Remarques (avantages/contraintes)
Immunofluorescence indirecte (IFI)		– Natifs – <i>In situ</i>	– Les plus proches du vivant – Structures parfois complexes
Immunoprécipitation ou immunodiffusion		– Natifs – Solubles	– Les antigènes ont souvent conservé leurs propriétés originelles – Les antigènes insolubles ne peuvent être utilisés – La méthode de dosage est souvent <b>spécifique</b> (peu de faux positifs), mais aussi, souvent peu <b>sensible</b> (faux négatifs)
Immunodosages à réactifs marqués	Radio-Immuno-Assay (RIA)	– Natifs purifiés	Utilisation réglementée des radio-isotopes
	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) classique ou à traceurs fluorescents (FLISA, FIA, FPIA) ou phosphorescents (MPIA)	– Recombinants – Synthétiques (peptides)	– Faciles à mettre en œuvre, automatisables, économiques – Quantitatifs – Grandes gammes de mesure
	Fluorimétrie en flux (multiplex)		– Multiparamétrique – Interférences possibles

**Tableau 1.3** Influence des conditions réactionnelles sur la mise en œuvre d'un immunodosage

Contraintes	Exemples	Impact
Préservation de la structure stéréochimique	<p><b>L'épitope reconnu a-t-il :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– une structure linéaire (séquence peptidique) ?</li> <li>– une structure secondaire, tertiaire (repliements dans l'espace) ?</li> <li>– une structure quaternaire (formée de la combinaison de différentes molécules) ?</li> <li>– subi des modifications post-traductionnelles ?</li> </ul> <p><b>L'utilisation de méthodes de dosage en phase solide apporte des contraintes supplémentaires :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– conformation de l'antigène (<i>i.e.</i> perte de la conformation originelle au profit d'une autre)</li> <li>– « effet matrice » : l'environnement moléculaire est important afin que l'anticorps lui-même conserve sa conformation et, en conséquence, sa spécificité</li> </ul>	<p>La perte d'épitopes conformationnels altère la qualité de l'interaction antigène-anticorps</p> <p>Quand l'interaction antigène-anticorps fait appel à la reconnaissance d'un motif additionnel (modifications post-traductionnelles), l'utilisation d'antigènes recombinants (issus d'un procaryote) peut être une source de faux négatifs</p> <p>Importance de la force ionique et de la température</p> <p>Un dosage adapté dans un milieu biologique (sérum) ne l'est pas nécessairement dans un autre (urine ou LCR, <i>e.g.</i>)</p>
Spécificité de la réaction	<p><b>Pureté de l'antigène :</b></p> <p>Antigènes purifiés et recombinants (élimination de toutes les protéines du vecteur)</p> <p><b>Utilisation d'un agent de saturation</b></p> <p><b>Prélèvement adéquat :</b></p> <p>Sérum et non pas plasma hépariné par exemple</p> <p><b>Prise en compte des interférences :</b></p>	<p>Risque de faux positifs. Il faut connaître les substances interférentes</p> <p>L'objectif principal de l'agent de saturation est de limiter les faux positifs. Il ne faut pas qu'il soit lui-même une source d'interférences</p> <p>Interférences, imprécision</p> <p>Facteurs rhumatoïdes, cryoglobulines, anticorps hétérophiles, immunoglobulines monoclonales</p>

## Autres facteurs conditionnant l'interaction antigène-récepteur

La qualité de l'interaction d'un antigène avec son récepteur influence la réaction immunitaire, pouvant conduire à un ensemble de réponses aussi variées que la mort ou l'activation/différenciation cellulaire.

À la composante structurale des antigènes, qui pèse sur l'interaction fine avec le récepteur spécifique, s'ajoute donc une autre composante essentielle : les concentrations de l'antigène et de ses récepteurs spécifiques disponibles. Ces concentrations respectives conditionnent la qualité de la réaction immunitaire tant *in vivo* qu'*in vitro* ou, de façon plus ciblée, la capacité de certains immunodosages à révéler l'interaction antigène-récepteur. Pour déclencher une réaction de rejet immunitaire vis-à-vis d'un antigène, ce dernier doit se trouver à une concentration adéquate. En effet, les concentrations antigéniques faibles ou très fortes aboutissent généralement à l'absence de réponse immunitaire mesurable (c'est-à-dire à la tolérance, l'anergie, ou l'apoptose des cellules qui expriment un récepteur spécifique). Les variations rapides de concentrations antigéniques peuvent également conduire à la mise en place d'une réponse immunitaire de rejet. L'exposition chronique à l'antigène en l'absence de réponse inflammatoire locale induit, à l'inverse, une tolérance. Ces notions ont un impact en vaccinologie et peuvent conduire à l'utilisation d'adjuvants (*e.g.* sels d'aluminium) qui, outre la composante inflammatoire qu'ils génèrent, permettent de concentrer localement l'antigène vaccinal sur une durée suffisante pour conduire à la stimulation optimale du système immunitaire.

En fonction des concentrations en antigènes et en anticorps, des complexes immuns de taille variable peuvent se former. Un défaut d'élimination des complexes immuns peut conduire à leur dépôt dans les vaisseaux, les articulations ou le rein par exemple.

Les propriétés d'agglutination ou de précipitation des complexes immuns peuvent être mises à profit pour révéler la présence d'antigènes ou

d'anticorps et même en évaluer les concentrations dans les immunodosages. La formation de complexes immuns nécessite que les antigènes présentent au moins deux épitopes accessibles aux anticorps. Les anticorps de classe IgM, avec leurs dix sites d'interaction potentiels avec l'antigène, sont ainsi plus efficaces que les IgG (bivalentes) pour la formation de ces complexes.

La forme d'expression, soluble ou membranaire, de l'antigène pèse également sur les possibilités d'interaction des anticorps (et des BCR) avec leur antigène cible. En effet, les régions transmembranaires et intracytoplasmiques sont peu accessibles, mais leurs séquences d'acides aminés peuvent constituer des épitopes libérés lors de lyses cellulaires. La forme d'expression membranaire peut également adopter une structure tertiaire ou quaternaire, par association multimérique, qui disparaît dans la forme soluble du même antigène. Enfin, la forme membranaire d'un antigène peut générer un environnement optimal, lié à un effet de concentration, conduisant à la réticulation de récepteurs immunitaires spécifiques et favorisant la délivrance optimale de signaux d'activation.

Outre sa structure intrinsèque, qui peut se résumer à la séquence peptidique d'un antigène, d'autres éléments tels que les modifications post-traductionnelles, la concentration ou le site d'expression conditionnent la qualité de la reconnaissance de l'antigène par un récepteur spécifique, et par conséquent, la qualité de la réponse immunitaire.

## Particularités des allergènes

Les réactions d'hypersensibilité immédiate de type I sont caractérisées par la production d'IgE dirigées contre des antigènes de l'environnement ou allergènes. La mise en évidence d'IgE circulantes spécifiques d'un allergène repose sur la disponibilité de ce dernier. Depuis quelques années, des protéines purifiées de sources allergéniques naturelles ou recombinantes ont permis de définir le concept d'allergie moléculaire qui a amélioré le diagnostic des allergies. La composition des allergènes est cependant parfois très complexe (tableau 1.4). Les différentes sources allergéniques

**Tableau 1.4** Principales familles d'allergènes et leurs caractéristiques

Famille	Caractéristiques	Exemples
Protéines de transfert des lipides (LTP, pour <i>Lipid Transfer Proteins</i> )	– Stables à la cuisson et à la digestion – Réactions systémiques et « syndrome oral »	Ara h 9, Pru p 3 Cora h 8, Art v 3
Protéines de stockage	– Stables à la chaleur – Présentes dans les graines	Ara h 1, 2, 3, 6, 7 Gly m 5, 6
Protéines PR-10 (pour <i>Pathogenesis Related protein family 10</i> )	– Détruites par la chaleur – « Syndrome oral » – Homologues de Bet v 1	Bet v 1, Ara h 8 Gly m 4, Gly a 1 Pru p 1, Api g 1.01, Mal d 1
Profilines (protéines liant l'actine) de grande homologie	– Allergènes mineurs des plantes – Symptômes peu sévères la plupart du temps	Bet v 2, Pru p 4 Hev b 8, Phl p 12
Déterminants carbohydratés à forte réactivité croisée (CCD pour <i>Cross-Reactive Carbohydrate Determinants</i> )	– Symptômes peu sévères la plupart du temps	CCD ; MuxF3, Ana c 2
Protéines liant le calcium	– Présentes dans de nombreux pollens – Fortes réactions croisées	Bet v 4 Phl p 7
Sérum-albumines	– Présentes dans les liquides et solides biologiques (lait, œuf, viande...)	Fel d 2, Can f 3, Bos d 6, Sus PSA, Equ c 3
Parvalbumines	– Présentes dans les poissons – Stables à la cuisson	Cyp c 1 Gad c 1
Tropomyosines	– Protéines liant l'actine dans les muscles – Réactions croisées entre crustacés, nématodes, blattes et acariens	Pen a 1 Der p 10 Ani s 3
Lipocalines	– Protéines animales assez stables – Peu de réactions croisées entre espèces	Fel d 1, d 4 Can f 1, f 2, Mus m 1, Equ c 1

comprennent en effet de nombreux composants dont chaque épitope peut être à l'origine d'une réponse immunitaire. Plus encore, des protéines de structure similaire sont souvent présentes dans des

espèces animales ou végétales variées, donnant lieu à des réactions croisées. Enfin, la stabilité des allergènes, en particulier à la chaleur ou à la digestion, est à prendre en considération.

# Chapitre 2

## Les anticorps comme réactifs

Les anticorps sont devenus des outils indispensables dans les activités de recherche, de diagnostic et de thérapie. En plus de leur capacité à reconnaître très précisément une molécule, de s'y fixer avec une affinité variable et de façon réversible, les anticorps peuvent distinguer des différences subtiles entre les molécules d'antigène. Ces propriétés en font de remarquables réactifs d'utilisation aisée.

### Rappels sur les anticorps

Afin d'assurer la protection de l'organisme contre toute substance étrangère potentiellement dangereuse, le système immunitaire est composé d'un grand nombre de lymphocytes B. Chaque clone cellulaire B exprime à sa surface de multiples copies d'un unique récepteur pour l'antigène (BCR), qui est une glycoprotéine membranaire de la famille des immunoglobulines appelée anticorps, dont l'extrémité N-terminale ou paratope définit la spécificité antigénique. La diversité des récepteurs pour l'antigène est assurée par une extrême variabilité de la séquence en acides aminés de cette région de l'immunoglobuline.

Lorsqu'un antigène se fixe par complémentarité spatiale entre une région précise de celui-ci, appelée épitope ou déterminant antigénique, et le paratope de l'immunoglobuline membranaire d'un lymphocyte B donné, ce dernier est activé, se multiplie et se différencie en plasmocytes. Les antigènes étant souvent constitués d'une mosaïque d'épitopes, un même antigène peut être reconnu

par plusieurs clones de lymphocytes B, chacun exprimant à sa surface une immunoglobuline dont le paratope est complémentaire d'un épitope donné. L'ensemble des anticorps, sécrétés par les différents plasmocytes issus de l'activation des clones B ayant chacun fixé l'antigène par une région précise, est déversé dans la circulation sanguine pour rejoindre les antigènes restés libres, s'y fixer puis entraîner leur élimination de l'organisme. Ces anticorps sont dits polyclonaux et représentent une population hétérogène d'immunoglobulines, leur spécificité épitopique et leur affinité pour l'antigène étant différentes bien qu'elles soient toutes dirigées contre le même antigène. À l'inverse, les anticorps monoclonaux sont issus de l'activation d'un seul clone cellulaire B exprimant le même récepteur pour l'antigène et constituent une population homogène d'immunoglobulines dont la spécificité épitopique et l'affinité sont rigoureusement identiques.

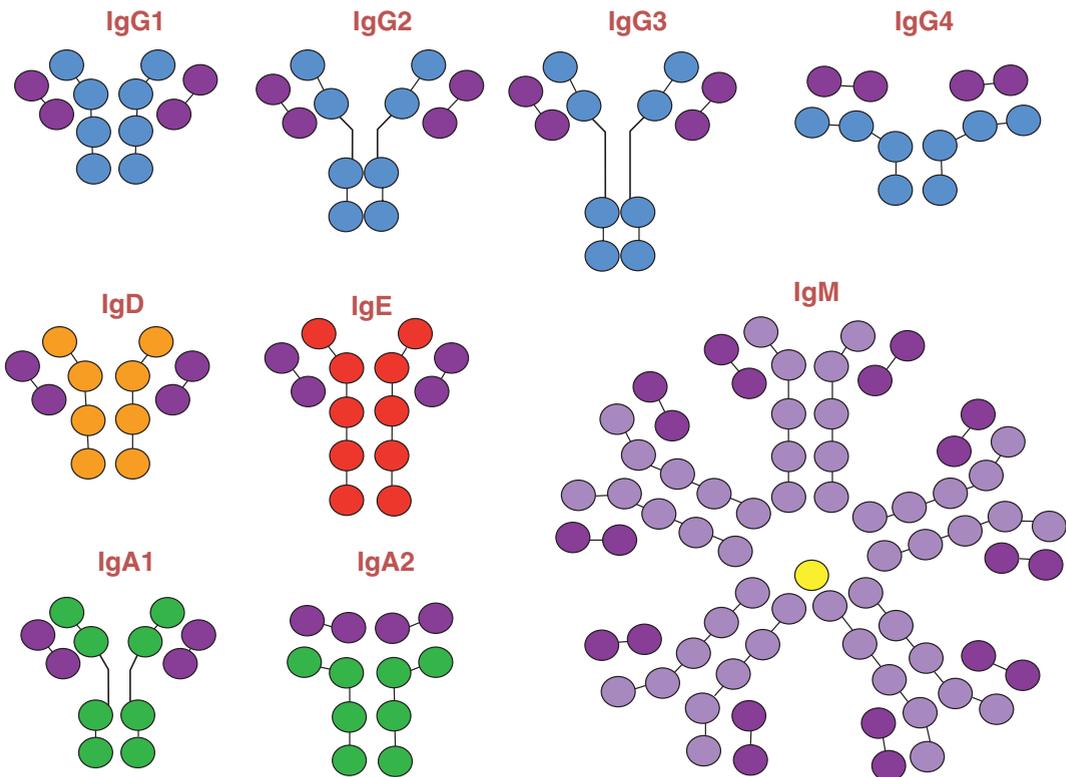
Afin d'assurer d'une part, la reconnaissance spécifique d'antigènes et d'autre part, leur élimination de l'organisme, les immunoglobulines ou anticorps possèdent une dualité fonctionnelle assurée par la structure particulière de ces molécules. En effet, ces glycoprotéines sont constituées d'une région variable (fragment Fab, *antibody binding*) en N-terminal portant le site de reconnaissance et de fixation de l'antigène et d'une région constante (fragment Fc, *crystallisable*) en C-terminal, portant les fonctions effectrices assurant l'élimination de l'antigène. Chaque monomère d'immunoglobuline est constitué de deux chaînes légères identiques associées de façon

covalente à deux chaînes lourdes identiques. Chacune de ces chaînes polypeptidiques comporte un domaine variable et un ou plusieurs domaines constants. La séquence peptidique des domaines constants des chaînes lourdes définit l'isotype de l'immunoglobuline. Chez les mammifères, il y a cinq classes d'immunoglobulines (Ig) : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Certaines classes sont divisées en sous-classes (*e.g.* IgG1 à IgG4) (fig. 2.1). Chacune de ces classes et sous-classes possède des propriétés différentes. Ces propriétés sont importantes à prendre en considération pour l'utilisation des anticorps en tant que réactifs; en effet, elles peuvent être avantageuses ou au contraire constituer des handicaps majeurs à leur utilisation.

Lors du premier contact avec un antigène, ce sont d'abord des IgM qui sont sécrétées par les plasmocytes issus de l'activation des lymphocytes

B spécifiques de cet antigène. D'autres isotypes sont ensuite produits par commutation de classe, conservant la spécificité de l'immunoglobuline. De plus, des hypermutations somatiques s'opèrent au niveau des gènes codant les parties variables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, qui améliorent l'affinité du paratope pour l'épitope de l'antigène. Ces mécanismes ont pour but d'adapter la réponse de l'organisme à la nature de l'antigène afin d'améliorer l'efficacité de la réponse immunitaire. De plus, des lymphocytes B mémoire persistent dans l'organisme et répondent plus efficacement à une seconde rencontre avec le même antigène. Cette maturation de la réponse humorale est particulièrement intéressante pour la production d'anticorps performants en tant que réactifs.

En résumé, la spécificité et l'affinité des anticorps pour leur antigène sont les deux propriétés



**Fig. 2.1 Structure comparative des classes et sous-classes d'immunoglobulines humaines.**

D'après Assim. *Immunologie fondamentale et immunopathologie*. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2013.

essentielles qui en font d'excellents outils pour leur utilisation en tant que réactifs *in vitro*. Ils peuvent ainsi contribuer à déceler toute une palette d'agents pathogènes ainsi que la présence de substances d'origine virologique, bactériologique, fongique ou parasitaire, de drogues et d'autres molécules inhabituelles ou anormales dans l'organisme. Leur simplicité d'utilisation ne se limite pas au diagnostic en santé humaine et animale. Ils sont également utilisés pour la purification, la détection et l'analyse de molécules et, depuis quelques années, comme outils thérapeutiques.

## Préparation d'anticorps polyclonaux

Les premiers types d'anticorps qui ont été produits en tant qu'outils sont les anticorps polyclonaux. La méthode la plus simple pour obtenir des anticorps spécifiques d'un antigène consiste à injecter cet antigène à un animal à plusieurs reprises, puis à recueillir le sérum contenant les anticorps après prélèvement sanguin. Les anticorps spécifiques de l'antigène présents dans cet immunosérum peuvent être ensuite purifiés en fonction de leur isotype et/ou de leur spécificité antigénique. De manière générale, les IgG étant les plus affines, elles représentent la classe d'anticorps la plus utilisée dans les méthodes de dosage immunologiques.

L'objectif est ici d'administrer l'antigène à l'animal sous une forme qui induit la réponse la plus forte et la plus appropriée en termes d'isotype, garantissant la production d'immunosérum fortement concentré en anticorps spécifiques.

La première décision concerne le choix de l'espèce animale. Si l'on souhaite produire de grandes quantités d'antisérum, il convient de retenir un animal de grande taille (cheval, âne, chèvre ou mouton). Cependant, ces espèces sont plus coûteuses à l'achat et à l'entretien et sont moins faciles à manipuler que des animaux de plus petite taille comme les rongeurs qui nécessitent des installations moins coûteuses. Cependant, le volume des prélèvements sanguins est plus limité chez ces derniers. Des

espèces de taille intermédiaire, comme le lapin, sont souvent employées. Il est également important de choisir une espèce animale qui soit phylogénétiquement la plus éloignée possible de la source de l'antigène avec lequel l'immunisation sera effectuée. En effet, un antigène est d'autant plus immunogène qu'il diffère de structures normalement présentes dans l'espèce à immuniser. Ainsi, pour préparer des anticorps contre l'albumine de souris, il est préférable d'immuniser une chèvre plutôt que des rats. Enfin, il faut également tenir compte des propriétés des chaînes lourdes recherchées qui diffèrent suivant les espèces, par exemple les IgG des rats sont plus faciles à purifier que celles des souris. Enfin, l'activation du complément, parfois recherchée dans les tests ultérieurs, varie en fonction de l'espèce ayant produit les anticorps.

La deuxième décision concerne la taille et le degré de pureté de l'antigène nécessaire. Ce choix dépend de l'utilisation future des anticorps. Les antigènes peuvent se présenter sous la forme de micro-organismes inactivés (*e.g.* bactéries, virus, levures) qui sont d'excellents immunogènes en raison de leur caractère particulaire. Il peut s'agir également de protéines en solution, lyophilisées ou encore intégrées dans un gel de polyacrylamide. Les protéines peuvent être artificiellement converties en antigènes particuliers en les couplant à des substrats solides comme des billes d'agarose. Les antigènes peuvent enfin se présenter sous forme de petites molécules ou haptènes (*e.g.* molécules chimiques, peptides, acides nucléiques). Ces derniers sont très peu immunogènes et il est nécessaire de les conjuguer à des molécules protéiques de grande taille comme la sérum-albumine bovine ou l'hémocyanine de limule pour induire la production d'anticorps. Ce couplage chimique est effectué à l'aide de réactifs bifonctionnels. Ce complexe, une fois injecté chez l'animal, induit la formation d'anticorps contre l'haptène et contre la protéine porteuse, qu'il faut ensuite purifier pour disposer d'un réactif spécifique de l'haptène. C'est de cette façon que sont obtenus des anticorps contre des hormones, des médicaments ou encore contre des peptides synthétiques ou issus de protéines. Ils permettent aussi la production d'anticorps spécifiques ayant

des applications directes dans des études fonctionnelles (*e.g.* neutralisation, agonistes). Toutefois, l'inconvénient majeur, parfois rencontré lors de la préparation de tels anticorps dirigés contre des épitopes linéaires, est leur incapacité à reconnaître la protéine sous forme native. La séquence et la longueur du peptide, la méthode de couplage et le choix de la protéine porteuse sont à prendre en considération pour la mise en place du schéma d'immunisation. Néanmoins, ceci reste une stratégie de choix pour des protéines difficiles à purifier ou à synthétiser.

L'immunisation peut se dérouler de plusieurs façons. La dose, la nature de l'antigène, l'utilisation d'adjuvants, la voie d'administration, le nombre d'injections et l'intervalle entre ces dernières sont autant de paramètres qui influencent la qualité de la réponse anticorps. Il n'existe pas de règle générale. Le protocole doit être testé empiriquement de manière à s'assurer que la réponse anticorps produite est de bonne qualité. La dose d'antigène à administrer pour induire une réponse anticorps de qualité dépend largement de la nature même de l'antigène et de l'espèce animale choisie. L'utilisation d'adjuvants retardant la libération de l'antigène qui est alors sous forme d'une émulsion huile-eau est nécessaire dans le cas d'antigènes solubles afin d'induire une forte réponse anticorps. Le plus connu est l'adjuvant incomplet de Freund, qui est une émulsion de la solution d'antigène dans de l'huile minérale. Son utilisation ralentit la libération de l'antigène et son élimination, tout en le concentrant au niveau du site de l'injection. L'adjuvant complet de Freund contient en plus des extraits de mycobactéries tuées. Celles-ci stimulent la réponse immunitaire innée en induisant une réponse inflammatoire locale au site de l'injection, qui stimule les cellules prenant en charge l'antigène. Cependant, l'injection de ce dernier est douloureuse et déconseillée par les comités d'éthique de protection des animaux. D'autres produits sont plus rarement employés comme des sels d'aluminium ou des squalènes. L'utilisation d'adjuvants est réservée aux voies d'injection intradermique, sous-cutanée et intramusculaire. Elle n'est pas nécessaire en cas d'antigènes particuliers comme les micro-organismes.

La voie sous-cutanée est la plus facile d'accès, quelle que soit l'espèce animale choisie. La voie intramusculaire permet une libération lente de l'antigène mais n'est pas adaptée aux petits animaux et est plus douloureuse. La voie intradermique est la plus immunogène mais limite le volume à injecter qui doit être faible. Elle n'est mise en pratique que chez les animaux de grande taille. Les injections par voie intraveineuse et intrapéritonéale ne sont employées que dans des cas particuliers. La voie intraveineuse permet, par une exposition rapide de l'antigène aux cellules immunocompétentes, d'induire une réponse rapide et forte en minimisant la quantité d'antigène à injecter. Toutefois elle demeure délicate et dangereuse car elle peut être à l'origine d'effets secondaires graves comme l'induction d'un choc anaphylactique. Elle ne peut pas être utilisée pour des antigènes particuliers. La voie intrapéritonéale est réservée aux petits animaux. Enfin, l'injection de l'antigène directement au sein des organes lymphoïdes est possible et minimise grandement la quantité d'antigène à injecter, mais requiert une grande expertise du manipulateur.

Plusieurs injections séparées d'environ 1 mois sont classiquement pratiquées. L'objectif de cette hyperimmunisation est d'induire la production d'anticorps de haute affinité et de l'isotype le plus approprié, IgG le plus fréquemment. L'affinité des anticorps conditionne la sensibilité des techniques immunologiques. Des prélèvements de sang sont réalisés avant chaque immunisation et environ 8 jours après. Il n'existe pas de méthode universelle pour analyser la production d'anticorps spécifiques. Toutefois, le test utilisé doit être facile à réaliser et d'interprétation aussi évidente que possible, il doit permettre d'évaluer la quantité (titration) et l'affinité des anticorps produits ainsi que leur spécificité. Les animaux ayant produit les meilleurs anticorps sont ensuite sélectionnés.

La ponction de sang en vue de la préparation des lots d'anticorps est généralement effectuée sous anesthésie locale, selon les recommandations des comités d'éthique d'expérimentation animale, de façon stérile à l'animalerie. Le sang est recueilli sans anticoagulant pour obtenir du sérum. Le volume

prélevé dépend du poids et des données hématologiques de l'animal. Le traitement du matériel se poursuit au laboratoire par centrifugation du sang coagulé. Les protéines sériques sont dosées et une électrophorèse permet de déterminer la masse d'immunoglobulines afin de la normaliser.

Le sérum recueilli contient de nombreuses protéines pouvant interférer dans les immuno-analyses prévues, notamment des immunoglobulines non spécifiques de l'antigène produites avant l'immunisation de l'animal. Il est donc très souvent nécessaire de purifier les anticorps polyclonaux. La stratégie choisie dépend de l'isotype ainsi que du degré de pureté désiré. Plusieurs techniques peuvent être utilisées. La première étape de purification consiste à séparer les immunoglobulines des autres protéines du sérum soit par précipitation par des sels d'ammonium ou de l'éthanol, soit par chromatographie d'affinité sur protéine A ou protéine G, ou bien encore par chromatographie échangeuse d'anions. La protéine A est un composant de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus* et la protéine G est une protéine de la paroi bactérienne des streptocoques du groupe B. Elles se lient toutes les deux à la région Fc des IgG. Toutefois, cette interaction varie selon les espèces, et même au sein d'une espèce en fonction de la sous-classe d'IgG. Les IgM sont généralement purifiées par une combinaison de techniques, du fait de leur taille et de leur point isoélectrique élevé, y compris précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une filtration sur gel, chromatographie échangeuse d'anions, électrophorèse de zone ou électrofocalisation.

Il est parfois nécessaire de purifier uniquement les immunoglobulines spécifiques de l'antigène, afin d'éliminer les interférences dues aux autres immunoglobulines. Ceci est réalisé soit par immunoprécipitation, soit par chromatographie d'immuno-affinité. La phase solide est alors constituée de l'antigène cible couplé à une résine. Le passage de l'immunsérum dans la colonne permet la liaison des anticorps et leur élution différentielle. Cette technique garantit la spécificité du réactif.

Cependant, même si les anticorps polyclonaux sont purifiés, ces réactifs restent hétérogènes, chaque anticorps étant dirigé contre un épitope donné de l'antigène, ce qui augmente les risques

de réaction croisée avec d'autres molécules présentes dans les échantillons à analyser. De plus, du fait de la variabilité de la réponse immunitaire de chaque individu, la qualité des sérums varie d'un lot à l'autre, ce qui nécessite des ajustements et des calibrations avant l'utilisation d'un nouveau lot.

## Préparation d'anticorps monoclonaux

En 1975, Georges Köhler et Cesar Milstein (prix Nobel 1984) ont mis au point une technique qui permet d'isoler *in vitro* des clones plasmocytaires produits à l'issue de l'hyperimmunisation d'un animal. L'avantage majeur de cette technique est de pouvoir caractériser précisément chacun des anticorps monoclonaux produits *in vitro*, pour ne conserver que ceux dont les propriétés (spécificité, affinité et isotype) sont les plus adaptées aux applications prévues. De plus, les anticorps monoclonaux retenus peuvent être produits de façon constante, en quantité indéfinie, reproductible et de façon illimitée dans le temps. Toutes les immunoglobulines issues du clone ont les mêmes caractéristiques physico-chimiques et biologiques, ce qui permet de standardiser les analyses. Les clones producteurs d'anticorps monoclonaux peuvent être cultivés *in vitro* et stockés sous forme congelée.

Le principe général repose sur la fusion d'un lymphocyte B ou d'un plasmocyte avec des cellules de myélome conférant à l'hybridome ainsi formé une capacité proliférative illimitée. Seules les cellules hybrides sécrétrices d'un anticorps spécifique de l'antigène sont sélectionnées, puis isolées les unes des autres afin de cultiver séparément chacun des clones producteurs d'un anticorps monoclonal. Une fois les propriétés de chaque anticorps monoclonal définies, seuls les hybridomes d'intérêt sont conservés en vue d'une production en masse. Cette technique d'obtention d'hybridomes se déroule en trois étapes sur environ 6 mois :

- immunisation ;
- fusion cellulaire ;
- sélection et séparation des clones.

Ces étapes sont suivies de la production des anticorps monoclonaux (fig. 2.2).

La **première étape**, l'immunisation, est sensiblement la même que celle décrite précédemment pour l'obtention d'anticorps polyclonaux, mais fait appel préférentiellement à des souris (BALB/c), voire des rats ou des lapins. En raison des facteurs génétiques individuels, plusieurs individus doivent être immunisés simultanément par injections répétées de l'antigène environ toutes les 3 semaines. La réponse anticorps est suivie tout au long de cette période. Lorsqu'un animal bon répondeur a été identifié, un dernier rappel est effectué par voie intraveineuse avant de le sacrifier 4 jours plus tard. Il s'agit ici d'induire l'activation de cellules B mémoire spécifiques de l'antigène à un stade qui permette leur fusion avec les cellules de myélome. Généralement, les cellules immunocompétentes sont extraites à par-

tir de la rate, mais parfois elles peuvent provenir de ganglions lymphatiques ou de plaques de Peyer. Ce choix dépend de la nature et de la dose de l'antigène utilisé pour les immunisations et de l'isotype recherché.

La **deuxième étape** consiste à fusionner en condition stérile les cellules immunocompétentes de l'animal avec des cellules de myélome généralement issues de la même espèce. La fusion cellulaire se fait à l'aide d'un agent chimique, le polyéthylène glycol (PEG), qui permet de fluidifier les membranes plasmiques des cellules. Lors de la reconstitution des membranes grâce à l'addition de milieu de culture riche en sérum de veau fœtal (SVF), les cellules en contact étroit peuvent fusionner pour former des hétérocaryons. Le rendement de fusion est faible, moins de 1 % des cellules fusionnent et une cellule sur cent cinq génère un hybride viable. Les lymphocytes n'ayant pas

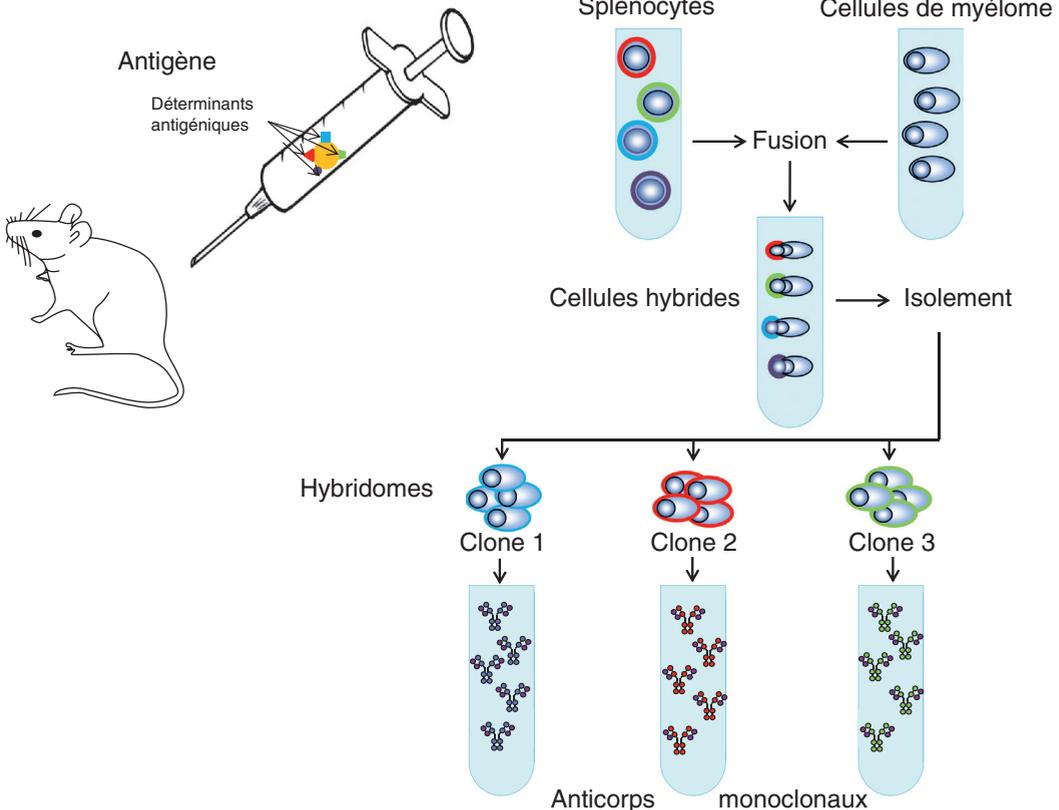
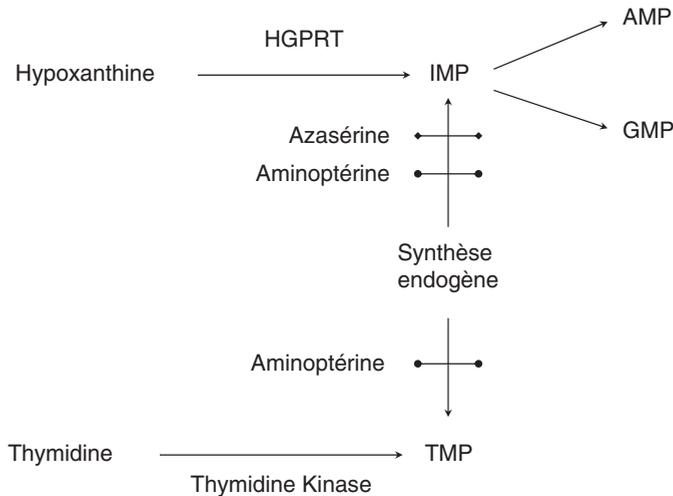


Fig. 2.2 Schéma récapitulatif de la production des anticorps monoclonaux.

fusionné avec une cellule de myélome meurent progressivement dans les jours qui suivent la fusion. Les cellules de myélome étant des cellules tumorales, il est par contre nécessaire d'éliminer celles qui n'ont pas fusionné avec des lymphocytes, afin de permettre aux hybridomes néoformés de se développer dans le milieu de culture. La caractéristique mise à profit est que la lignée de myélome utilisée est déficiente en hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase (HGPRT). Cette enzyme intervient dans la voie de sauvetage de la synthèse des bases nucléotidiques. Les cellules de myélome ne peuvent donc pas utiliser cette voie pour répliquer leur ADN, surtout si l'addition d'aminoptérine (A) dans le milieu de culture bloque la voie principale de synthèse des nucléotides. Dans ces conditions, les cellules de myélome qui n'expriment pas d'HGPRT fonctionnelle sont incapables de se diviser. Seules les cellules hybrides qui expriment une HGPRT fonctionnelle provenant du génome du lymphocyte peuvent alors se multiplier grâce à l'addition d'hypoxanthine (H) et de thymidine (T) dans le milieu

de culture, permettant ainsi la synthèse d'ADN par la voie de sauvetage. Après la fusion, l'ensemble des cellules est ainsi distribué dans des puits de plaques de culture à raison d'une cellule par puits au maximum (principe de la dilution limite) et cultivé en milieu sélectif HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine) (fig. 2.3). Les hybridomes néoformés, seuls capables de se multiplier, sont très instables génétiquement et seulement un sur cent cinq donne une cellule viable. Le milieu de culture sélectif est enrichi en facteurs de croissance apportés par le SVF (20 %), des cocktails de cytokines contenant notamment de l'IL-6 et/ou des macrophages ou des splénocytes de souris préalablement déposés dans les puits de culture (cellules *feeder*).

La **troisième étape** consiste à sélectionner, après 15 à 20 jours environ, les hybridomes dont le taux de croissance est optimal et qui sécrètent un anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt. Lorsque les cellules arrivent à confluence, le surnageant de chaque puits est analysé pour l'anticorps et ses propriétés. Les cellules sont ensuite



Milieu HAT : Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine

Milieu Haza : Hypoxanthine, azasérine

**Fig. 2.3 Caractéristiques du milieu nécessaire à la sélection des hybridomes pour la production d'anticorps monoclonaux.**

AMP : adénosine monophosphate; GMP : guanosine monophosphate; HGPRT : hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase IMP : inosine monophosphate.

sous-clonées par dilution limite, car elles peuvent être encore hétérogènes et génétiquement instables. Le but final est d'obtenir des populations d'hybridomes homogènes, stables génétiquement et fortes productrices d'anticorps. Généralement une série de trois clonages successifs est nécessaire à l'obtention de clones à fort taux de croissance et de sécrétion. Après 3 mois environ, les hybridomes obtenus pourront être soit conservés congelés dans l'azote liquide, soit cultivés en plus grands volumes afin de caractériser précisément les anticorps qu'ils sécrètent (spécificité, affinité, isotype). Il n'est pas rare de perdre beaucoup de clones à l'issue de cette troisième étape, soit par défaut de croissance, soit par défaut de production d'anticorps consécutifs aux réarrangements chromosomiques. C'est pourquoi le milieu doit être très riche en facteurs de croissance (20 % SVF). L'étape de sélection étant particulièrement longue et coûteuse, il convient d'adapter la stratégie à l'application attendue des anticorps monoclonaux à produire. Si, par exemple, il s'agit de produire des anticorps contre une petite molécule type haptène, le nombre de cellules à cloner pourra être réduit, car il est probable que peu de clones B différents seront produits à l'issue de l'immunisation de l'animal. De plus, il est possible de sélectionner très tôt seulement les cellules qui sécrètent un anticorps d'isotype particulier ou encore de contre-sélectionner certains anticorps présentant de fortes réactions croisées, donc peu spécifiques.

La **production des anticorps monoclonaux** dépend de la quantité désirée, de la capacité de culture du laboratoire et des bioréacteurs disponibles. La productivité cellulaire peut aller jusqu'à 4 g/L grâce à l'utilisation de lignées murines ou de hamster chinois (*Chinese hamster ovary*, CHO). À noter qu'il est possible d'obtenir par génie génétique des hybridomes interspèces (rat-souris, souris-rat, souris-homme) bien que ceux-ci soient plus instables génétiquement. Les hybridomes souris-homme sont particulièrement intéressants dans les applications thérapeutiques car ils entraînent peu de réactions immunes chez le receveur. Des stratégies d'ingénierie moléculaire ont été développées afin de cloner dans un vecteur d'expression les séquences

d'ADN codant pour les séquences de reconnaissance des antigènes, associées aux régions constantes d'une immunoglobuline humaine. Ce vecteur est ensuite introduit par transfection dans des cellules de mammifère. Les anticorps humanisés ainsi obtenus ont été développés pour leur usage maintenant largement répandu en thérapeutique humaine.

La purification des anticorps monoclonaux est plus facile que celle des anticorps polyclonaux, car le milieu de culture est beaucoup moins complexe que le sérum. Malgré tout, de nombreux efforts visent à augmenter les rendements de production et de purification des anticorps monoclonaux en travaillant sur la qualité des milieux de culture et des cellules productrices.

## Conservation des anticorps

La stabilité des anticorps polyclonaux purifiés est diminuée par rapport à ceux qui sont présents dans un immunosérum. Elle dépend largement de leur concentration (idéalement 5 à 10 mg/mL) et de leur méthode de purification et de conservation. L'exposition à des pH extrêmes et à des solutions de force ionique forte ou faible durant les étapes de purification tend à réduire leurs capacités d'interaction avec l'antigène et à favoriser leur agrégation et leur précipitation au cours du temps. La purification par chromatographie échangeuse d'anions est la méthode la moins dénaturante. Les agrégats sont à l'origine de réactions non spécifiques générant un bruit de fond lors des réactions immunologiques en raison de leur caractère hydrophobe. Il faut s'assurer de l'élimination de tels agrégats avant utilisation, par une centrifugation (1000 g, 20 minutes, 20 °C).

Les techniques de purification et de conservation des anticorps monoclonaux influencent également leur stabilité, ce qui peut conduire à des modifications de leur spécificité, de leur affinité ou encore être à l'origine d'une réactivité croisée. Les anticorps monoclonaux de souris de classes IgM, IgG2b et IgG3 sont à cet égard les plus sensibles.

Au-delà des recommandations du fournisseur, il est conseillé de vérifier régulièrement l'activité des

anticorps. Pour un archivage de longue durée, les solutions d'anticorps peuvent être congelées à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , préférentiellement en présence de 10 à 25 % de glycérol, sous forme d'aliquotes afin d'éviter de répéter des cycles de congélation-décongélation. Après décongélation, l'activité des anticorps doit être contrôlée de nouveau. Les solutions diluées doivent être conservées dans des récipients présentant de faibles capacités d'adsorption des protéines.

## Intérêts respectifs des anticorps polyclonaux et monoclonaux

Les anticorps polyclonaux sont constitués d'un mélange de plusieurs espèces d'anticorps différents dirigés contre plusieurs épitopes d'un même antigène. Une même molécule d'antigène peut fixer en même temps plusieurs anticorps différents, chacun sur son épitope respectif. Cette propriété confère aux anticorps polyclonaux une avidité beaucoup plus forte vis-à-vis de leur anti-

gène et une meilleure capacité de détection des protéines d'intérêt (tableau 2.1).

**Tableau 2.1** Intérêts respectifs des anticorps polyclonaux et monoclonaux

Propriétés	Anticorps polyclonaux	Anticorps monoclonaux
Affinité	+	++
Avidité	++	+
Réseau de complexes immuns	++	±
Temps de production	Long	Plus court
Quantité produite	Limitée	Illimitée mais dépend du volume de chaque lot
Homogénéité des lots	+	+++
Spécificité épitopique	+	+++
Réactions croisées	Possibles	Limitées
Détection de molécules faiblement exprimées	Améliorée par la variété des spécificités	Limitée par la monospécificité épitopique

# Chapitre 3

## Techniques sans traceur

### Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation et l'immunodiffusion sont deux méthodes qui mettent à profit la spécificité de la réaction antigène-anticorps pour analyser et/ou quantifier les complexes immuns. La mise en contact d'une solution de molécules d'antigène à épitopes multiples avec un antiserum polyclonal, spécifique de cet antigène et constitué d'une population hétérogène d'anticorps multivalents, aboutit à la formation d'un réseau tridimensionnel qui apparaît sous la forme d'un précipité.

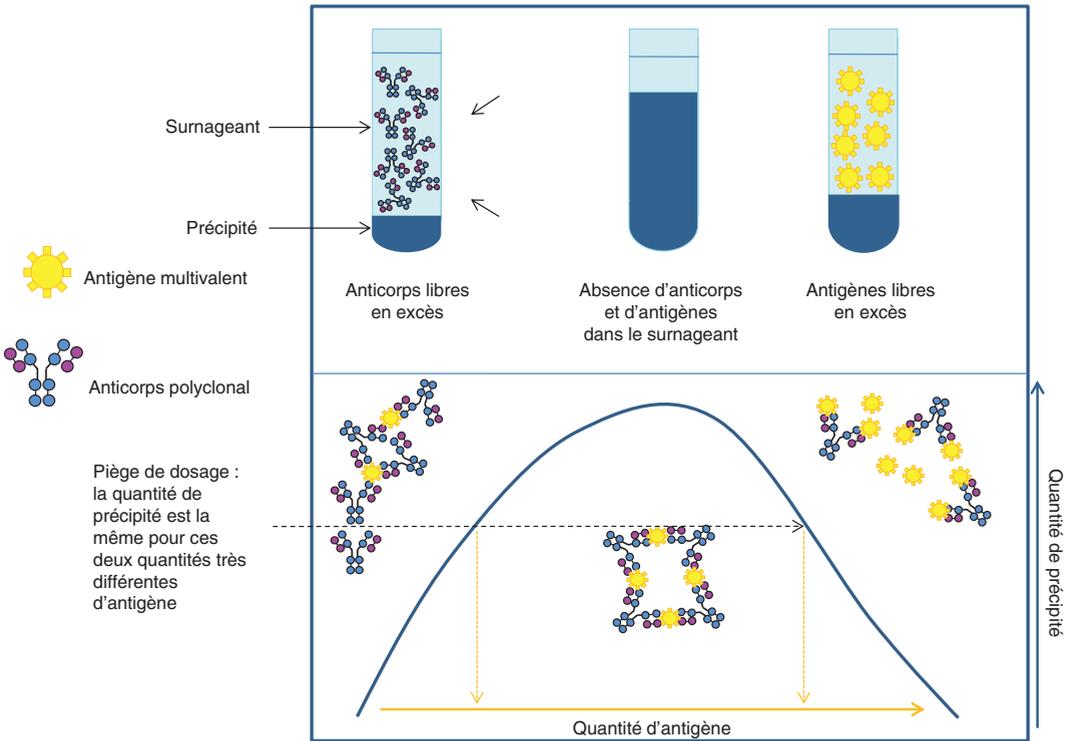
Initialement, le phénomène d'immunoprécipitation a été mis en évidence et caractérisé en milieu liquide, puis très rapidement les techniques d'immunodiffusion en milieu gélatiné se sont imposées, permettant la discrimination, l'identification ou la quantification de différents systèmes antigène-anticorps précipitants. L'apparition d'appareils capables de quantifier un précipité (turbidimètres et néphélomètres) a permis le développement de la précipitation en milieu liquide, avec des applications très développées dans le domaine du dosage des protéines (immunochimie).

### Méthodologie

En milieu liquide, si des quantités croissantes d'antigène sont ajoutées à une solution d'anticorps de concentration fixe, un précipité apparaît progressivement, dont l'importance varie avec le rapport antigène-anticorps. C'est l'expérience *princeps* du *ring test* d'Oudin, dans laquelle l'interface entre deux solutions superposées d'antigène et d'anti-

corps dans des tubes très fins présente un aspect d'anneau de précipitation, dont l'épaisseur augmente, atteint un maximum, puis diminue en fonction des concentrations relatives d'antigène et d'anticorps. Cette manipulation peut être réalisée dans des tubes à hémolyse en laissant la réaction se dérouler pendant une nuit puis en centrifugeant pour recueillir le précipité dans les culots de centrifugation. La concentration en protéines totales du culot varie également en fonction des concentrations relatives d'antigène et d'anticorps (fig. 3.1). Les faibles concentrations d'antigène correspondent à un large excès d'anticorps où toutes les molécules d'antigène sont recouvertes d'anticorps. Les complexes antigène-anticorps sont trop petits pour former un réseau et de nombreuses molécules d'anticorps restent libres dans le milieu. À l'inverse, l'ajout de grandes quantités d'antigène réalise les conditions d'un large excès d'antigène où trop peu de molécules d'anticorps sont présentes pour recouvrir les nombreuses molécules d'antigène. Les complexes antigène-anticorps sont là encore de petite taille et restent souvent solubles dans le milieu. C'est dans la configuration intermédiaire, appelée zone d'équivalence, que se forme un réseau important précipitant, complexant la quasi-totalité des molécules d'antigène et d'anticorps.

Deux principes optiques (fig. 3.2) d'appareillages automatisables, basés sur la déviation d'un faisceau monochromatique laser au contact des particules de précipité, ont été développés. La turbidimétrie évalue ainsi la diminution de la lumière transmise dans une solution contenant



**Fig. 3.1** Courbe de précipitation de Heidelberg.

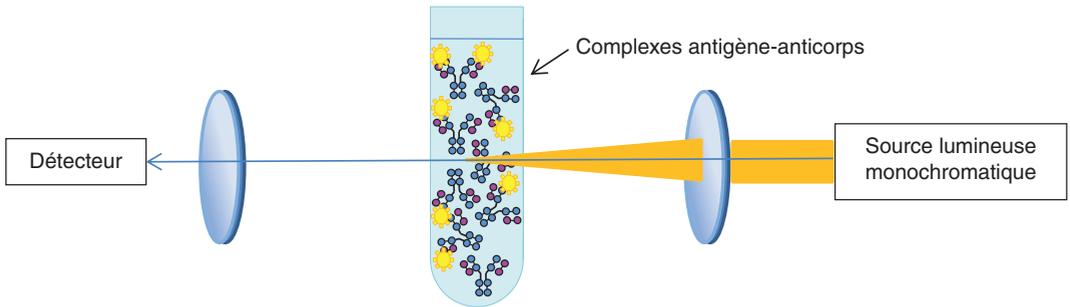
des complexes immuns insolubles. La néphélémétrie, par contre, mesure à côté du faisceau laser, avec un angle précis, la lumière dispersée par les complexes immuns insolubles, qui se comportent comme des particules. La dispersion de la lumière par des particules en suspension est fonction de leur taille. Les mesures se font dans la partie de la courbe en excès d'anticorps et quantifient, selon la loi de Rayleigh, la très forte amplification de la lumière dispersée vers l'avant aux petits angles lorsque le volume des particules augmente. Actuellement, des techniques cinétiques réalisées sur chaque échantillon permettent d'obtenir deux mesures très rapprochées pour évaluer la formation du précipité. Les techniques de néphélémétrie et turbidimétrie particulières, utilisant des particules de latex sensibilisées de très petit diamètre (entre 100 et 300 nm), permettent de se rapprocher de la sensibilité d'une technique avec marqueur (inférieure au mg/L). La première par-

tie de la réaction est une agglutination (*e.g.* l'anticorps fixé sur la particule capte l'antigène, entraînant la formation d'un agglutinat) et les agglutinats formés se comportent comme des particules de précipité.

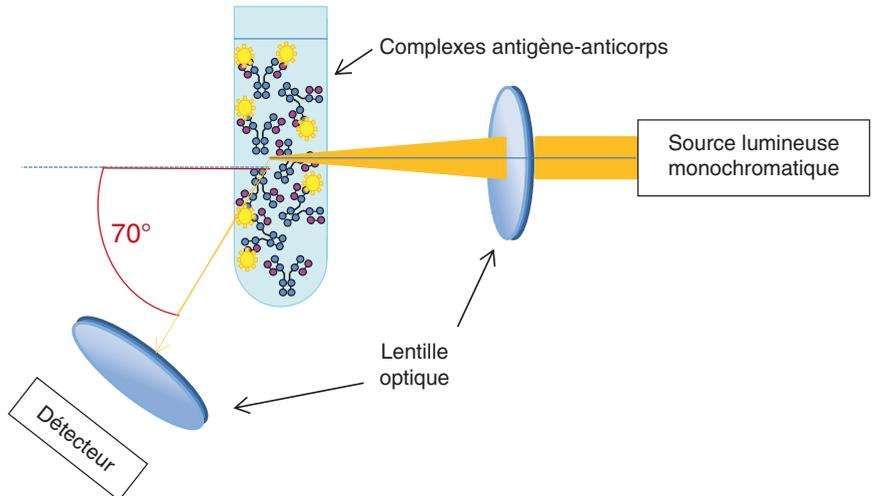
### Recommandations de mise en œuvre

Les échantillons à doser ainsi que les antisérums doivent être rigoureusement limpides. Les mesures se font dans la partie de la courbe en excès d'anticorps pour réaliser une proportionnalité entre la concentration d'immunocomplexes et la concentration d'antigène. Malgré cette précaution, le piège majeur est la redissolution des précipités en large excès d'antigène. Les automates déclenchent en principe des redilutions, en se basant sur les variations des résultats des mesures en cinétique. Toutefois, il faut parfois déclencher manuellement des dilutions supplémentaires.

**Turbidimétrie** : la mesure de lumière transmise produit un signal décroissant avec la concentration d'antigènes.



**Néphélométrie** : la mesure de la dispersion de la lumière produit un signal croissant avec la concentration d'antigènes.



**Fig. 3.2** Principes de la turbidimétrie et de la néphélométrie.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Spécificité de la réaction antigène-anticorps	Redissolution du précipité
Rapidité	Concentrations critiques des antigènes et des anticorps
Automatisation	Caractéristiques optiques des sérums
Nombreuses applications	Sensibilité modérée (mg/L)
Utilisation de systèmes non précipitants avec les techniques d'agglutination latex	

### Exemples d'applications

- En recherche : l'immunoprécipitation en milieu liquide est couramment utilisée pour l'étude de protéines. Les extraits protéiques à analyser (*e.g.*

milieu de culture, lysat cellulaire) sont incubés avec les anticorps. Cette étape permet la formation des complexes antigène-anticorps. Les complexes sont séparés par simple centrifugation, ou grâce à un anticorps anti-immunoglobulines ou une protéine liant le Fc des immunoglobulines, couplés à des billes.

- En clinique : la néphélométrie est utilisée en pratique courante pour le dosage des protéines sériques, dont les isotypes majeurs des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM et accessoirement IgD) et certains composants du complément (C3, C4, C1-inhibiteur et facteur B). Les techniques avec particules de latex per-

mettent le dosage des facteurs rhumatoïdes, de certaines sous-classes d'IgG et des chaînes légères libres.

## Immunodiffusion

### Méthodologie

Les méthodes de précipitation en milieu gélifié permettent soit l'analyse qualitative d'un mélange d'antigènes, soit le dosage immunochimique d'un antigène donné. Cela suppose de disposer d'une part d'antigènes au moins divalents, ce qui exclut les haptènes, et d'autre part d'anticorps précipitants, le plus souvent de nature polyclonale. Le milieu gélifié permet la visualisation du précipité antigène-anticorps. La densité du gel dicte la dimension des mailles du gel devant permettre la libre diffusion des molécules à analyser mais piéger le précipité.

### Recommandations de mise en œuvre

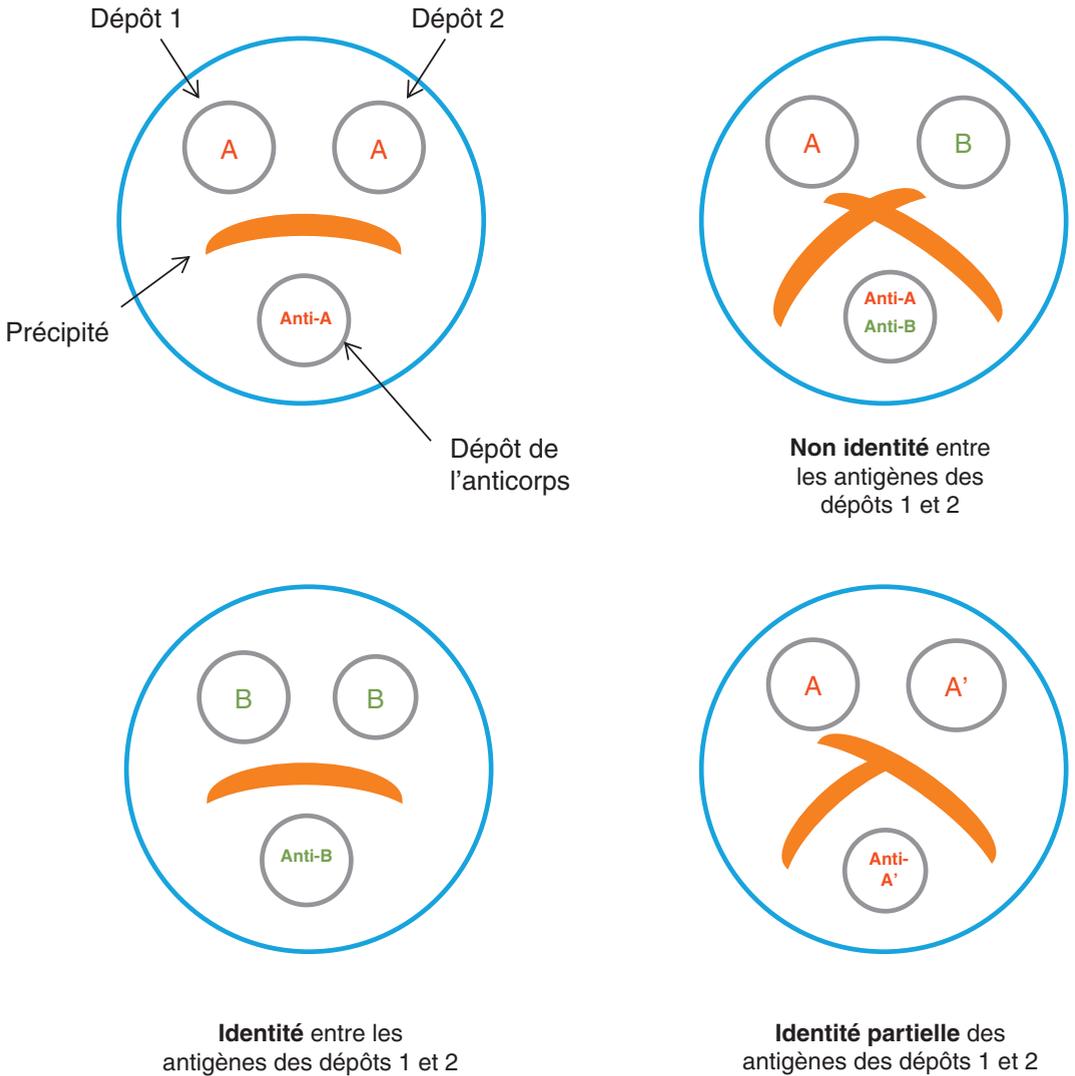
L'immunodiffusion double d'Ouchterlony est une analyse qualitative qui consiste à déposer des solutions d'antigène et d'anticorps dans des puits creusés en regard dans un gel d'agarose. Les molécules diffusent uniquement en fonction de leur masse moléculaire et il se forme des lignes de précipitation pour chaque système antigène-anticorps aux zones d'équivalence respectives. Cette méthode permet, en déposant plusieurs solutions antigéniques différentes en regard d'un antiserum monospécifique au sein d'une rosace de six puits périphériques disposés autour d'un puits central, d'analyser les identités entre les différents constituants. Lorsque deux antigènes identiques sont déposés dans des puits adjacents, ils sont reconnus par les mêmes anticorps de l'antiserum, et les arcs de précipitation sont continus, car il s'agit du même système antigène-anticorps : on parle d'identité. Au contraire, lorsque les deux antigènes sont différents, ils sont reconnus par deux groupes d'anticorps différents, et les deux arcs de précipitation se croisent. On parle de non-identité, liée à l'existence de deux systèmes antigène-anticorps totalement distincts. Enfin, si certains des épitopes

sont partagés entre les deux antigènes, il y a formation d'un éperon entre les deux arcs de précipitation, traduisant une identité partielle (fig. 3.3).

L'électrosynérèse, encore appelée contre-immuno-électrophorèse, est une variante de l'immunodiffusion double dans laquelle la migration de l'antigène vers l'anticorps est focalisée dans un champ électrique, dans un tampon de pH adapté. L'anticorps migre vers la cathode (pôle négatif) en raison du courant d'électro-endosmose, alors que le pH est choisi de telle sorte que l'antigène migre vers l'anode (pôle positif) : il rencontre donc l'anticorps et forme un arc de précipitation au niveau de la zone d'équivalence.

La technique d'immuno-électrophorèse a été mise au point par Grabar et Williams. Le premier temps consiste en une migration électrophorétique en gel d'agarose après dépôt de la solution à analyser dans un puits, permettant de séparer les protéines antigéniques en différentes fractions selon leur charge. À la fin de la migration, une rigole transversale est creusée dans la gélose et un antiserum  $\gamma$  est déposé. Ce deuxième temps immunologique consiste donc en une double diffusion dans un plan perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique. Aux zones d'équivalence respectives, il se forme autant d'arcs de précipitation qu'il y a de systèmes antigène-anticorps. L'immunofixation est une variante méthodologique qui a l'avantage d'être plus rapide, un peu plus sensible et en partie automatisable.

L'immunodiffusion radiale selon Mancini est une immunodiffusion simple bidimensionnelle quantitative. Un antigène soluble, déposé dans un puits, diffuse radialement au sein d'un gel contenant l'anticorps correspondant, qui doit donc être précipitant et le plus souvent de nature polyclonale. La réaction antigène-anticorps aboutit à la formation de complexes insolubles visualisés sous forme d'un cercle autour du puits où a été déposé l'antigène. Cette réaction est caractérisée pour chaque système par un rapport optimal entre les concentrations respectives d'antigène et d'anticorps donnant une précipitation maximale (zone d'équivalence). La surface de l'anneau de précipitation au point final de diffusion, donc le carré de son diamètre, est proportionnelle à la concentration en antigène. La réaction se fait dans des plaques dans lesquelles est



**Fig. 3.3** Technique d'Ouchterlony, immunodiffusion double.

Représentation schématique des arcs de précipitation obtenus en comparant deux dépôts d'antigènes identiques, différents ou partiellement identiques.

A : antigène A; A' : antigène A' partiellement identique à A mais plus complexe; Anti-A : anticorps anti-A; Anti-A' : anticorps anti-A'; B : antigène B; Anti-B : anticorps anti-B.

incorporé un étalonnage en trois points. Après diffusion totale (24 à 72 heures), les diamètres des anneaux de diffusion sont mesurés et une droite d'étalonnage est établie avec les valeurs de la gamme d'étalonnage (fig. 3.4).

L'électro-immunodiffusion selon Laurell est une méthode simple, rapide, reproductible et plus sensible que l'immunodiffusion radiale. C'est une immunodiffusion simple dans laquelle les échan-

tillons à doser sont placés dans des puits pratiqués dans un gel contenant l'antisérum spécifique, puis soumis à une migration accélérée par électrophorèse. À l'équivalence, les complexes antigène-anticorps précipitent sous forme de fusées (*rockets*) dont la hauteur est proportionnelle à la concentration d'antigène à doser et est calculée par rapport à une gamme d'étalonnage incorporée dans la plaque.

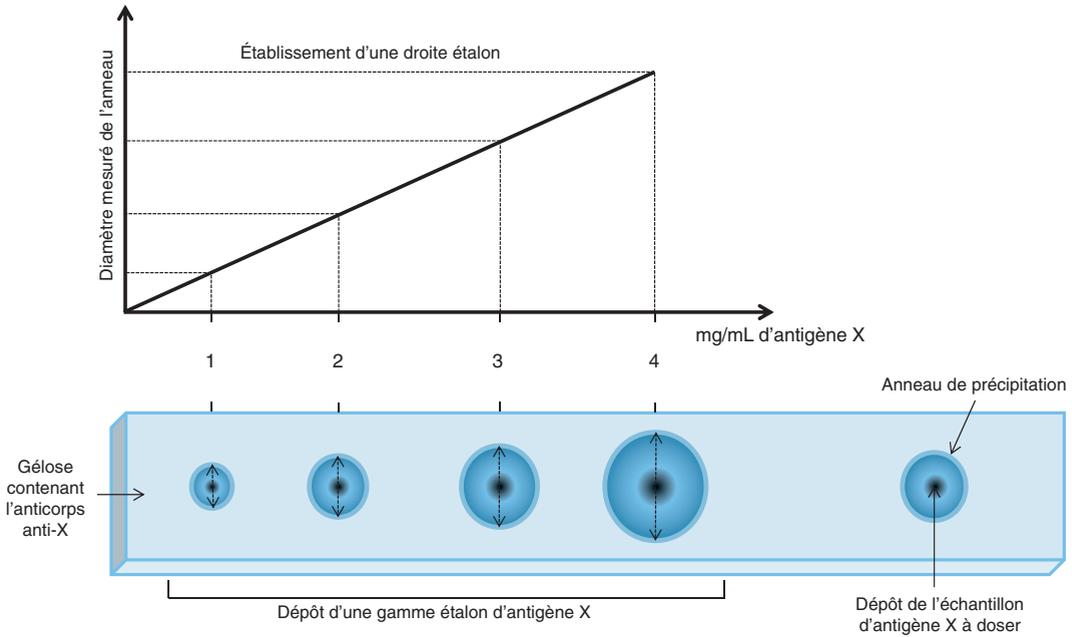


Fig. 3.4 Technique de Mancini, immunodiffusion radiale.

Avantages/inconvénients

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Immunodiffusion double d'Ouchterlony	Utilisation de mélanges d'antigènes en conformation native sans risque de perte d'épitopes conformationnels	Manque de sensibilité Technique longue (48 à 72 h)
Électrosynérèse	Plus sensible que l'Ouchterlony Rapide	Équipement spécifique
Immuno-électrophorèse	Identification précise de nombreux systèmes antigène-anticorps	Qualitative uniquement Longue Interprétation spécialisée
Immunodiffusion radiale de Mancini	Spécifique Quantitative Trousses commerciales	Longue Reproductibilité moyenne (coefficient de variation ou CV 10 %) Sensibilité moyenne (1-3 mg/L) Consommation importante d'antisérums
Électro-immunodiffusion de Laurell	Rapide Plus sensible que l'immunodiffusion radiale	Consommation importante d'antisérums

Exemples d'applications

- En recherche : ces techniques font partie historiquement des premières ayant permis d'explorer les systèmes antigène-anticorps. Elles sont moins utilisées actuellement mais peuvent être utiles pour vérifier la qualité des préparations antigéniques au cours des étapes de purification.
- En clinique :
  - l'immunodiffusion simple d'Ouchterlony et l'électrosynérèse ont été très utilisées pour analyser les spécificités de certains anticorps antinucléaires ;
  - l'immuno-électrophorèse permet de séparer les fractions antigéniques et de rechercher des anticorps dans les sérums de patients (identification d'anticorps anti-*aspergillus* ou anti-*candida*). Elle est également très utilisée pour l'étude des protéines sériques humaines ;
  - l'immunofixation est principalement utilisée pour caractériser les immunoglobulines monoclonales ou oligoclonales, dans le sérum, l'urine ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) ;
  - l'immunodiffusion radiale et l'électro-immunodiffusion sont utilisées pour le dosage de protéines.

## Immunochromatographie

La technique d'immunochromatographie consiste en la migration, sur un support, de nano- ou microparticules mises en contact avec des antigènes et/ou des anticorps. La première méthode développée par Singer et Plotz en 1956 est fondée sur un principe de chromatographie d'affinité de type ligand-récepteur correspondant à la réaction antigène-anticorps (*i.e.* immunochromatographie). Les complexes immuns sont immobilisés sur une membrane, d'où le nom d'immunochromatographie sur membrane (ICM). Cette méthode a donné lieu au développement de tests de diagnostic rapide (TDR) qui permettent la recherche de divers antigènes ou d'anticorps de type IgG et/ou IgM. Il s'agit de tests unitaires, rapides et qualitatifs. Ils peuvent être quantitatifs si la coloration de la bande obtenue est comparée à un étalon.

### Méthodologie

Dans les applications visant à la détection d'antigènes, le principe général consiste à mettre en contact une solution biologique et des billes portant à leur surface des anticorps spécifiques de la molécule recherchée. Ce mélange migre sur un support possédant à sa surface des anticorps spécifiques de la même molécule d'intérêt. Si la molécule cible est présente dans l'échantillon biologique de départ, elle est prise en sandwich au cours de la migration entre les deux anticorps et les billes s'immobilisent sur le support. Lorsque suffisamment de billes sont immobilisées, une coloration est détectable et indique la présence de la molécule d'intérêt. Deux types d'anticorps de capture sont déposés en deux points pour former une ligne de capture (fixation des complexes immuns sur les billes) et une ligne de contrôle (fixation des billes seules reconnues par un anticorps anti-immunoglobulines). Dans ce cas, un test positif se traduit par la formation de deux bandes de billes d'or (fig. 3.5a).

Une alternative à cette technique sandwich, pour la détection d'antigènes, est la méthode par compétition. Dans ce cas, les billes recouvertes d'anticorps ayant fixé l'antigène recherché ne

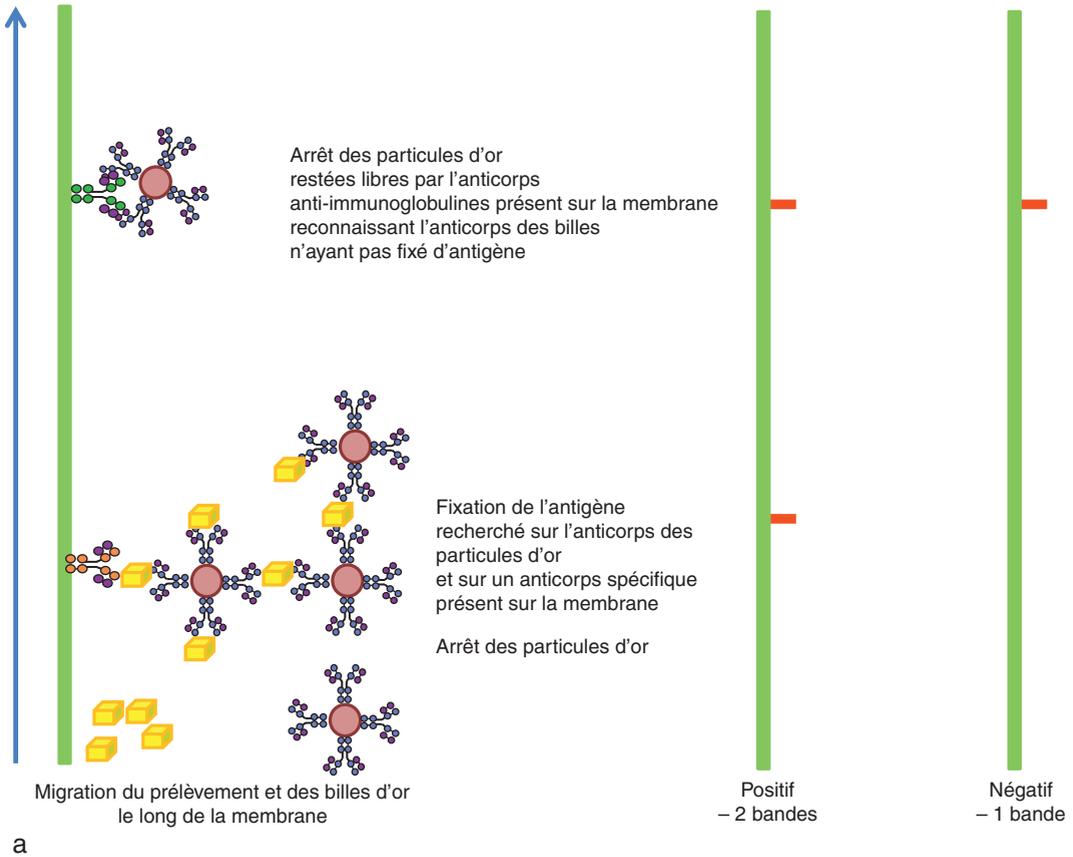
peuvent être arrêtées par de l'antigène préalablement fixé sur la membrane et sont seulement reconnues par des anticorps anti-immunoglobulines. Les billes n'ayant pas fixé l'antigène sont arrêtées par l'antigène de la membrane et par les anticorps anti-immunoglobulines. Dans ce cas, un test positif se traduit par la formation d'une seule bande de billes d'or (fig. 3.5b).

L'immunochromatographie peut être utilisée de la même façon pour rechercher des anticorps dans l'échantillon testé, avec des billes recouvertes d'antigène et des antigènes ou des anticorps anti-immunoglobulines sur la membrane.

Le système peut être vertical ou horizontal pour des immunochromatographies à migration verticale ou latérale.

De façon plus précise, le support sur lequel est fixée la membrane comporte à chaque extrémité du papier absorbant. L'échantillon dans lequel est recherché l'antigène ou l'anticorps est déposé dans un réservoir contenant les microparticules colorées (*e.g.* latex ou or colloïdal) recouvertes respectivement par un anticorps ou un antigène. Le contenu du réservoir est déversé sur la membrane et le papier absorbant placé à l'autre extrémité du dispositif active la migration du liquide contenant les billes, réalisant ainsi la chromatographie.

La fixation des anticorps de capture peut se faire par adsorption passive directe réalisée grâce à l'établissement de liaisons non covalentes de type hydrophobe et ionique entre la membrane et les résidus non polaires ou ioniques des protéines. Cette étape s'effectue classiquement en tampon alcalin de type *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) à pH 7,4 ou en tampon carbonate-bicarbonate à pH 9,6 afin d'ioniser les molécules en solution lors de cette étape. Des techniques alternatives de fixation par des liaisons covalentes ont été développées en modifiant le pH et la concentration en protéines (0,5 à 10 mg/mL), ou en utilisant des supports chimiquement activés. Après la fixation des anticorps au support, il est nécessaire de neutraliser les zones de la membrane restées libres. Il s'agit de l'étape de saturation qui permet d'éviter toute adsorption ultérieure de matériel présent dans l'échantillon testé. Elle s'effectue par incubation dans un tampon de type PBS additionné de



**Fig. 3.5** Immunochromatographie sur membrane.  
a. Selon un principe sandwich.

protéines comme de l'albumine bovine ou de la caséine.

La membrane de migration peut être de type Nylon ou nitrocellulose avec une porosité comprise entre 0,5 et 10  $\mu\text{m}$ .

Le réservoir peut être en fibre de verre ou en cellulose et doit être saturé par une solution de saccharose ou de protéines. Il est positionné sur un papier filtre formant ainsi un seul élément destiné à recevoir l'échantillon testé.

Le filtre est également en fibre de verre ou en cellulose et peut être élaboré pour jouer lors du dépôt du prélèvement un rôle de préfiltration de l'échantillon et de séparation du plasma.

L'or colloïdal est commercialisé sous forme de particules de 5 à 80 nm. La sensibilisation de l'or colloïdal par des anticorps monoclonaux est un réel avantage car le pHi (ou Pi pour point iso-

électrique) est connu et permet de déterminer précisément les conditions physico-chimiques de fixation sur les particules d'or. La sensibilisation peut également se faire par des anticorps polyclonaux au moyen de techniques d'adsorption ou de covalence en fonction du pH et de la concentration en protéines (0,1 à 5 mg/mL). La suspension d'or colloïdal sensibilisé par des anticorps doit être stabilisée par de l'albumine ou une solution de polyéthylène glycol (PEG). Les particules de latex sont une bonne alternative à l'utilisation d'or colloïdal du fait du choix qu'elles offrent en taille et en couleur. Ces particules dites de latex peuvent en fait être composées de polystyrène, de polyvinyltoluène, ou de copolymères (styrène-acrylate, styrène-butadiène ou styrène-divinylbenzène). Leur taille est comprise entre 0,02 et 3  $\mu\text{m}$  de diamètre.

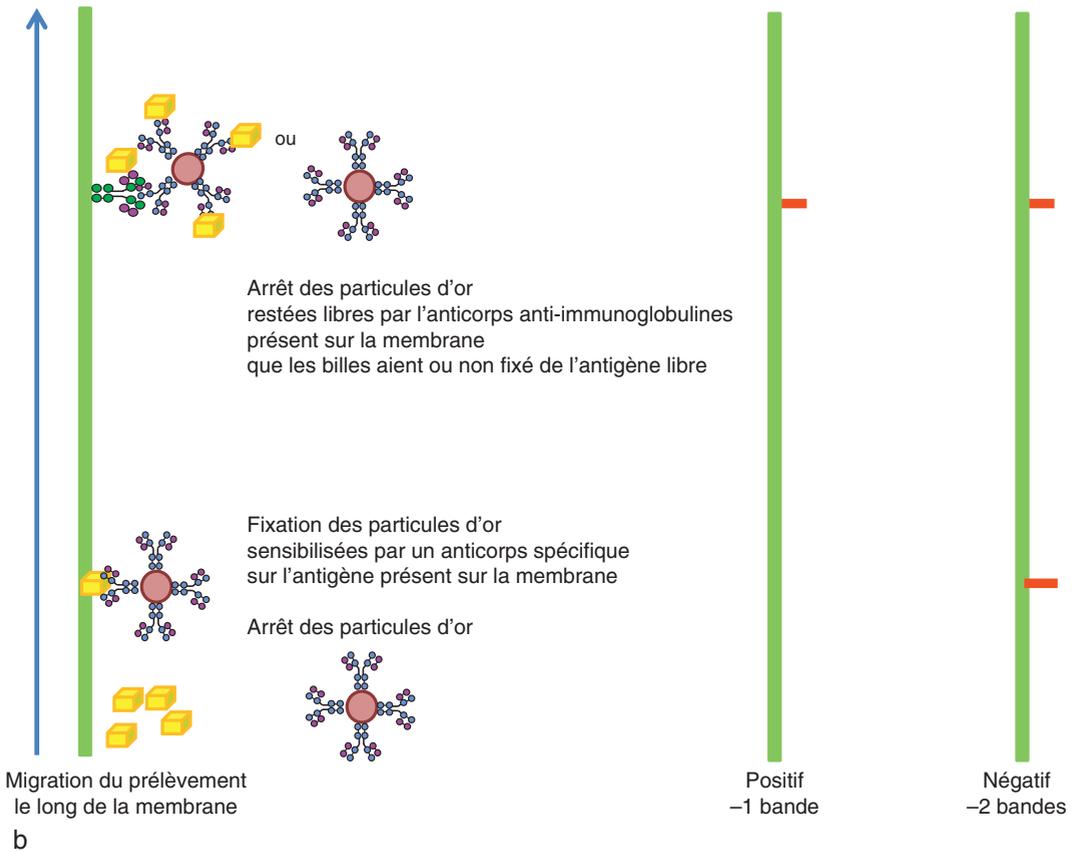


Fig 3.5 Suite.

b. Sur membrane par compétition.

Des nanoparticules de 0,02 à 0,05  $\mu\text{m}$  peuvent également être utilisées. La fixation des anticorps sur les particules de latex se fait comme pour l'or colloïdal par une technique d'adsorption, ou par la formation de liaisons covalentes en mettant à profit la présence de groupements chimiques ( $\text{COOH}$ ,  $\text{CH}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{ArNH}_2\dots$ ) sur les particules.

### Recommandations de mise en œuvre

Les immunochromatographies sur membranes sont des tests de diagnostic rapide unitaires, réalisables aussi bien en laboratoire, par le médecin (*doctor test*) ou par le patient lui-même (test de grossesse par exemple). Le résultat est très rapide (quelques minutes) et ne nécessite en général que très peu de techniques pré-analytiques.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Tests unitaires	Qualitatif ou au mieux semi-quantitatif
Facilité d'utilisation	Confirmation par un dosage ou une titration parfois nécessaire
Pré-analytique limité	Coût élevé
Résultat rapide	Tests unitaires (pas de grandes séries)
Bonne sensibilité	Précautions de mise en œuvre et d'interprétation
Bonne spécificité	

### Exemples d'applications

- En recherche : dans le domaine agro-alimentaire, les tests d'immunochromatographie sont utilisés couramment pour la recherche et la détection de *Listeria monocytogenes* dans les aliments ou de *Plasmopara halstedii* sur le tournesol.
- En clinique :
  - en pratique clinique, l'exemple le plus connu est le test de grossesse qui révèle la présence

- d'hormone chorionique gonadotrope (HCG) dans les urines ;
- ces tests sont également utilisés pour l'orientation diagnostique de maladies infectieuses comme la peste, la dengue, le paludisme, les infections à streptocoques ou la grippe (écouvillonnage nasal).

## Mesure d'affinité par résonance plasmonique de surface

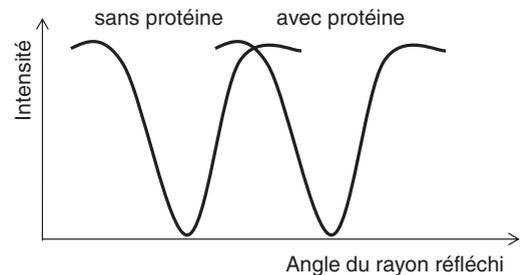
Le phénomène de résonance plasmonique de surface (*surface plasmonic resonance* ou SPR) se produit à la réflexion d'un rayon lumineux polarisé à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents (fig. 3.6). Une infime variation de l'indice de réfraction (changement de masse sur la surface) se traduit par un changement d'angle de réflexion totale de l'onde réfléchie. La technologie BIAcore® exploite la SPR pour objectiver la cinétique d'interaction analyte–ligand par la modification de l'angle de la lumière réfléchie sur la surface où se trouve fixé le ligand.

Dans le système BIAcore®, les milieux sont représentés par la solution dans laquelle se trouvent les analytes, d'une part, et une surface qui sert de senseur (cellule ou chip), d'autre part. L'interface est constituée d'un fin film d'or. La SPR modifie la lumière réfléchie à un angle spécifique. Cet angle varie avec l'indice de réfraction près de la surface du côté opposé à la lumière réfléchie, c'est-à-dire du côté de l'analyte (fig. 3.7). Dans le système BIAcore®, le ligand est

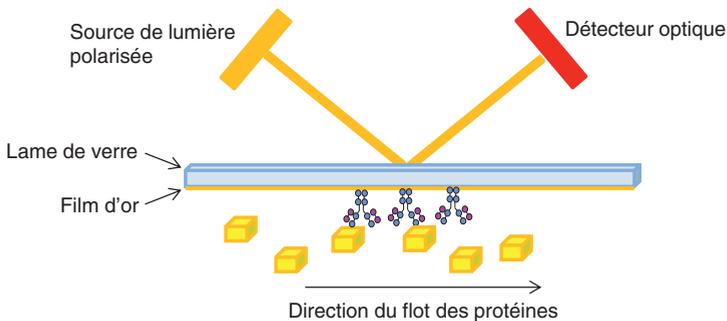
attaché à la feuille d'or et l'analyte est apporté par la microfluidique (flux continu). Si l'analyte interagit avec le ligand, la concentration locale moléculaire augmente dans la région immédiate du ligand, ce qui modifie l'indice de réfraction locale. Le changement d'indice de réfraction a pour effet de changer l'angle suite à la perte de l'énergie par résonance, ce qui est enregistré par le système. La cinétique de l'interaction dépend du nombre des interactions analyte–ligand (fig. 3.8). Une unité de résonance (RU) correspond à un changement de  $0,0001^\circ$  de l'angle donnant une intensité minimale de lumière réfléchie. Cette modification correspond à un changement de concentration de l'ordre de  $1 \text{ pg/mm}^2$  pour la plupart des protéines. Le BIAcore® constitue une technique sensible de mesure des interactions ligand–récepteur.

### Méthodologie

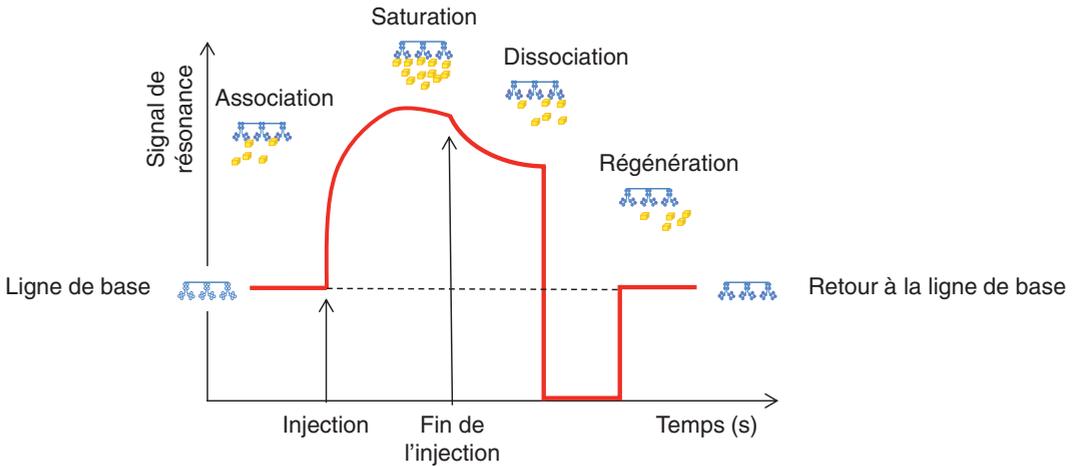
Les ligands sont fixés par liaison covalente sur une cellule (chip) selon leur nature : protéines, acides nucléiques, lipides, polysaccharides. Les analytes (récepteurs) en solution sont appliqués à



**Fig. 3.7** Modification de l'indice de réfraction par la fixation du ligand.



**Fig. 3.6** Représentation schématique du phénomène de SPR.



**Fig. 3.8** Cinétique de la réaction analyte–ligand au cours de la SPR.

concentration constante et dans un flot continu. Le suivi dans le temps de la variation de signal RU (sensorgramme) détermine les constantes cinétiques d'association et de dissociation avec, par le calcul qui s'ensuit, la valeur de paramètres thermodynamiques de l'interaction analyte–ligand : par exemple, constante d'affinité, concentration en molécules fonctionnelles ou stoechiométrie d'interaction.

### Recommandations de mise en œuvre

Il existe de nombreux supports adaptés aux ligands selon leur nature chimique sans que de grandes quantités soient nécessaires. Par contre, il faut disposer en quantité suffisante des molécules à injecter dans le flot continu.

De petites molécules peuvent se trouver sous le seuil de sensibilité de l'appareil. Il est recommandé d'immobiliser la plus petite molécule du couple analyte–ligand. La liaison entre un ligand immobilisé et des cellules ne permet pas encore une mesure fiable des valeurs des constantes d'association.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Pas de nécessité de marquer les molécules (ligand 1 comme ligand 2) Calculs de valeurs de $K_a$ (constante d'association)	Appareillage coûteux réservé à des plateformes mutualisées

### Exemples d'applications

La technique Biacore® s'applique à la caractérisation des interactions moléculaires impliquant les petites molécules et toutes les classes biologiques. Par l'injection séquentielle de plusieurs interactants, elle permet de faire une cartographie des domaines d'interaction et de définir la composition et le mécanisme d'assemblage de complexes.

Elle peut être appliquée à la caractérisation d'une réaction antigène–anticorps : mesure thermodynamique (affinité), évaluation de la spécificité. Plus généralement, elle permet la mesure des forces d'interaction entre deux protéines, par exemple liaison ligand–récepteur, évaluation de la transduction de signal (*e.g.* interaction entre peptides contenant une phosphotyrosine et domaines SH2, protéine G, cascade d'activation de phosphorylases).

Il n'y a pas d'application clinique de cette méthodologie qui trouve sa place en recherche dans les domaines de l'immunologie, de la biologie cellulaire, de la microbiologie. Elle est également utilisée par l'industrie alimentaire pour des analyses fines de la composition des aliments.

### Agglutination immunologique

Les réactions d'agglutination mettent en jeu le plus souvent un antigène présent à la surface d'une particule d'une taille comprise entre 0,1 et

10 microns (hématies, leucocytes, plaquettes, spermatozoïdes, micro-organismes, billes de latex ou de sépharose) et des anticorps qui en sont spécifiques. La suspension de particules, d'abord homogène, devient le siège d'agrégats visibles à l'œil nu ou au faible grossissement d'un microscope ordinaire (objectif  $\times 10$ ). C'est un phénomène d'association antigène-anticorps regroupant les particules en amas. La réaction peut être détournée en recouvrant des particules d'anticorps spécifiques d'antigènes plurivalents. L'utilisation de particules de très petite taille permet d'utiliser une lecture en turbidimétrie ou en néphélométrie. Ces techniques d'agglutination microparticulaire peuvent être extrêmement sensibles. Leur spécificité dépend des qualités respectives des anticorps et des antigènes mis en jeu.

### Méthodologie

L'interaction des particules entre elles fait intervenir deux forces antagonistes, la force de répulsion (provenant des charges électriques identiques des particules) et la tension interfaciale (agrégation des particules entre elles). Le potentiel Zeta représente la différence de potentiel entre le nuage ionique entourant la particule et le milieu ambiant et peut être représenté par l'équation :  $Z = f[\sigma, 1/D, 1/\sqrt{D \cdot \mu}]$ . Le potentiel Zeta est proportionnel à la charge  $\sigma$  de la surface des particules, inversement proportionnel à la constante diélectrique  $D$  du milieu, et à la racine carrée de la force ionique du milieu  $\mu$ . Le potentiel Zeta peut être positif (cationique) ou négatif (anionique). Les anticorps spécifiques d'un antigène particulaire modifient l'état électrique de cette particule en augmentant le potentiel Zeta, il y a alors agglutination.

Les paramètres de la réaction sont critiques selon que les anticorps sont directement agglutinants (*e.g.* IgM produisant une agglutination en tampon de force ionique 0,15 M) ou non agglutinants (incapables de produire une agglutination dans ces conditions). La nature des antigènes (nombre de sites antigéniques, localisation) et d'autres facteurs expérimentaux peuvent aussi influencer, tels que la température, le pH et la force ionique. Une température élevée entraîne une agitation moléculaire

importante et augmente la probabilité de rencontres intermoléculaires. L'agglutination est rapide à 37 °C mais la quantité d'anticorps agglutinés est plus importante à basse température (après 24 h), d'où la notion d'anticorps chauds et d'anticorps froids. Une modification du pH peut altérer la réaction d'agglutination, le pH optimum pour une réaction d'agglutination standard étant compris entre 6 et 8. L'effet de la force ionique peut être contrariant ou facilitant, tout comme le pH. En effet, elle peut favoriser la formation du réseau par diminution du potentiel Zeta.

Les différentes modalités consistent à développer une agglutination directe ou indirecte, active lorsque l'antigène est propre à la particule (*e.g.* groupe sanguin, bactérie) ou passive lorsque sont utilisées des particules inertes sur lesquelles l'antigène d'intérêt a été préalablement fixé. Les supports les plus utilisés sont les billes de latex et les hématies. Les billes de latex sont des sphères de diamètres, charges et couleurs différents. Elles ont l'avantage d'être biologiquement neutres et inertes. De plus, elles sont activables chimiquement, ce qui permet de réaliser un couplage ou la fixation de l'antigène à pH 8,2, bien que cette intervention ait un coût élevé. Les hématies de mouton permettent la fixation de l'antigène par simple contact, par traitement à l'acide tannique ou par un réticulant chimique (benzidine bis-diazotée, difluoro-dinitrobenzène, glutaraldéhyde, carbodiimide, benzoquinone). Les avantages des hématies sont leur universalité et leur taille, leurs propriétés rhéologiques idéales, leur stabilité en suspension, leur surface présentant des glycoprotéines avec des ancrages covalents et leur moindre coût. Les inconvénients sont leur instabilité dans le temps (hémolyse en 3 semaines) imposant une fixation par des aldéhydes (formol) et la mosaïque d'antigènes de surface pouvant générer des réactions parasites avec des anticorps différents de ceux recherchés (hémagglutinations non interprétables). Différentes étapes sont à réaliser pour préparer des particules sensibilisées. Il faut tout d'abord purifier l'antigène à fixer afin de limiter les réactions croisées. L'antigène est ensuite couplé, ce qui est une étape critique, par adsorption simple ou par couplage chimique. Enfin, il faut évaluer la quantité d'antigène fixée, la sensibilité, la spécificité et la stabilité des suspensions.

L'agglutination directe (fig. 3.9) résulte de l'association entre un anticorps agglutinant, d'isotype IgG ou IgM, et un antigène à la surface de la particule. Elle se développe en tube, en microplaque, sur lame ou sur une plaque cartonnée plastifiée. Elle peut être qualitative ou quantitative, si une titration est effectuée, le titre étant l'inverse de la dernière dilution de sérum à laquelle s'observe l'agglutination.

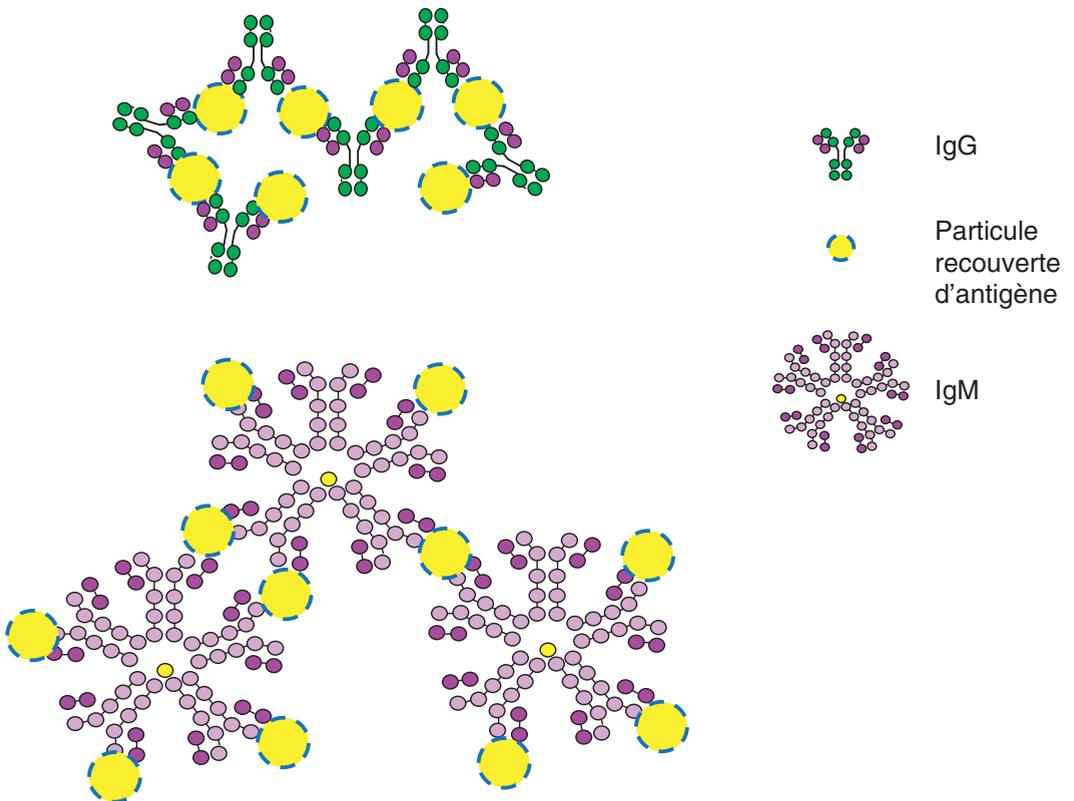
On peut faciliter l'agglutination entre un antigène particulaire et un anticorps non agglutinant en diminuant la charge électrique, en augmentant la constante diélectrique, ou en augmentant la force ionique du milieu. Ceci peut être obtenu en ajoutant des macromolécules (albumine bovine, dextran, Ficoll®) au milieu réactionnel, pour favoriser les liaisons des anticorps aux particules. Une autre solution est

de réaliser une protéolyse des glycoprotéines de la surface cellulaire (papaine, fucine, broméline, trypsine) pour réduire le potentiel Zeta, ce qui permet ainsi une meilleure accessibilité des antigènes en les démasquant.

L'agglutination indirecte consiste à réticuler des anticorps spécifiques non agglutinants fixés à la particule par l'intermédiaire d'un anticorps secondaire anti-immunoglobuline (on parle d'antiglobuline).

### Recommandations de mise en œuvre

La technique d'agglutination sur lame ou sur plaque se développe en mélangeant une goutte de sérum à une goutte de suspension de particules sensibilisées, par agitation circulaire (3 à 5 minutes). La réaction est lue par la formation d'agrégats à l'œil nu.



**Fig. 3.9** Exemple d'agglutination directe avec des anticorps agglutinants d'isotype IgG (en haut) ou IgM (en bas) reconnaissant un antigène (en bleu) présent à la surface des particules agglutinées.

Dans l'agglutination passive, cet antigène n'appartient pas à la particule (en jaune) et y a été fixé pour utiliser la particule comme support.

La technique d'hémagglutination se développe en tube ou sur des microplaques à fond rond dans lesquels sont placés le tampon de dilution, des globules rouges (sensibilisés ou témoins) et des dilutions du sérum à tester. La réaction est lue en observant le dépôt des hématies au fond des puits (fig. 3.10). Les contrôles de non-agglutination conduisent à une sédimentation en bouton des globules rouges. À l'inverse, un voile d'agglutination se forme lorsque la réaction est positive. L'ajout de mercapto-2-éthanol (ou  $\beta$ -mercapto-éthanol) permet de différencier les réponses IgM/IgG, en annulant l'agglutination réalisée par les pentamères d'IgM. Enfin, des colonnes retenant les agglutinats mais laissant passer les hématies non agglutinées sont utilisées dans l'application particulière des tests de Coombs.

### Avantages/inconvénients

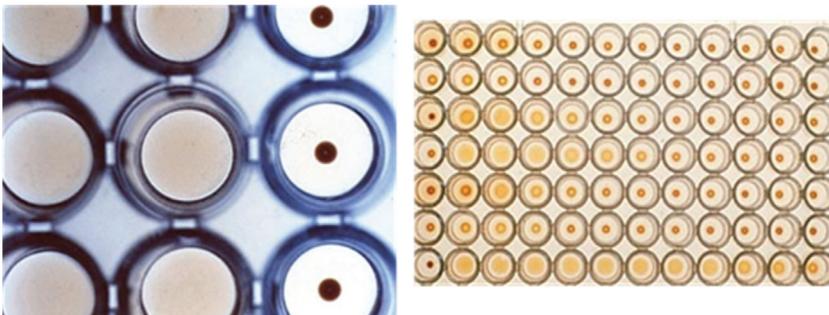
Avantages	Inconvénients
Prise en compte de l'isotype et de l'affinité de l'anticorps	Phénomènes de zone (excès d'anticorps ou d'antigènes) imposant une dilution des anticorps
Résultat qualitatif (négatif ou positif)	Pour l'hémagglutination, pas de dosage quantitatif, mais titrage par dilution (courbe dose-réponse avec référence)
Quantification de l'avidité sur le temps de réaction (agglutination en moins de 10 secondes à plus de 60 secondes)	Mauvaise conservation des hématies dans le temps (limite de 3 semaines, plusieurs mois si formolées et conservées à 4 °C)
Peu de matériel nécessaire	
Faible coût	
Tests unitaires ou grandes séries	
Rapidité	
Technique sensible et spécifique	
Dosages quantitatifs avec les techniques d'agglutination microparticulaire	
Différenciation de la réactivité IgG/IgM par le mercapto-2-éthanol	

### Exemples d'applications

- En recherche : cette technique peut être appliquée à de nombreuses combinaisons antigène anticorps.
- En clinique :
  - les groupes sanguins sont déterminés par agglutination active ou directe. Ce type de réactions est également appliqué aux sérogroupes bactériens (*e.g.* *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* entéropathogènes);
  - la recherche d'anticorps anti-hématies est réalisée dans le cadre des anémies hémolytiques par les tests de Coombs directs ou indirects;
  - l'agglutination passive est utilisée par exemple pour la recherche d'anticorps anti-toxoplasme dans un sérum après fixation d'un antigène soluble de toxoplasme sur des billes de latex;
  - la néphélémétrie microparticulaire est utilisée pour le dosage des facteurs rhumatoïdes.

### Mise à profit des capacités cytotoxiques du complément

Le complément est un ensemble de protéines solubles pouvant s'activer en cascade sous l'effet d'un déclencheur et aboutissant à la génération de fragments bifonctionnels (C3b, C4b, C5b) et du complexe d'attaque membranaire (CAM). Il intervient dans la réponse immunitaire innée pour la lyse directe de micro-organismes, pour la chimiotactisme et pour amplifier l'inflammation. Il contribue à la défense adaptative par coopéra-



**Fig. 3.10** Lecture et interprétation d'hémagglutination en plaque. Réaction positive : voile d'agglutination. Réaction négative : bouton ou point de sédimentation.

tion avec les anticorps pour la destruction de cellules étrangères. Les tests diagnostiques exploitent cette réponse.

## Méthodologie

Dans les tests utilisant le complément comme révélateur (fixation du complément), le but est de détecter et éventuellement de titrer des anticorps. Le sérum à tester doit d'abord être décomplémenté par incubation 30 minutes à 56 °C. Il est ensuite mis en présence de l'antigène microbien, le plus souvent sous forme soluble et de complément de cobaye. Si le sérum testé contient des anticorps, leur combinaison à l'antigène forme un complexe immunitaire qui active et consomme le complément. La révélation de cette réaction se fait de manière indirecte en ajoutant au test des hématies de mouton recouvertes d'anticorps anti-hématies de mouton (en conditions non hémagglutinantes). Si le complément n'a pas été consommé (absence d'anticorps spécifiques), les anticorps fixés sur les hématies l'activeront et une hémolyse sera observée. L'absence d'hémolyse signe donc un test positif.

L'activation du complément peut aussi être appliquée dans le typage HLA. Il s'agit de la technique sérologique en microplaque initialement décrite par Terasaki. Les lymphocytes à tester sont mis en contact avec des panels d'anticorps anti-HLA de spécificité connue, prédéposés dans les puits d'une plaque de microtitration. Après incubation, du sérum de lapin titré est ajouté comme source de complément. Les lymphocytes sont lysés dans les puits où les anticorps se sont fixés sur les antigènes HLA. Ceci est objectivé par la perméabilité à un colorant normalement exclu des cellules vivantes.

La cytotoxicité dépendante du complément (*Complement Dependent Cytotoxicity* ou CDC)

peut être mise à profit *in vivo* pour la destruction de cibles cellulaires. Ceci a été à l'origine du développement de nombreux anticorps monoclonaux thérapeutiques. Actuellement, la majorité des cibles antigéniques sont des récepteurs de surface cellulaire.

Enfin, l'hémolyse est largement utilisée en biologie clinique pour explorer la fonctionnalité de l'activation du complément.

## Recommandations de mise en œuvre

Comme mentionné précédemment, les sérums à tester doivent être décomplémentés afin de ne pas interférer avec le système de révélation. Par ailleurs, les sources animales de complément doivent être soigneusement titrées. Le tampon de faible force ionique (*i.e. Dextrose Gelatin Veronal Buffer* ou DGVB) doit être ajusté pour son contenu en calcium (2,5 mM) et en magnésium (0,5 mM).

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Faible coût <i>Screening</i> haut débit	Interférence des facteurs rhumatoïdes Possibles réactions croisées Faible sensibilité

## Exemples d'applications

La réaction de fixation du complément pour le dosage des anticorps sériques a longtemps été appliquée aux sérodiagnostics d'infections bactériennes, virales ou parasitaires. Elle est à l'heure actuelle de moins en moins utilisée du fait de ses difficultés de réalisation et sa faible sensibilité. Elle reste indispensable à certaines sérologies virales (*e.g.* anticorps anti-adénovirus, anti-orthomyxovirus, antiparamyxovirus) ou bactériennes (*e.g.* anticorps antimycoplasmes).

# Chapitre 4

## Techniques avec traceurs

### Types de traceurs

Dans la plupart des cas, les immuno-analyses utilisent un réactif (antigène ou anticorps) associé à un traceur détectable permettant de révéler la liaison antigène-anticorps spécifique. Les traceurs augmentent la sensibilité d'une immuno-analyse et permettent de déceler des quantités plus faibles de cible que les méthodes qui ne les utilisent pas. Trois grands types de traceurs sont utilisables, des enzymes, des fluorochromes et des radio-isotopes. Initialement, ce sont ces derniers qui ont permis la mise en évidence de réactions antigène-anticorps non décelables directement. Les contraintes liées à l'utilisation des radio-isotopes ont conduit à développer des méthodes immuno-enzymatiques et d'immuno-fluorescence qui ont progressivement supplanté les techniques radio-immunologiques.

### Les enzymes comme traceurs

L'utilisation d'enzymes comme traceurs a été introduite dans la seconde moitié du  $xx^e$  siècle pour offrir une alternative aux radio-isotopes. Pour être efficaces en tant que traceurs, les enzymes candidates doivent privilégier des contraintes michaeliennes avec un faible  $K_M$  pour leur substrat, catalyser des réactions irréversibles, être stables, résistantes aux interférences et faciles à conjuguer sans perte d'activité. L'activité enzymatique en présence d'un substrat adapté et d'un chromogène<sup>1</sup> génère un produit

coloré proportionnellement à la quantité d'enzymes et donc de la molécule à laquelle elle est conjuguée. La mesure est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre et le résultat est exprimé en unités arbitraires de densité optique (DO). En métabolisant plusieurs molécules de substrat, les enzymes amplifient le signal, permettant la détection de très faibles quantités de cibles. Le substrat et le chromogène non dégradés ne doivent pas perturber la lecture et le produit coloré doit être facilement détectable. De plus, il est préférable que l'enzyme, le substrat et le produit soient absents des préparations à analyser.

En raison de leur très grande spécificité, les anticorps sont souvent utilisés dans des réactions immuno-enzymatiques qualitatives ou quantitatives visant à détecter des antigènes. Le couplage du traceur sur les anticorps ne doit pas altérer leur immunoréactivité ni la capacité du traceur à générer un signal.

Dans les techniques immuno-enzymatiques en phase liquide, le produit coloré doit demeurer soluble et rester détectable par spectrophotométrie ou chimioluminescence. Dans les techniques en phase solide (*e.g.* membranes synthétiques, cellules, tissus), le produit coloré précipite au site précis de la réaction antigène-anticorps et est détecté macroscopiquement ou microscopiquement.

---

<sup>1</sup> Un chromogène est une molécule incolore capable de former un produit coloré à la suite d'une réaction chimique. Par exemple, la diaminobenzidine (DAB) est oxydée lorsque la peroxydase catabolise le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

L'anticorps (ou l'antigène) est couplé à une enzyme soit de façon covalente, soit par des liaisons non covalentes biospécifiques. Pour le couplage covalent, les méthodes les plus courantes utilisent le glutaraldéhyde, le *m*-periodate ou des dérivés de maléimide. L'utilisation d'esters de N-hydroxysuccinimide (NHS) permet d'établir un pontage entre l'enzyme et l'anticorps. Le système biospécifique de conjugaison non covalente est basé sur l'interaction entre la biotine (vitamine soluble, appelée selon les pays vitamine B8, B7 ou H) et la streptavidine (purifiée à partir de *Streptomyces avidinii*) ou l'avidine (isolée des blancs d'œufs). Cette interaction a une affinité extrêmement forte de l'ordre de  $10^{-14}$  M. Deux systèmes peuvent être utilisés. Dans le plus simple, la biotine est conjuguée à l'anticorps et la streptavidine à l'enzyme, toutes deux de façon covalente. Une alternative permet de développer un système d'amplification de la réaction antigène-anticorps. En effet, jusqu'à quatre molécules de biotine

peuvent se lier à une molécule de streptavidine. L'addition à la réaction finale de molécules de biotine bivalentes (liées à l'aide d'un agent réticulant ou *linker*) couplées à l'enzyme et de streptavidine permet la formation de volumineux complexes dans lesquels les sites restés libres de la streptavidine reconnaissent la biotine de l'anticorps conjugué. C'est le système streptavidine-biotine ou avidine-biotine (*Avidin-Biotin Complex* ou ABC) (fig. 4.1).

Les enzymes les plus utilisées sont la peroxydase et la phosphatase alcaline en raison de leur simplicité d'utilisation et de leur sensibilité (tableau 4.1).

La peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase* ou HRP), présente dans des racines de végétaux telles que les radis noirs, est une petite glycoprotéine de 40 kDa, ce qui lui permet de diffuser facilement dans les tissus ou les cellules lors des marquages, tout en limitant les interférences avec la protéine conjuguée. Elle catalyse la réaction d'oxydoréduction suivante qui aboutit à former un chromogène oxydé et de l'eau :

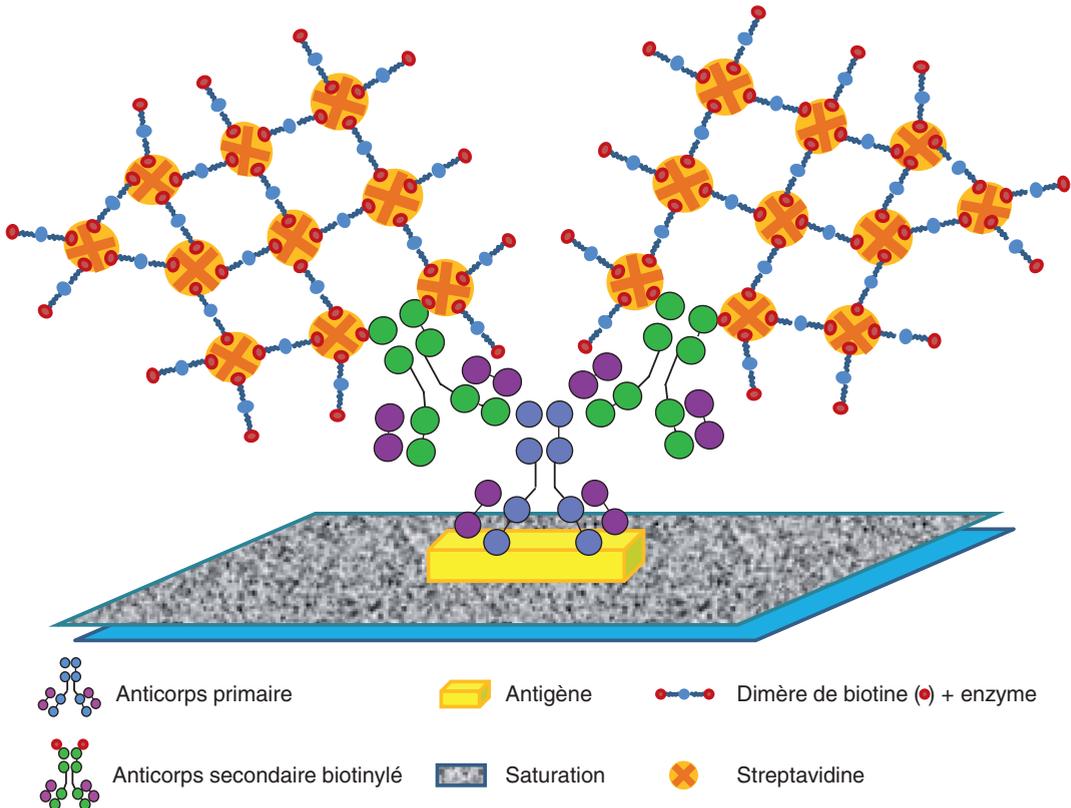
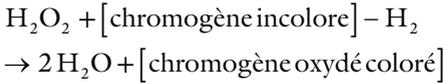
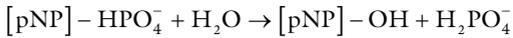


Fig. 4.1 Représentation schématique du système d'amplification du complexe avidine-biotine (ABC).



Elle peut aussi catalyser l'oxydation du luminol en 3-aminophthalate pour les techniques basées sur la chimioluminescence. La HRP peut aussi dans ce cas être amplifiée par certains produits chimiques (*enhancers*) pour faciliter la détection de la réaction d'où le terme *enhanced chemiluminescence* (ECL).

La phosphatase alcaline (PAL), absente des végétaux, est dérivée d'intestins de veau ou d'*Escherichia coli*. Elle catalyse l'hydrolyse d'une liaison ester monophosphate pour libérer un ion phosphate et un groupement hydroxyle libre en présence d'eau. Par exemple, le paranitrophényl phosphate incolore est ainsi transformé en paranitrophényle (pNP) jaune :



Les autres enzymes utilisées incluent l'acétylcholinestérase de l'organe électrique de l'anguille électrique (*Electrophorus electricus*) et, de façon moins courante, la  $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*.

En général, les réactions enzymatiques sont arrêtées par l'addition de solutions d'acide ou de base diluées qui changent le pH du milieu et inactivent l'enzyme.

## Les fluorochromes comme traceurs

Les techniques mettant à profit la phosphorescence, et plus tard la fluorescence, se sont rapidement avérées également utiles pour une détection sensible des réactions antigène-anticorps.

Un fluorochrome est une substance qui est capable d'absorber l'énergie d'une source lumineuse et d'émettre en retour un rayonnement d'une longueur d'onde supérieure. On définit ainsi pour chaque fluorochrome deux longueurs d'onde différentes : excitation optimale, émission maximale. Il est nécessaire de mettre en jeu un appareillage (spectrofluorimètre) équipé pour disposer d'une source d'excitation du fluorochrome et d'un système de détection du signal. Dans les tests d'immunofluorescence sur tissus ou sur cellules, encore largement

utilisés, la lecture est classiquement réalisée au microscope à fluorescence. Pour éviter l'effet délétère de la lumière d'excitation sur l'œil, le système développé par Johan Sebastiaan Ploem, dit d'épi-illumination, équipe maintenant tous les microscopes à fluorescence. Ainsi, seule la lumière émise par le fluorochrome est perçue par l'observateur.

Une autre caractéristique du phénomène de fluorescence réside dans le fait que cette lumière émise résulte du changement transitoire de spin des électrons du fluorochrome et est donc labile. Il est important d'éviter l'exposition des fluorochromes à la lumière en dehors de l'expérimentation et d'effectuer rapidement l'observation.

L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) est le fluorochrome qui a été utilisé initialement et reste l'une des substances les plus populaires. Il est modérément photosensible et émet une lumière jaune-vert après excitation par une lumière bleue (488 nm).

Le développement majeur des techniques dites d'immunofluorescence réside dans le fait qu'un nombre croissant de fluorochromes ont été développés (tableaux 4.2 et 4.3), d'abord excitables par la même lumière mais émettant dans des longueurs d'onde différentes, et plus récemment excitables par diverses sources et émettant dans une grande variété de longueurs d'onde. Ces progrès, couplés au développement de lasers permettant une excitation par un faisceau cohérent très précis, ont permis notamment l'avènement des techniques de cytométrie multiparamétrique dite encore polychromatique/multicolore.

## Les radio-isotopes comme traceurs

Les deux principaux radio-isotopes utilisés dans les techniques immunologiques sont l'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ ) et le tritium ( $^3\text{H}$ ). Ils sont employés pour le marquage d'une molécule qui sert alors de traceur radioactif. Ce caractère radioactif restreint leur utilisation, soumise à une réglementation spécifique.

L'iode-125 est un radionucléide artificiel dont la période radioactive est de 59,7 jours. Il émet des rayonnements X (raie principale 27 keV) et  $\gamma$  (raie principale 35 keV) dont la détection est assurée par un scintillateur solide d'iodure de sodium associé à un photomultiplicateur.

**Tableau 4.1** Caractéristiques des différents substrats de la réaction enzymatique développée en immuno-analyse

Enzyme	Substrat/chromogène/ fluorogène	Technique	État du produit final	Couleur	Longueur d'onde, absorption	Sensibilité	Avantage	Inconvénient
HRP	TMB 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine	ELISA, IHC, ICC	Soluble ou précipité	Bleu et devient jaune en présence d'acide sulfurique (pour arrêter la réaction)	370 ou entre 620 et 650 nm 450 nm si stoppé par H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+++	Non cancérigène	Photosensible
HRP	OPD orthophénylène diamine	ELISA	Soluble	Orangé	450 nm ou 492 si stoppé par HCl ou H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	++	Disponible en tablettes	Photosensible Toxique
HRP	ABTS 2,2'-azino-di-(3-éthylbenzthiazoline sulphonate)	ELISA	Soluble	Bleu-vert. La réaction peut être stoppée par du dodécylsulfate de sodium	405/450 nm	+++	Stable	Pas utilisable en western-blot
HRP	AEC 3-amino-9-éthylcarbazole	IHC	Précipité	Rouge	NA	++	Moins toxique que la DAB bon contraste en hématoxyline eosine	
HRP	5-ASA acide 5-aminosalicylique ou mésalazine	ELISA	Soluble	Arrêt de la réaction par NaOH	450 nm	++	Non toxique (médicament)	Préparation longue
HRP	4CN 4-chloro-1-naphtol	IHC	Précipité	Bleu noir	NA	+	Peu de bruit de fond	Peu sensible
HRP	DAB diaminobenzidine	IHC, ICC, IB	Précipité	Marron foncé	NA	+++	Localisation précise des antigènes	Cancérigène
HRP	Orthotolidine	ELISA	Soluble	Bleu	630 nm	+++	Préparation simple	
HRP	Luminol	ELISA, IB (CS)	Soluble	Bleu. Émission à 413 nm, excitation à 355 nm	NA	+++	Réutilisation plus facile des membranes	Photosensible

Tableau 4.1 Suite

Enzyme	Substrat/chromogène/ fluorigène	Technique	État du produit final	Couleur	Longueur d'onde, absorption	Sensibilité	Avantage	Inconvénient
<b>PAL</b>	<b>pNPP</b> paranitrophénol phosphate	ELISA	Soluble	Jaune	405 nm	+++	Substrat très stable à tempé- rature ambiante (< 30 °C) Révélation lente	Non recommandé pour les études en cinétique Couleur pâle
<b>PAL</b>	<b>BCIP/NBT</b> 5-bromo-4-chloro- 3'-indolylphosphate/ nitro-bleu de tétrazolium	ELISA sans NBT IB, IHC avec NBT	Soluble ou précipité	Bleu-violet	670 nm en ELISA	+++	Non photosensible Soluble dans l'alcool	
<b>PAL</b>	<b>FDP</b> <i>fluorescein</i> <i>diphosphate</i>	ELISA	Soluble	Vert. Émission à 528 nm, excita- tion à 485 nm	NA	+++	Très sensible, génération de fluoresceïne très fluorescente	Photosensible
<b>PAL</b>	<b>DDAO</b> 7-hydroxy-9H-(1,3- dichloro-9,9-diméthyla- cridin-2-one)	ELISA, IB (CS)	Soluble	Rouge. Émission à 633 nm quand excitation He-Ne	NA	+++	Marquage stable sur les blots	Photosensible
<b>PAL</b>	<b>MUP</b> 4-méthylumbellife- ryl phosphate	ELISA (CS)	Soluble	Violet. Émission à 440 nm quand excité à 360 nm ou par UV	NA	+++	Stable, facile à utiliser	Fluorescence optimale en milieu basique Variantes à utiliser aux pH bas
<b>Acétylcholinestérase</b>	<b>Réactif d'Eilman</b> <b>acétylthiocholine/DNTB</b> acide 5,5'-dithio-bis- (2-nitrobenzoïque)	ELISA	Soluble	Jaune	405-412 nm	+		Peu utilisé Acétylthiocholine instable

NBT : Nitrobleu de tétrazolium ; CS : chimioluminescence ; IB : immunoblot ; IHC : immunohistochimie ; NA : non applicable.

**Tableau 4.2** Caractéristiques des différents fluorochromes et tandems les plus utilisés en immunofluorescence

Fluorochrome	Tandem	Couleur	Laser d'excitation	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Sensibilité
<b>FITC</b> : isothiocyanate de fluorescéine	Non	Vert	Bleu	495	519	Moyenne
<b>PE</b> : phycoérythrine	Non	Jaune	Bleu	480/565	578	Forte
<b>PE-Cy5</b> : phycoérythrine-cyanine 5	Oui	Rouge	Bleu	480/565/650	670	Bonne
<b>PE-Cy7</b> : phycoérythrine-cyanine 7	Oui	Rouge	Bleu	480/565/743	767	Bonne
<b>PerCP-Cy5.5</b> : peridinin-chlorophylle/cyanine 5.5	Oui	Rouge	Bleu	490	675	Moyenne
<b>ECD</b> : phycoérythrine-Texas red	Oui	Orange	Bleu	486	620	Forte
<b>Cy5</b> : Cyanine 5	Non	Rouge	Rouge	650	670	Moyenne
<b>Cy5.5</b> : Cyanine 5.5	Non	Rouge	Rouge	675	694	Moyenne
<b>APC</b> : allophycocyanine	Non	Rouge	Rouge	650	660	Fortte
<b>APC-Cy7</b> : allophycocyanine-cyanine 7	Oui	Rouge	Rouge	650/755	767	Faible
<b>Pacific blue</b>	Non	Bleu	UV/violet	403	455	Faible
<b>Krome Orange®</b>	Non	Orange	UV/violet	398	528	Forte
<b>Horizon V500</b>	Non	Bleu-vert	UV/violet	415	500	Forte

Le tritium présente une période radioactive de 12,3 ans et est un émetteur  $\beta$  de faible énergie. Sa détection dans des échantillons biologiques nécessite d'y ajouter un réactif scintillant dont l'émission finale de photons est détectée par un compteur à scintillation.

Comme pour les autres traceurs, il faut que le marquage radioactif ne modifie pas la structure moléculaire, en particulier l'immunoréactivité. Après couplage, le traceur doit être utilisé rapidement afin d'obtenir le signal optimal corrélé à son activité spécifique<sup>2</sup>. Il est à noter que la

stabilité du marquage peut être très variable d'un traceur à l'autre. Par ailleurs, il convient de noter la production de nouveaux radio-éléments ou radiopharmaceutiques adaptés à l'emploi diagnostique et thérapeutique d'anticorps monoclonaux.

## **Dosages immuno-enzymatiques (ELISA) ou immuno-fluorescents (FLISA)**

La technique d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) aussi appelée EIA (*Enzyme Immuno Assay*) a été mise au point au début des

<sup>2</sup> L'activité spécifique correspond au nombre de désintégrations d'une substance radioactive par unité de temps et de masse.

**Tableau 4.3** Fluorochromes colorant les noyaux et utiles pour la mesure du cycle cellulaire, de la viabilité ou pour identifier les cellules nucléées

Fluorochrome	Propriétés	Couleur	Laser d'excitation	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
<b>DAPI</b> : diamidino phénylindole	Se lie aux régions riches en A-T Peut pénétrer dans les cellules intactes	Bleu	UV	351	647
<b>IP</b> : iodure de propidium	Intercalant marquant les cellules non viables	Rouge	Bleu	505/540	620
<b>Bet</b> : bromure d'éthidium	Intercalant marquant les cellules non viables	Bleu	Bleu	320/518	605
<b>7-AAD</b> : 7-amino-actinomycine	Intercalant marquant les cellules non viables	Bleu	Bleu	546	647
<b>Draq5</b> : 1,5-bis[[2-(diméthylamino)éthyl]amino]-4,8-dihydroxyanthracène-9,10-dione	Marquage nucléaire des cellules vivantes	Bleu ou Rouge	Rouge	646	697
<b>Syto 16®</b>	Marquage nucléaire des cellules vivantes	Vert	Bleu	488	518
<b>CyTRAK Orange®</b>	Marquage nucléaire des cellules vivantes	Orange	Bleu	488	615

années 1970 par deux chercheurs de l'université de Stockholm, Eva Engvall et Peter Perlmann.

Comme son nom l'indique, la technique ELISA repose sur une réaction immunologique se déroulant sur un support solide et révélée par une réaction enzymatique en phase liquide. La mesure de la réaction colorée finale se fait à l'aide d'un spectrophotomètre. Un fluorochrome est utilisé pour révéler la réaction dans la variante FLISA (*Fluorescence-Linked ImmunoSorbent Assay*).

L'ELISA peut être réalisé à visée qualitative ou quantitative selon que l'on utilise ou non une courbe d'étalonnage (ou gamme étalon). Cette dernière doit être réalisée avec une solution de concentration connue de la molécule que l'on cherche à doser. Le seuil de détection des ELISA quantitatifs est de l'ordre du pmol/L ou du ng/mL. Des dosages semi-quantitatifs peuvent être réalisés en comparant la densité optique obtenue avec l'échantillon à celle d'une série de calibrateurs.

Les antigènes d'intérêt ou les anticorps spécifiques sont immobilisés sur le support solide selon

le type d'ELISA utilisé. On distingue plusieurs types d'ELISA en fonction de la nature de la molécule à doser et de la technique de révélation : ELISA direct, indirect, sandwich ou compétitif (tableau 4.4 et fig. 4.2).

## Méthodologie

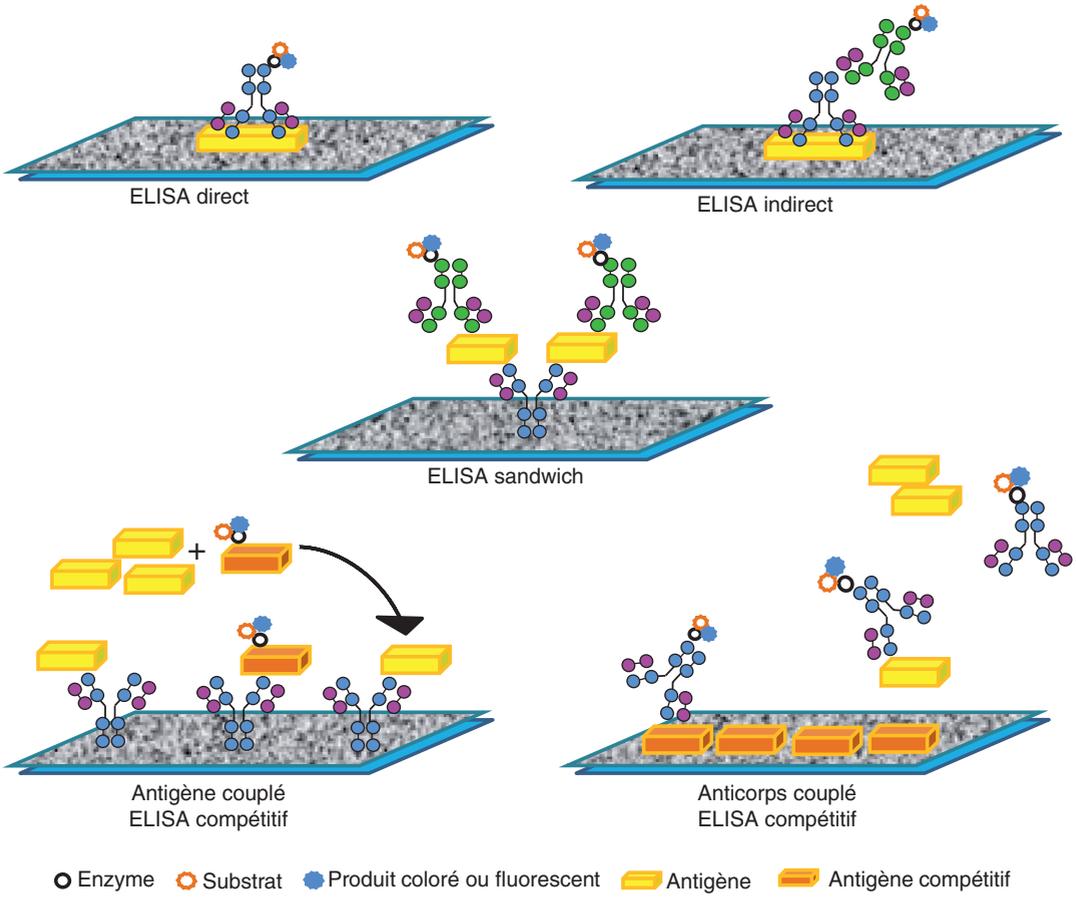
Les techniques ELISA comportent différentes étapes (fig. 4.3).

### Adsorption des molécules (fig. 4.3 : ①)

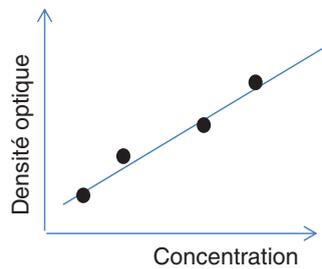
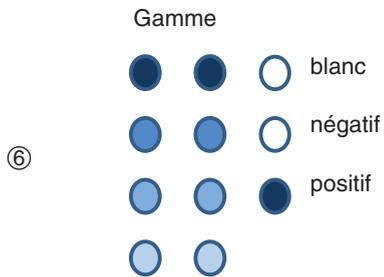
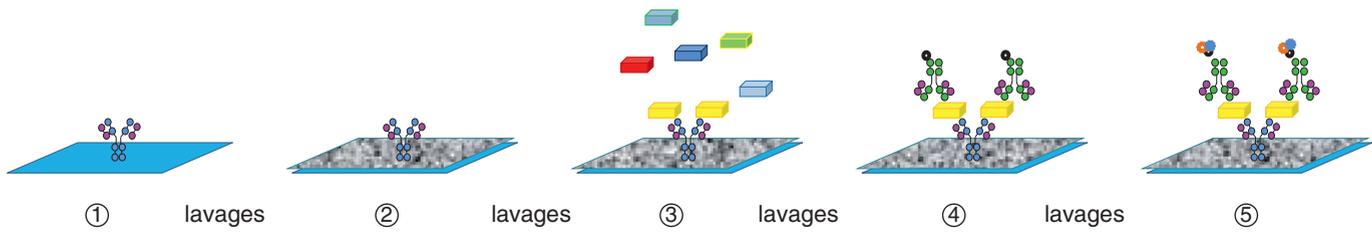
La première étape clé de l'ELISA repose sur l'immobilisation de la molécule à adsorber sur un support solide, le plus généralement des microplaques (de 96 ou 384 puits) de polystyrène à fond plat à haute capacité d'adsorption. Il s'agit principalement d'une adsorption passive directe réalisée grâce à l'établissement de liaisons non covalentes de type hydrophobe et ionique entre le plastique et les résidus non polaires ou ioniques des protéines. Cette étape s'effectue classiquement en tampon alcalin

**Tableau 4.4** Différents types d'ELISA utilisables selon l'analyte recherché : antigène ou anticorps

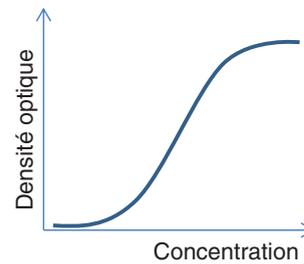
Analyte recherché	Type de technique ELISA	Analyte adsorbé	Premier réactif soluble	Deuxième réactif soluble	Réactif soluble de révélation
Antigène	Direct	Antigène	Anticorps de détection marqué	/	Substrat/ chromogène
Anticorps		Anticorps	Antigène marqué	/	Substrat/ chromogène
Anticorps	Indirect	Antigène	Anticorps primaire	Anticorps secondaire marqué	Substrat/ chromogène
Antigène	Sandwich	Anticorps de capture	Antigène	Anticorps de détection marqué	Substrat/ chromogène
Anticorps	Compétitif	Antigène	Anticorps	Anticorps marqué	Substrat/ chromogène
Antigène		Anticorps	Antigène	Antigène marqué	Substrat/ chromogène



**Fig. 4.2** Représentation schématique des différents types d'ELISA ou de FLISA.



Gamme étalon



Dosage (sigmoïde)

**Fig. 4.3** Différentes étapes d'un ELISA de type sandwich.

type *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) pH 7,4 ou carbonate-bicarbonate pH 9,6 afin d'ioniser les molécules en solution lors de cette étape. Toutefois, l'adsorption passive directe peut avoir des limites (faible capacité d'absorption, mauvaise orientation de la protéine adsorbée, dénaturation, contamination par d'autres protéines...) et des alternatives ont dû être développées. Il s'agit par exemple de l'utilisation de plaques pré-adsorbées avec des protéines A ou G du staphylocoque très affines pour les fragments Fc des immunoglobulines, ou recouvertes de streptavidine permettant la fixation d'antigènes biotinylés. Il est possible également d'utiliser un support chimiquement activé présentant des groupements hautement réactifs permettant d'établir des liaisons covalentes entre la microplaque et l'antigène ou l'anticorps de capture. Il est nécessaire de procéder à un lavage en tampon type PBS ou TBS (*Tris-Buffered Saline*) afin d'éliminer le matériel non adsorbé. Des détergents doux (comme le Tween-20®) sont classiquement ajoutés à faible concentration (0,05 %) pour faciliter les lavages.

#### Saturation du support adsorbant (fig. 4.3 : ☺)

Après l'étape de liaison au support, il est nécessaire de neutraliser les zones du support restées libres. Il s'agit de l'étape de saturation qui permet d'éviter toute adsorption ultérieure de matériel présent dans l'échantillon à doser ou lors de l'ajout des autres réactifs. Elle s'effectue par ajout de tampon riche en protéines (type PBS + albumine bovine sérique) suivi d'une étape de lavage.

#### Première réaction antigène-anticorps (fig. 4.3 : ☺)

Après la saturation de la plaque et des lavages, le premier réactif soluble est déposé dans les puits et la plaque est incubée. Pendant cette étape, les antigènes ou les anticorps en solution vont se lier à la molécule adsorbée. Dans les ELISA directs, ce premier réactif est couplé à l'enzyme.

#### Deuxième réaction antigène-anticorps (fig. 4.3 : ☺)

Après plusieurs lavages, sauf dans les ELISA directs, le deuxième réactif soluble, couplé à l'enzyme, est déposé et la plaque est incubée. Dans les ELISA indirects, ce réactif est un anticorps secondaire dont

plusieurs molécules peuvent se fixer à l'anticorps primaire, ce qui amplifie le signal. Par ailleurs, cette alternative évite les risques de perte de réactivité de l'anticorps primaire suite à son couplage chimique direct avec une enzyme ou la biotine. Dans l'ELISA sandwich, en règle générale, l'anticorps de capture est un anticorps polyclonal, alors que l'anticorps de détection est un monoclonal.

#### Révélation (fig. 4.3 : ☺)

Après lavages, l'étape ultime de l'ELISA est la révélation consistant en l'ajout du substrat et du chromogène spécifiques de l'enzyme. Cette étape est réalisée dans un tampon adapté à l'activité enzymatique du système de révélation. La mesure de la densité optique peut être réalisée en cinétique ou en point fixe après arrêt de la réaction par ajout d'un tampon acide ou basique détruisant l'activité enzymatique. À ce stade, la quantité de signal émis est proportionnelle à la quantité de la molécule à doser.

Il est à noter que d'autres systèmes de révélation peuvent être employés, notamment de type fluorométrique ou chimioluminescent en fonction du type de substrat utilisé. Dans ces cas, le support d'immobilisation doit être compatible avec le moyen de détection, notamment un support opaque pour une révélation en chimioluminescence.

#### Expression des résultats (fig. 4.3 : ☺)

Selon le type d'ELISA utilisé, différentes courbes de titration peuvent être obtenues.

#### Recommandations de mise en œuvre

Pour des résultats exploitables en ELISA et éviter la perte de sensibilité, il est nécessaire de trouver un bon équilibre entre le signal spécifique émis et le bruit de fond non spécifique. Ce bruit de fond résulte de l'adsorption de protéines contaminantes non éliminées lors des lavages et capables de fixer de manière non spécifique les réactifs de révélation. L'obtention d'un rapport signal/bruit acceptable nécessite d'optimiser l'étape de saturation, d'adapter les concentrations des réactifs de capture et de révélation et de prêter un soin particulier aux lavages. Le bruit de fond résultant des différentes étapes de manipulation est contrôlé par la réalisa-

tion de puits dits blancs pour lesquels l'ensemble des étapes réactionnelles sont effectuées en l'absence de la molécule à doser remplacée par une solution tampon de type PBS. La densité optique des puits blancs est soustraite de la valeur obtenue pour les puits de dosage. La densité optique des puits blancs doit être inférieure à 0,1. Si la densité optique des échantillons à doser dépasse la valeur de 2, les résultats ne sont plus interprétables car l'absorbance n'est plus proportionnelle à la concentration (domaine de validité de la loi de Beer-Lambert). Il est alors nécessaire de diluer les échantillons et d'effectuer un nouveau dosage.

### Avantages/inconvénients

De manière générale l'ELISA est une technique sensible, rapide, adaptée à la réalisation de grandes séries de dosage et offre la possibilité d'une automatisation totale.

### Exemples d'applications

L'ELISA est une technique très couramment développée dans le domaine du diagnostic biologique ou en recherche fondamentale.

- En recherche : le dosage de protéines d'intérêt dans des surnageants ou lysats cellulaires est réalisé fréquemment en ELISA.
- Applications industrielles et vétérinaires : ces techniques sont également appliquées dans le contrôle qualité des produits finis ou en cours de production, ainsi qu'en épidémiologie et contrôle vétérinaire.
- En clinique : l'ELISA est très utilisée pour le sérodiagnostic des maladies infectieuses et pour le diagnostic et le suivi de maladies auto-immunes.

## Dosages radio-immunologiques (RIA)

Les techniques radio-immunologiques ont pu être mises au point à la suite de la découverte des radio-isotopes qui constituent des traceurs très sensibles. Ces techniques ont été initialement développées pour le dosage de l'insuline, puis d'autres hormones. Pendant longtemps, l'iode-125 a été le seul marqueur radioactif utilisé dans la mise au point et la

	Avantages	Inconvénients	Alternatives
<b>Immobilisation</b>	Facile et rapide	Dénaturation de l'antigène ou de l'anticorps et perte de sensibilité Risque de fixation de protéines non spécifiques et d'augmentation du bruit de fond	Passage à une immobilisation indirecte Amélioration des lavages et de la saturation
<b>Révélation directe</b>	Durée plus courte Pas de problème de réactivité croisée liée à l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé	Perte de réactivité liée au couplage Pas d'amplification du signal Coût du couplage du réactif de révélation Nécessité de disposer de deux anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes distincts de l'antigène pour les ELISA sandwich n'utilisant pas d'anticorps polyclonal de capture	Révélation indirecte Utilisation d'anticorps polyclonaux de capture et d'un anticorps monoclonal de détection pour les ELISA sandwich
<b>Révélation indirecte</b>	Amplification du signal donc de la sensibilité de l'ELISA Réactifs de révélation indépendants de la spécificité recherchée et donc utilisables pour différents tests	Une étape supplémentaire, durée plus longue Risque de réactivité croisée et d'augmentation du bruit de fond Interférences avec les facteurs rhumatoïdes et agglutinines froides lors de dosages sanguins : risque de faux positifs	Adapter la concentration de l'anticorps et le nombre de lavages Diluer les échantillons

réalisation des immunodosages de substances présentes à des concentrations très faibles dans les liquides biologiques et les tissus. Il a été progressivement supplanté par l'emploi de marqueurs non isotopiques (enzymatiques et luminescents) offrant une plus grande facilité d'emploi sans les restrictions réglementaires liées à la manipulation des produits radioactifs. La sensibilité des techniques radio-immunologiques est de l'ordre du pmol/L ou du ng/mL. Cette sensibilité permet le dosage de certaines hormones stéroïdes, de vitamines, de médicaments, de marqueurs tumoraux ou d'auto-anticorps.

### Méthodologie

L'utilisation des trousseaux d'immuno-analyse relève d'une décision administrative autorisant la manipulation des substances radioactives. Elles comportent des protéines ou des anticorps couplés à un radio-isotope tels que l'iode-125 ( $^{125}\text{I}$ ) ou le tritium ( $^3\text{H}$ ). L'activité radioactive manipulée est de l'ordre de 10 à 100 kilo-becquerels (kBq). La détection radiométrique des échantillons biologiques est réalisée dans des compteurs gamma équipés de détecteurs associés à des logiciels de traitement des données appropriés.

On distingue plusieurs types de RIA.

### Méthode par compétition (ou par défaut d'anticorps)

Le principe repose sur la compétition entre des molécules d'antigène marquées ( $\text{Ag}^*$ ) et non marquées ( $\text{Ag}$ ) d'une même espèce vis-à-vis d'un nombre donné et limité de sites de liaison anticorps. L'anticorps ( $\text{Ac}$ ) est fixé sur une phase solide, paroi de tube ou billes de polystyrène. L'excès de traceur est éliminé après incubation par une étape de lavage. La quantité des formes liées ( $\text{Ag}^*\text{-Ac}$ ) est inversement proportionnelle à la quantité de l'analyte non marqué ( $\text{Ag}$ ) présent dans l'échantillon. Les trousseaux de dosage fournissent le support solide (tubes, billes), l'analyte marqué et une gamme étalon couvrant le domaine de mesure.

### Méthode sandwich

Le principe du dosage s'appuie sur la reconnaissance de l'antigène dosé par deux anticorps spécifiques de deux sites antigéniques distincts et accessibles. Un premier anticorps est adsorbé sur un support solide (tube ou bille). Le second anticorps

est marqué à l'iode-125 et utilisé comme traceur. L'antigène de l'étalonnage ou de l'échantillon est pris en sandwich entre les deux anticorps. L'excès de traceur est éliminé par une étape de lavage. La radioactivité mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon.

### Méthode par immunoprécipitation en phase liquide (e.g. test de Farr pour le dosage des auto-anticorps anti-ADN double brin)

Cette méthode permet de rechercher des anticorps à l'aide d'antigènes purifiés marqués à l'iode-125. Les complexes immuns ( $\text{Ag}^*\text{-Ac}$ ) formés dans le milieu réactionnel sont précipités par l'addition de polyéthylène glycol (PEG) ou de particules recouvertes de protéine A (spécifiques des immunoglobulines humaines et des anticorps de souris). Après centrifugation et élimination du surnageant, la quantité de radioactivité dans le précipité est proportionnelle à la concentration en anticorps de l'échantillon.

Cette technique peut être appliquée au dosage de petits antigènes ne présentant qu'un épitope, comme les haptènes, des peptides ou certains médicaments. On applique alors le principe de la compétition entre cet antigène recherché et le même marqué à l'iode-125 ajouté au milieu réactionnel en même temps que des anticorps spécifiques. La quantité de radioactivité mesurée dans les complexes immuns précipités est inversement proportionnelle à la quantité de l'antigène recherché.

### Recommandations de mise en œuvre

Une gamme d'étalonnage est indispensable pour tout dosage radio-immunologique pour convertir les mesures de radioactivité (coups par minute ou cpm) en concentration. Elle repose sur la mesure de la radioactivité du bruit de fond (liaison non spécifique), de celle des échantillons ( $\text{Bo}$ ) et de celle des points de gamme ( $\text{B}$ ) permettant de calculer la capacité de liaison de l'analyte selon la formule suivante :

$$\text{Bo}(\%) = \frac{\text{B}}{[\text{cpm}(\text{étalon ou échantillon}) - \text{cpm}(\text{liaison non spécifique})]} \times 100$$

## Avantages/inconvénients

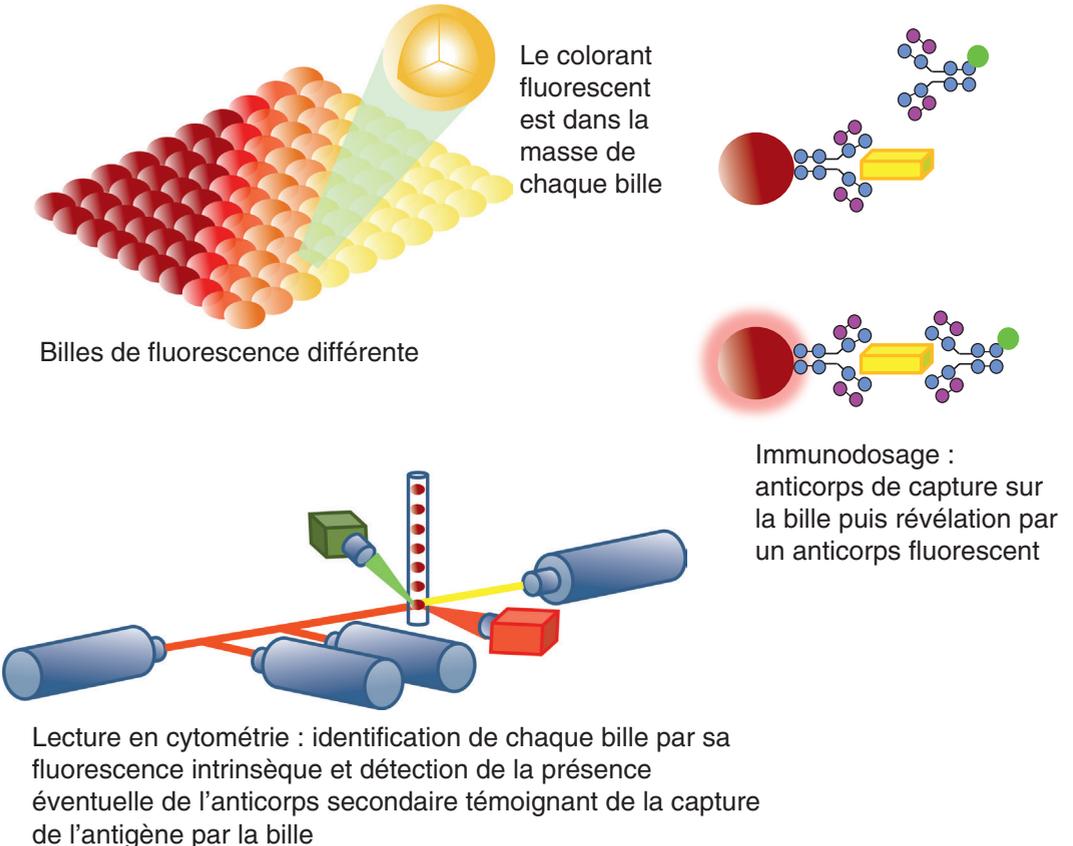
Avantages	Inconvénients
Faible encombrement stérique du tritium	Utilisation réglementée des radio-isotopes ( <i>e.g.</i> précaution d'utilisation, habilitation des personnels et des locaux, gestion des déchets)
Grande spécificité	Demi-vie courte de l'iode-125
Grande sensibilité de la détection	Variation des contrôles de qualité internes des trousses de RIA
Grande stabilité du signal émis par le tritium	Interférence de la bilirubine, de l'hémoglobine, voire des lipoprotéines

## Exemples d'applications

Les techniques RIA ont été supplantées par les techniques ELISA. Il subsiste quelques domaines d'application en hormonologie, cancérologie (marqueurs tumoraux), auto-immunité (anticorps anti-ADN natif) ou pharmacologie (dosage de médicaments et de toxiques).

## Immunodosages multiplex sur billes

La technologie d'immunodosages multiplex utilise des microbilles de polystyrène de 5 à 8  $\mu\text{m}$  (selon les fournisseurs), recouvertes de molécules (*e.g.* peptides, anticorps, acides nucléiques) fixées de manière covalente par une liaison entre le groupement amine de la molécule et les fonctions carboxyliques des microbilles. L'originalité de cette technique repose sur la détection simultanée de plusieurs analytes (jusqu'à 100) à partir d'un faible volume d'échantillon, d'où le terme de multiplexage. Le principe est de capturer l'analyte avec les billes et de révéler cette capture avec un traceur fluorescent, selon une technique de type sandwich (*fig. 4.4*).



**Fig. 4.4** Principe du multiplexage sur billes.

Exemple d'un système à laser rouge (635 nm) et à laser vert (532 nm).

## Méthodologie

Le multiplexage est rendu possible par l'utilisation de microbilles dans lesquelles sont incorporées des quantités définies de fluorochromes, le plus souvent rouge et orange. Jusqu'à 100 types de billes différentes, émettant chacune une fluorescence de longueur d'onde spécifique, peuvent être générés et mélangés. Ces mélanges rassemblent des billes dont chaque type est recouvert de molécules différentes (*e.g.* peptides, anticorps, sondes d'acides nucléiques, enzyme) en fonction de l'application envisagée.

Les billes sont incubées avec les échantillons à analyser dans des plaques de 96 puits. L'étape de lavage suivant cette incubation n'est pas obligatoire et dépend du type d'analyse et du fournisseur. Une seconde incubation est réalisée en présence d'un traceur couplé à un fluorochrome, généralement la phycoérythrine. Le traceur peut être un anticorps pour la détection de protéines ou d'auto-anticorps. On peut aussi mettre à profit le système d'amplification streptavidine-phycoérythrine, par exemple pour la révélation d'un amplicon biotinylé fixé à des sondes oligonucléotidiques portées par les billes.

La suspension de billes est entraînée dans une veine liquide à travers un fluorimètre ou un cytomètre en flux. Après excitation par un laser, chaque bille émet sa fluorescence intrinsèque qui permet son identification dans un masque d'acquisition pré-établi. L'excitation du traceur, éventuellement par un second laser, s'il est présent sur la bille, témoigne de la positivité de la réaction sur un ou plusieurs types de billes. Un minimum de 100 billes de chaque type est analysé. En parallèle, l'analyse de la lumière diffractée latéralement permet de détecter les doublets de billes, exclus de l'analyse.

## Recommandations de mise en œuvre

La validation des résultats s'appuie sur des contrôles. Les trousse incluent des billes contrôle positif (*e.g.* billes recouvertes d'immunoglobulines humaines, sérum contenant des quantités connues de l'analyte à doser). L'utilisation de billes contrôle négatif permet de déterminer l'intensité de fluorescence associée au bruit de fond de la réaction. Cette valeur doit être déduite de celle mesurée sur les billes tests et permet de dé-

nir les moyennes d'intensité de fluorescence normalisées de chaque réaction.

Les résultats peuvent être rendus en intensité relative par rapport à une bille seuil contrôle négatif ou, quantitativement, en valeur de concentration, d'unités arbitraires ou internationales selon la nature du calibrateur utilisé.

## Avantages/inconvénients

Ces avantages et limites recouvrent celles des techniques immuno-enzymatiques et de cytométrie en flux.

Avantages	Inconvénients
Nombreux paramètres dosés simultanément	Risque de perte/diminution de la réactivité liée au couplage covalent sur les microbilles
Faible volume d'échantillon (quelques dizaines de $\mu\text{L}$ )	Mise au point parfois difficile
Grande étendue du domaine de mesure	Risque de réactivité croisée surtout dans la recherche d'auto-anticorps
Rapidité et très bonne sensibilité, au moins équivalente à la technique ELISA	Pas de standardisation et variabilité interlots (surtout pour la recherche d'auto-anticorps)
Large spectre d'applications	Sensibilité des lasers aux variations de température
	Sensibilité des microbilles et du traceur à la lumière
	Nécessité de calibration fréquente de l'appareil
	Comme pour l'ELISA, la présence de lipides, de bilirubine ou de facteurs rhumatoïdes interfère avec la technique
	Non adapté aux broyats cellulaires

## Exemples d'applications

Les domaines d'application de la technologie d'immuno-analyse par multiplexage sur billes sont très étendus.

- En recherche : le dosage des cytokines dans des fluides biologiques ou dans des surnageants ou lysats cellulaires utilise cette méthodologie. Il est par ailleurs désormais possible d'effectuer des analyses transcriptomiques (mRNA, miRNA) grâce aux plates-formes de multiplexage sur billes.
- En clinique : le multiplexage est utilisé pour la détection et la quantification d'auto-anticorps (diagnostic et suivi de maladies auto-immunes), d'allo-anticorps (anti-HLA en transplantation

d'organes) ou d'anticorps post-infectieux. Le couplage de sondes oligonucléotidiques sur les billes permet le typage d'allèles (très utilisé pour les typages HLA, en transplantation notamment), l'analyse de polymorphismes ou de mutations, ou encore la détection d'acides nucléiques viraux ou bactériens.

## Immuno-empreinte/ western-blot

La technique d'immuno-empreinte ou western-blotting<sup>3</sup> a été décrite en 1973. Elle consiste en une électrophorèse dénaturante permettant la séparation des protéines d'une solution, suivie de leur transfert sur une membrane tout en respectant le positionnement de chaque protéine sur le gel d'électrophorèse. La détection est ensuite réalisée sur la membrane, de manière directe grâce à des anticorps spécifiques couplés à un traceur ou de manière indirecte en utilisant alors un anticorps spécifique et un anticorps secondaire couplé à un traceur enzymatique (permettant la production d'un précipité coloré ou la génération d'électrons captés par un film) ou fluorescent (nécessitant l'utilisation d'une caméra ou d'un système d'imagerie adapté). Cette technique est qualitative, voire semi-quantitative, dans la mesure où l'intensité du signal émis est corrélée à la quantité d'antigène adsorbé sur la membrane.

L'immunodot (*dot-blot*) ou immunoslot (*slot-blot*), selon la forme des dépôts, est une technique dérivée du western-blot dans laquelle les antigènes, natifs, issus de tissus, de lysats cellulaires ou recombinants, sont directement déposés sur une membrane souple. Il n'y a pas de séparation préalable des protéines sur gel. En revanche, les étapes de révélation sont comparables pour les deux méthodes.

## Méthodologie (fig. 4.5)

### Séparation protéique (fig. 4.5 : ①)

La première étape d'un western-blot consiste en la séparation des molécules polypeptidiques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ou PAGE). Si cette séparation est réalisée en conditions natives, les protéines sont séparées selon leurs propriétés physiques intrinsèques (taille et charge globale), ce qui permet le maintien de la conformation et des interactions entre polypeptides ou encore des activités enzymatiques. *A contrario*, l'addition d'agents dénaturants tels que le laurylsulfate de sodium (*sodium dodecylsulfate* ou SDS) permet, en chargeant négativement l'ensemble des protéines contenues dans l'échantillon, de les séparer uniquement en fonction de leur taille. Cette technique appelée SDS-PAGE est très largement employée pour déterminer la masse moléculaire des polypeptides contenus dans un échantillon. La porosité du gel de séparation dépend de sa réticulation qui peut être contrôlée par la quantité d'acrylamide et de bisacrylamide qui le composent. Cette porosité doit être adaptée à la taille des protéines à analyser. La séparation de protéines de petite taille est effectuée sur des gels de forte réticulation (autour de 15 % d'acrylamide), alors que les protéines de grande taille sont séparées sur un gel de faible réticulation (7,5 %). L'utilisation de gels composés d'un gradient de concentration d'acrylamide et de bisacrylamide permet la séparation de protéines de gamme de taille plus étendue, de quelques kilodaltons (kDa) à plusieurs milliers. Un gel de faible réticulation (gel de concentration) est coulé au-dessus du gel de séparation analytique pour favoriser ainsi la résolution et la séparation lors de la migration.

Il existe également des gels réalisant un gradient de pH qui permettent de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique. Ce gel peut constituer une première séparation dans la technique bidimensionnelle.

### Transfert (fig. 4.5 : ②)

Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose ou de *polyvinylidene difluorure* (PVDF) placée en contact direct avec le gel. Ce transfert est réalisé

<sup>3</sup> Cette dénomination est un clin d'œil en référence à la technique de séparation et d'identification des ADN développée par Sir Edwin Mellor Southern. Par extension amusante, la détection des ARN a été appelée northern-blot et celle des protéines western-blot. Il n'y a pas d'eastern-blot!

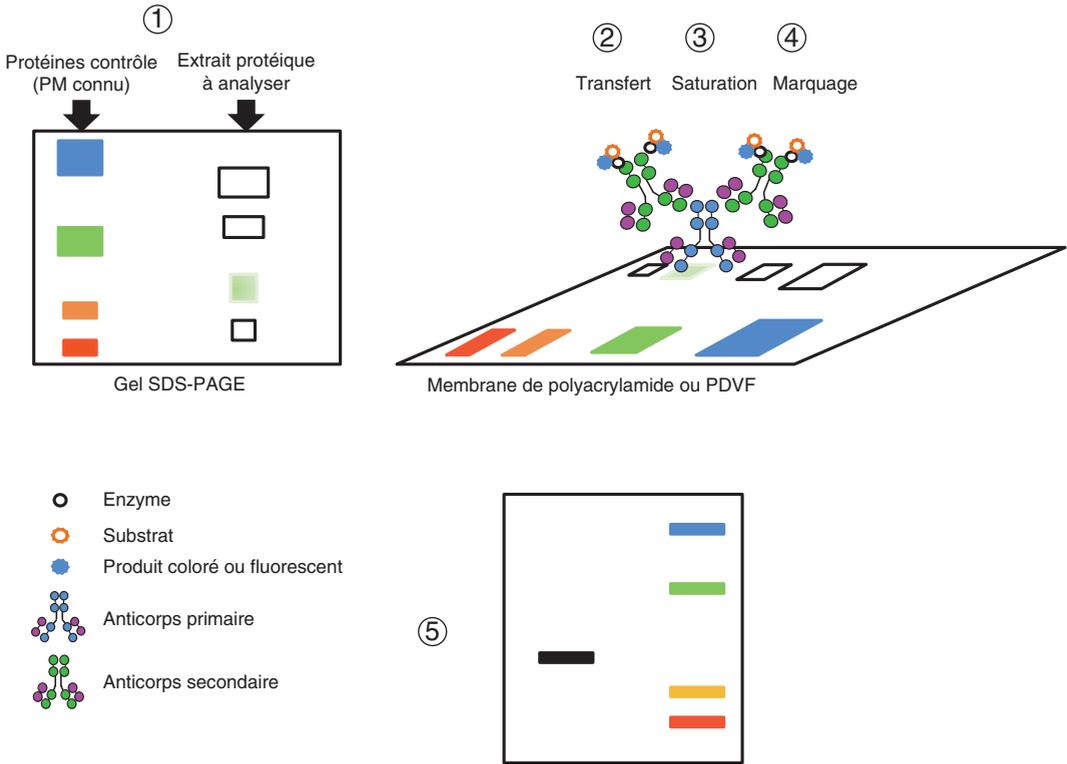


Fig. 4.5 Étapes méthodologiques du western-blot.

par l'application d'un champ électrique permettant la migration électrophorétique des protéines depuis le gel vers la membrane ou par transfert passif (plus long et rendement plus faible). Les protéines fixées sur la membrane sont l'empreinte en miroir des protéines ayant migré dans le gel.

**Saturation et lavages (fig. 4.5 : ③)**

Les divers types de membranes utilisées ont une forte affinité pour les protéines et une étape de saturation des surfaces non occupées est indispensable afin d'éviter la fixation non spécifique des anticorps de révélation. Cette étape est cruciale pour obtenir un bon rapport signal/bruit de fond et une bonne sensibilité de la technique. Les tampons de saturation sont réalisés généralement à base de lait (riche en caséine) ou de sérum (riche en albumine). À l'issue de l'étape de saturation, la membrane est lavée pour éliminer tout matériel non fixé. Comme pour la technique ELISA, les tampons de lavage sont de type *Phosphate-Buffered*

*Saline* (PBS) ou *Tris-Buffered Saline* (TBS) supplémenté d'un détergent doux comme le Tween-20® ou le NP-40 à faible concentration (0,05 %). Les étapes de lavages sont primordiales pour assurer un rapport signal/bruit de fond optimal.

**Révélation et analyse des résultats (fig. 4.5 : ④ et ⑤)**

La révélation de la(des) protéine(s) d'intérêt fixée(s) sur la membrane est effectuée par incubation dans un bain d'anticorps, soit directement en utilisant un anticorps spécifique couplé à un traceur, soit indirectement en utilisant un anticorps secondaire reconnaissant le domaine Fc de l'anticorps primaire. Plusieurs lavages sont nécessaires entre chaque incubation de la membrane avec les anticorps. Le traceur couplé à l'anticorps est une enzyme (peroxydase ou phosphatase alcaline) ou un marqueur luminescent ou fluorescent. Les réactions chromogéniques sont révélées directement par observation immédiate de la membrane.

Les substrats chimioluminescents nécessitent l'utilisation d'un film sensible aux photons ou d'un appareillage comportant une chambre noire et une caméra haute sensibilité (CCD ou CMOS). La lumière émise est détectée grâce à un appareillage dédié. La révélation chromogénique est la moins coûteuse mais présente les désavantages d'être peu sensible et d'une perte de signal sur le long terme. L'alternative de la révélation chimioluminescente offre l'avantage d'une meilleure sensibilité par l'utilisation de films recouverts de molécules photoréactives. Cette technique de révélation est très largement employée. Plus récemment, des techniques de révélation avec traceurs fluorescents ont été développées mais elles nécessitent un appareillage de détection dédié. Elles offrent cependant l'avantage de permettre l'utilisation de plusieurs fluorophores pour la détection simultanée de plusieurs protéines sur la même membrane plutôt que des révélations successives qui peuvent être effectuées avec les autres techniques.

### Recommandations de mise en œuvre

De nombreux paramètres entrent en jeu pour le bon déroulement d'un western-blot. Le pH des tampons et la composition du gel influencent la mobilité des protéines, tandis que l'efficacité du transfert dépend de la nature des protéines, des tampons assurant la conduction, de la force du courant électrique (généralement faible force ionique et faible courant) et de la durée du transfert.

La composition des tampons de lavage, la détermination des concentrations optimales des anticorps primaires et/ou secondaires sont également critiques pour un bon rapport signal/bruit de fond et une sensibilité adéquate. Le seuil de sensibilité du western-blot est de l'ordre du nanogramme (ng) de protéines. L'optimisation des méthodes de détection, notamment à l'aide de fluorophores infrarouge, permet de descendre jusqu'au picogramme (pg). L'intensité des bandes spécifiquement révélées est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps ayant reconnu l'antigène à la surface de la membrane, et donc à la quantité de protéines d'intérêt fixées. Il est pos-

sible d'intégrer et ainsi de quantifier les bandes obtenues après révélation grâce à un scanner ou une caméra et de comparer les quantités relatives de protéines dans plusieurs conditions analytiques. Il faut prendre soin d'utiliser un contrôle de charge protéique, représenté par une protéine, l'actine par exemple pour des extraits cellulaires, dont le taux ne varie pas quelles que soient les conditions analytiques. La détermination de la masse moléculaire<sup>4</sup> en SDS-PAGE de protéines contenues dans un échantillon nécessite la séparation sur le même gel et le transfert sur la même membrane de protéines de masse moléculaire connue (standard de migration). Ces protéines peuvent être pré-colorées pour permettre leur visualisation directe sur le gel et la membrane après transfert. Le temps de migration électrophorétique des protéines est inversement proportionnel au logarithme de leur masse moléculaire. L'établissement d'une courbe d'étalonnage à partir de ces standards permet de mesurer la masse moléculaire de la protéine d'intérêt après évaluation de sa mobilité relative (Rf).

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Analyse de complexes protéiques, de plusieurs protéines simultanément, des modifications post-traductionnelles des protéines (e.g. phosphorylation) Détermination de la masse moléculaire, de l'état de glycosylation des protéines Large application analytique dépendant du vaste choix d'anticorps spécifiques Mesure quantitative possible	Risque de perte de réactivité vis-à-vis des anticorps de révélation. Lors de séparations électrophorétiques en conditions dénaturantes, seuls les épitopes linéaires séquentiels persistent Conditions optimales de migration et de transfert à déterminer pour chaque type de protéines à analyser Risque de réactivité non spécifique des anticorps secondaires en technique de révélation indirecte Durée technique beaucoup plus longue qu'un ELISA et moins standardisable

<sup>4</sup> La masse moléculaire (MM) ou poids moléculaire (PM), pour *Molecular Weight* (MW), est ici mesurée de façon relative par rapport à la migration des peptides dans le gel (*Mr*, *relative molecular mass*).

## Exemples d'applications

- En recherche : cette technologie est utile pour évaluer l'expression d'une protéine d'intérêt et permet également l'analyse de l'état de sa phosphorylation ou de sa glycosylation. Des interactions entre protéines et l'analyse de produits de co-immunoprécipitation reposent aussi sur ce principe.
- En clinique : la confirmation d'un diagnostic sérologique positif d'infection par le VIH nécessite un western-blot. La détection d'auto-anticorps est fréquemment effectuée en immunodot (auto-antigènes fixés sur les membranes).

## Immuno-fixation

La technique d'immuno-fixation permet la détection d'antigènes par la formation de complexes immuns entre un antisérum polyclonal spécifique et son antigène cible. C'est une technique qualitative de précipitation en milieu gélifié. Après migration des antigènes dans un gel (le plus souvent d'agarose), des antisérums polyclonaux spécifiques sont déposés sur le gel conduisant à la formation de complexes immuns qui précipitent *in situ*. Ils sont révélés par ajout d'un colorant des protéines.

### Méthodologie

La technique d'immuno-fixation se déroule en plusieurs étapes. La première étape consiste à déposer l'échantillon à analyser dans les puits d'un gel d'agarose et à y faire migrer les protéines sous l'effet d'un champ électrique. La mobilité des protéines est fonction de leur charge globale et dans une moindre mesure de leur taille. À l'issue de la migration, un antisérum polyclonal dirigé contre les antigènes protéiques à caractériser est appliqué sur le gel. Les anticorps diffusent dans le gel et entraînent la formation de complexes immuns précipitant avec les protéines reconnues. Ces complexes immuns sont retenus dans le gel après lavage pour éliminer les protéines non fixées ou non précipitées et leur fixation est assurée par un tampon acide. Les bandes de précipité sont révélées par un colorant des protéines, tel que l'amidoschwarz ou le violet acide. Au chapitre 9, la figure 9.2 illustre cette méthode.

## Recommandations de mise en œuvre

Pour une formation optimale de complexes immuns et éviter les effets de zone (excès d'antigène empêchant la visualisation correcte des bandes), il est recommandé de diluer les échantillons à tester à une concentration protéique finale de 1 g/L.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Technique fiable, de mise en œuvre aisée (automatisation partielle) Spécificité importante, tend à remplacer l'immuno-électrophorèse sur gel	Risque de phénomène de zone en cas d'excès d'antigène Technique relativement longue (2 à 3 h)

## Exemples d'applications

- En recherche : cette technique, potentiellement applicable à la détection de fragments antigéniques de protéines dans les milieux biologiques, est en fait d'usage très limité.
- En clinique : cette technique est largement utilisée pour la détection et le typage des dysglobulinémies (myélome multiple, maladie de Waldenström) par immuno-fixation des immunoglobulines sériques.

## Puces à protéines/protein arrays

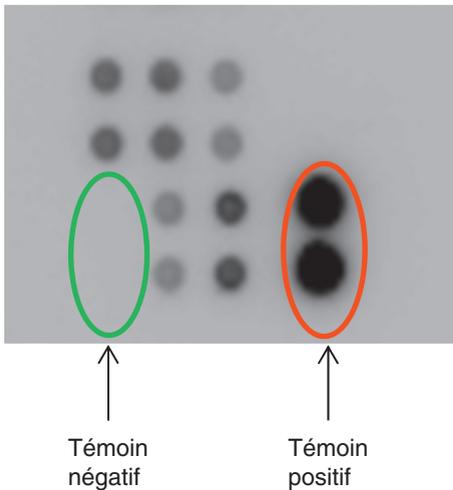
Les puces à protéines ou biopuces correspondent à l'assemblage organisé de quelques dizaines à quelques centaines de peptides ou d'anticorps sur une surface miniaturisée, de quelques centimètres carrés en général. Dans sa version la plus courante, une puce à protéines est utilisée pour détecter et quantifier les ligands de ces protéines dans un échantillon biologique. Les applications médicales en développement de cette technologie concernent le diagnostic et le suivi de maladies auto-immunes, allergiques, infectieuses et malignes. En recherche fondamentale, les puces à protéines permettent l'identification de spectres d'activité enzymatique, d'épitopes et d'inhibiteurs biologiques. Les deux intérêts majeurs des puces à protéines sont :

- l'obtention simultanée d'un grand nombre de données biologiques pour un échantillon donné;
- le faible volume d'échantillon et d'analyte nécessaire.

Chaque peptide testé correspond à un paramètre distinct, d'où le nom de technique de biopuces ou multiplex, à ne pas confondre avec les multiplexes sur billes. Lorsque le support est recouvert d'anticorps on parle de puce à anticorps ou *antibody array* (fig. 4.6).

### Méthodologie

Le support le plus courant est le verre. Les peptides sont généralement produits individuellement et immobilisés secondairement par une suite d'étapes chimiques de fonctionnalisation de la surface de verre, pulvérisation et séchage des peptides aux emplacements attribués et formation de liaisons covalentes entre le peptide et le support. Une méthodologie alternative consiste à synthétiser les molécules d'intérêt directement sur le support. D'autres types de supports existent comme les gels de polyéthylène glycol, des surfaces recouvertes d'or ou des membranes de nitrocellulose.



**Fig. 4.6** Exemple de puce à anticorps détectant des phosphoprotéines.

Les témoins positif et négatif indiquent le bon fonctionnement de la technique. Chaque couple de spots correspond à une phosphoprotéine particulière, contenue dans l'échantillon testé et reconnue par les anticorps de la membrane.

L'échantillon (*e.g.* sérum, urine, surnageant de culture) est déposé à la surface de la biopuce. Après incubation et lavage, la présence dans l'échantillon de ligands pour les protéines de la puce est révélée par des anticorps spécifiques liés à un traceur (*e.g.* enzymes, fluorogènes). Il existe également des méthodes de détection sans traceur, associées à des logiciels de biomathématique, basées sur la mesure de l'impédance optique ou la spectrométrie de masse.

### Recommandations de mise en œuvre

Les conditions techniques doivent tenir compte de la stabilité des ligands de la puce. En immunologie médicale, le sérum destiné à rechercher des immunoglobulines avec une méthode de biopuce doit être conservé à + 4 °C pendant 48 h ou congelé au-delà.

Chaque peptide présent sur la puce est généralement fixé en duplicat ou en triplicat. Le signal de chaque spot est analysé séparément, accepté ou rejeté. Le résultat de chaque peptide correspond à la moyenne des résultats du duplicat ou du triplicat. L'intensité de fixation des ligands est mesurée de manière semi-quantitative, ou quantitative si une courbe de calibration est disponible pour l'analyte considéré. Compte tenu du nombre important de peptides analysés simultanément et de l'intérêt de décrire un profil de réponse, l'intensité mesurée est souvent visualisée par un code couleur. Dans certains cas, des algorithmes prenant en compte les réponses à plusieurs marqueurs peuvent être développés. Pour chaque support, il faut réaliser des contrôles négatifs et positifs.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Quantité d'échantillon biologique de 50 $\mu$ L à 10 mL	Mise au point et interprétations nécessitant une expertise importante
Rapidité d'obtention des résultats	Panel de peptides fixe et captif du fabricant
Tests multiplex rendant compte de la complexité des systèmes étudiés	Sensibilité et spécificité à définir
Adaptables à de nombreux domaines	Appareillage spécifique en fluorimétrie

## Exemples d'applications

- En recherche : de nombreuses puces existent pour la détection de cytokines, de chimiokines, des profils de phosphorylation, des voies de transduction ou encore de l'apoptose.
- En clinique : des puces commerciales à allergènes permettent de rechercher des IgE spécifiques de 112 allergènes (111 protéines purifiées ou recombinantes et 1 oligosaccharide) et sont utilisées principalement chez des patients polysensibilisés pour déterminer un profil de sensibilisation associé à la production d'IgE dirigées contre un ensemble d'allergènes. Des puces à allergènes ciblées peuvent être employées selon le contexte clinique : allergie au lait, anaphylaxie d'effort aux protéines du blé. Il existe des puces à auto-antigènes pour le lupus érythémateux systémique, permettant de détecter des profils de fixation des auto-anticorps ou du complément, et également une puce pour la détection des toxines botuliques.

## Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technologie permettant une mesure individuelle des caractéristiques physiques et/ou biologiques de particules, le plus souvent des cellules, en suspension dans un flux liquide qui assure leur alignement avant de passer devant une ou plusieurs sources lumineuses de type laser. Les signaux optiques, diffraction de lumière et fluorescence, mesurés lors de ce passage permettent une évaluation simultanée des différentes caractéristiques de chaque cellule. L'analyse s'effectue cellule par cellule et l'échantillon initial doit donc être une suspension dans laquelle les cellules sont dissociées. Cette technologie fait appel à de nombreux concepts et a bénéficié des progrès réalisés dans la mécanique des fluides, la quantification des signaux optiques, la technologie des lasers et le développement de l'informatique. Les cytomètres en flux sont devenus des outils performants et fiables. Ce développement se poursuit grâce à la disponibilité accrue de réactifs comme les anticorps monoclonaux et de nouveaux fluo-

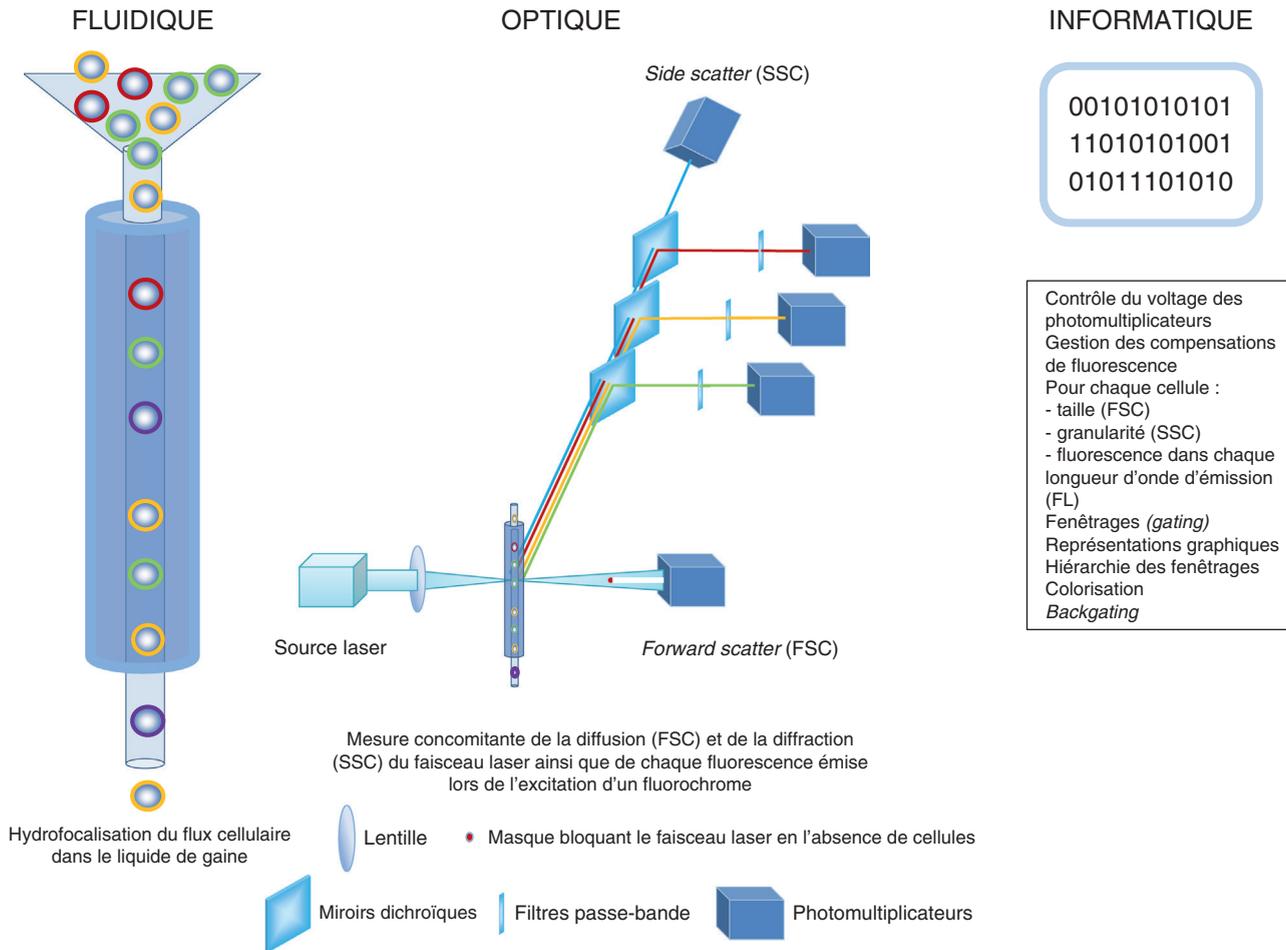
rochromes, à la simplification des techniques de préparation des échantillons cellulaires et à la sophistication des logiciels d'analyse.

Le cytomètre en flux est composé d'un système fluide, d'un banc optique associé à des circuits électroniques de recueil des signaux et d'une informatique d'acquisition et d'analyse des données (fig. 4.7).

## Méthodologie

Le système fluide d'un cytomètre en flux assure au moyen d'une buse le transport et l'alignement des cellules avant leur entrée dans la chambre d'analyse et leur passage devant la source lumineuse. Son principe repose sur la focalisation hydrodynamique de l'échantillon. La suspension cellulaire est injectée dans l'axe d'une veine liquide (liquide de gaine ou *sheath*). Le débit du liquide de gaine est constant, et la vitesse du flux augmente en entraînant passivement les cellules. Avec un diamètre de buse adapté et une concentration appropriée de la suspension cellulaire, les cellules défilent devant le faisceau laser les unes après les autres très rapidement (jusqu'à plusieurs dizaines de milliers de cellules par seconde) en vue de leur analyse individuelle. En fin de parcours, la suspension cellulaire est évacuée vers un flacon de collection des déchets. Elle peut aussi, dans les cytomètres possédant une fonction de trieur, être séparée de façon à recueillir des fractions définies sur leurs paramètres cytométriques.

Le nombre de cellules nécessaire pour réaliser une analyse dépend principalement de la fréquence de la population d'intérêt dans l'échantillon, mais aussi de la disponibilité du matériel biologique et du résultat attendu. Plus le nombre de cellules analysées est élevé, plus la probabilité de mesurer avec précision des sous-populations d'intérêt augmente (tables de Rümke). Un des intérêts de la cytométrie en flux est de permettre l'analyse rapide de populations de milliers d'événements. Les méthodes les plus sensibles utilisées couramment pour rechercher des populations rares permettent, en analysant entre  $10^5$  et  $10^6$  cellules, d'atteindre une sensibilité fiable de  $10^{-5}$ , c'est-à-dire de détecter un événement sur 100 000 ou dix sur un million.



**Fig. 4.7** Principaux composants d'un cytomètre en flux.

Si les cellules à étudier sont adhérentes à un support ou constituent un tissu, il est indispensable de les détacher de leur support par traitement mécanique (grattage), chimique (EDTA) ou enzymatique (trypsine), ou de dissocier le tissu (par dilacération mécanique ou par la trypsine ou la collagénase). Ces traitements peuvent plus ou moins endommager la surface cellulaire.

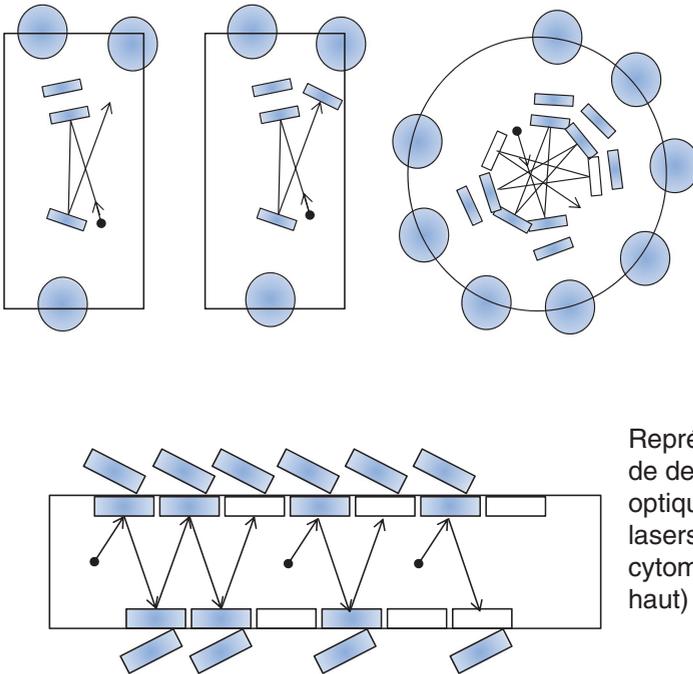
Le système optique est composé de la source lumineuse, d'un système de filtres et de miroirs conduisant la lumière émise et diffractée individuellement par chaque cellule vers des photomultiplicateurs transformant les signaux lumineux en signaux électriques. Dans la chambre d'analyse, la veine fluïdique est traversée par le faisceau lumineux d'un ou plusieurs lasers.

Dans tous les cas, la lumière incidente est diffusée en fonction de la morphologie et de la structure de chaque cellule. La lumière diffusée dans l'axe de la lumière incidente (*forward scatter* ou

FSC) est proportionnelle à la taille de la cellule. La lumière mesurée perpendiculairement à l'axe de la lumière incidente (*side scatter* ou SSC) dépend de la structure (granularité, rapport nucléocytoplasmique) de la cellule.

Après excitation par le faisceau laser, indépendamment de cette diffraction, les cellules émettent une fluorescence naturelle (autofluorescence) et surtout un signal correspondant à leur marquage éventuel par un fluorochrome. Les lasers argon qui ont une longueur d'onde d'émission de 488 nm sont fréquemment installés sur les cytomètres. Aux instruments reposant sur la longueur d'onde d'excitation d'un seul laser (argon le plus souvent) ont succédé des cytomètres disposant de deux ou trois lasers, voire plus. Ceci a permis d'élargir la gamme des fluorochromes utilisables, excitables à des longueurs d'onde différentes et a conduit au développement de solutions innovantes pour les bancs optiques (fig. 4.8).

L'autofluorescence des cellules sert à régler le voltage des photomultiplicateurs qui recueillent



Représentation schématique de deux systèmes de bancs optiques de cytomètres à trois lasers (●→) pour de la cytométrie en huit couleurs (en haut) ou dix couleurs (en bas)

**Fig. 4.8** Schémas simplifiés des solutions développées par les industriels de la cytométrie en flux pour gérer le recueil des fluorescences.

ensuite les signaux émis par les cellules marquées. Idéalement, plus de 90 % des cellules non marquées doivent pouvoir être détectées, au plus près du premier canal de mesure de la lumière émise, pour chaque longueur d'onde mesurable par l'instrument utilisé, donc selon toutes les sources d'excitation disponibles.

Les signaux lumineux émis par les cellules fluorescentes sont focalisés et séparés en fonction de leur direction et de leur longueur d'onde, au moyen de miroirs dichroïques et de filtres, pour être acheminés vers des photodétecteurs (photomultiplicateurs ou PMT) qui transforment les signaux lumineux en signaux électriques et les amplifient. Chaque photodétecteur est désigné par un code (*e.g.* FL1, FL2) correspondant à un intervalle de longueur d'onde précis. Les miroirs dichroïques réfléchissent sélectivement une partie de la lumière qu'ils reçoivent. Ainsi, un miroir dichroïque 488 réfléchit les lumières de longueur d'onde inférieure ou égale à 488 nm et transmet les émissions de longueur d'onde supérieure vers les miroirs dichroïques suivants. Après ce tri, le signal lumineux passe dans un filtre passe-bande (*band-pass filter*). Par exemple, un filtre passe-bande 488 de 50 nm focalise la lumière dans un intervalle de longueur d'onde de  $488 \pm 25$  nm (463 à 513 nm). Différents filtres passe-bande, éventuellement interchangeables, sont utilisés en fonction du modèle de cytomètre. Les photodétecteurs transforment enfin la lumière collectée en une impulsion électrique dont l'intensité est proportionnelle à l'énergie lumineuse reçue. Ces signaux sont amplifiés avant d'être digitalisés par un convertisseur analogique/digital qui associe à l'amplitude de chaque signal un numéro de canal, dont la valeur codée en bits est utilisable par le système informatique qui stocke et traite les données.

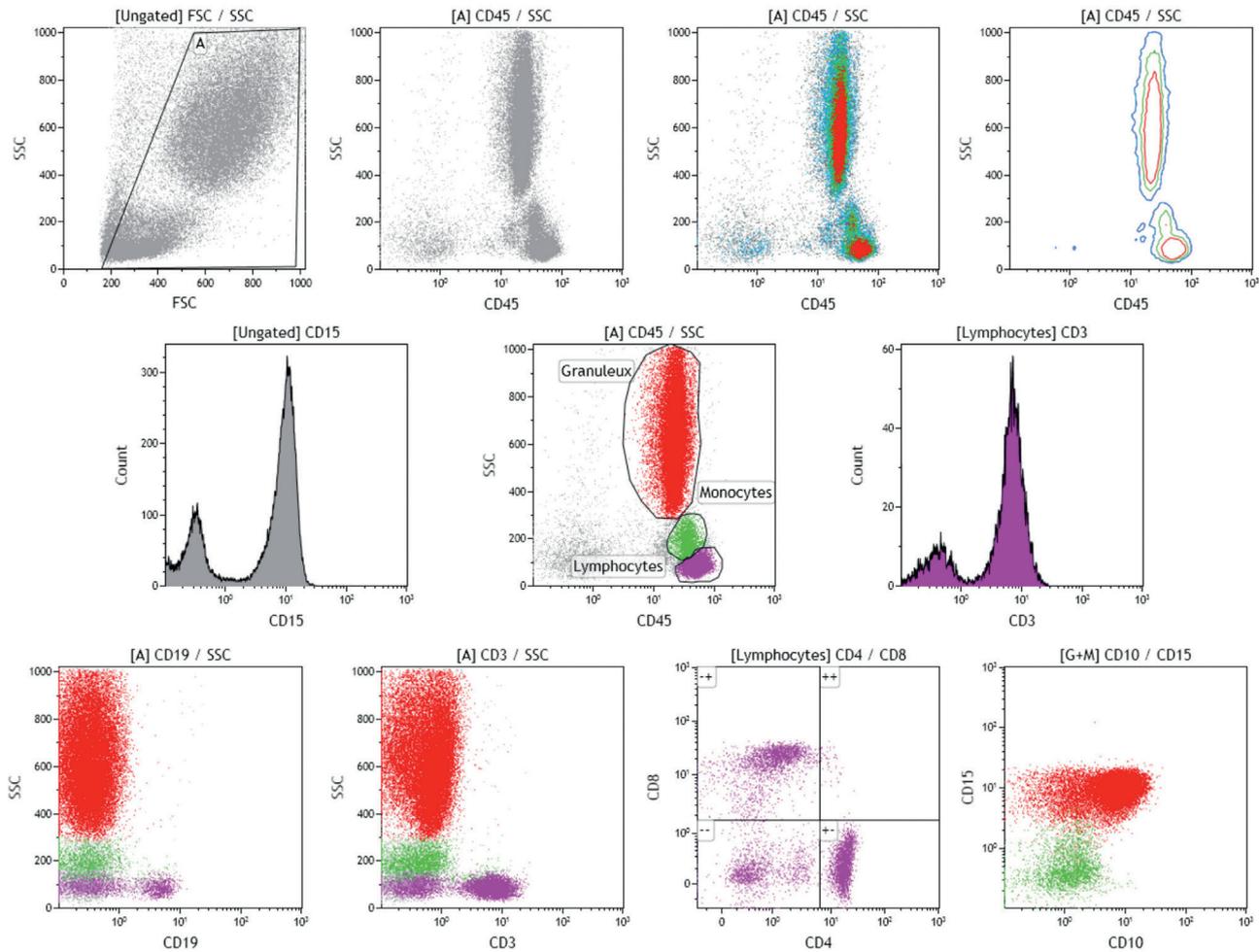
Lors de l'acquisition, les nombreux signaux reçus pour chaque événement détecté par le faisceau laser sont classés au fur et à mesure de leur apparition et participent ainsi à la constitution de graphiques de répartition des cellules (fig. 4.9). Les données reçues peuvent être présentées sous forme d'histogramme de distribution de fréquence avec en abscisse l'amplitude

du paramètre étudié (en canaux) et en ordonnée le nombre de cellules par canal. Comme chaque cellule peut émettre plusieurs signaux différents, il est possible de combiner, sur un même graphique, deux paramètres indépendants. Dans un graphique en nuage de points ou histogramme biparamétrique, chaque cellule est placée en fonction de la valeur des deux paramètres mesurés et représentée par un point. Le nombre de cellules présentant les mêmes valeurs peut être visualisé dans une troisième dimension par des courbes de niveaux ou des intensités de couleur. Pour chaque type de représentation, on peut utiliser une échelle linéaire ou logarithmique (4 à 7 décades). Il est surtout possible de conditionner l'acquisition d'un paramètre à celle d'autres paramètres au moyen, en particulier, de zones d'intérêt (fenêtres ou *gates*) définies par l'utilisateur ou par des logiciels dédiés et générées en cascade. Ainsi, au sein d'une population hétérogène, il est possible de cibler les informations provenant de plusieurs populations spécifiques. Il est également possible, pour une définition optimale multiparamétrique des composants d'une suspension cellulaire donnée, de développer des analyses mathématiques en composantes principales (ACP ou PCA)<sup>5</sup>.

### Recommandations de mise en œuvre

Le bon fonctionnement du cytomètre est vérifié chaque jour à l'aide de billes fluorescentes calibrées qui permettent de détecter des anomalies liées à l'instrument comme la baisse de puissance du faisceau laser ou une variation de son alignement. En pratique, ces anomalies sont maintenant rares et leur correction éventuelle revient au fabricant.

<sup>5</sup> Analyses mathématiques en composantes principales (ACP) ou, en anglais, *Principal Component Analysis* (PCA). L'analyse en composante principale permet de classer les paramètres d'une série de signaux recueillis au sein d'une population hétérogène en fonction de leur valeur représentative de chaque sous-population et de déterminer les critères séparant au mieux les différents sous-ensembles de la population.



**Fig. 4.9** Exemples de représentation de l'analyse de résultats de cytométrie en flux.

Ligne du haut, graphe de gauche, représentation des cellules d'un échantillon de moelle osseuse en fonction de leur taille (FSC) et de leur granularité (SSC) et dessin d'une fenêtre (A) d'élimination des débris. Les trois graphes suivants montrent les mêmes cellules (fenêtrage sur A) en fonction de l'expression de CD45 (marqueur panleucocytaire) et de leur granularité (SSC) avec trois représentations différentes : simple biparamétrique, densité cellulaire et contours.

Ligne du milieu, au centre, graphe CD45/SSC dans lequel les trois populations majoritaires sont colorisées. À gauche, représentation monoparamétrique de l'expression de CD15 sur l'ensemble des cellules (fenêtre A). À droite, représentation monoparamétrique de l'expression de CD3 sur les lymphocytes (fenêtre magenta).

Ligne du bas, expression de CD19 et CD3 en fonction de la granularité des cellules (SSC) avec le code couleur de l'histogramme central. Les marqueurs sont exprimés sur des lymphocytes (magenta). Le troisième histogramme est une représentation biparamétrique des lymphocytes (fenêtre magenta) CD4 et CD8. Les lymphocytes doublement négatifs (--) sont des lymphocytes B et des cellules NK. L'histogramme de droite montre l'expression de CD15 et CD10 sur les granuleux mais pas sur les monocytes, avec un fenêtrage booléen prenant en compte les granuleux et les monocytes (G + M).

La responsabilité du cytométriste réside plus dans la maîtrise des conditions pré-analytiques et analytiques. Les mesures de fluorescence faites par un cytomètre sont relatives et dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la température, le milieu dans lequel les cellules sont en suspension, la vitesse de passage, la combinaison des fluorochromes utilisés, la qualité et la préservation des fluorochromes.

Le choix des fluorochromes, une fois établie la sensibilité minimale des photomultiplicateurs à l'aide de cellules non marquées, doit être réalisé avec soin. Il faut tenir compte à la fois de la puissance d'émission du fluorochrome sélectionné et de l'intensité d'expression attendue pour le marqueur choisi. De plus, en raison de la superposition plus ou moins importante des spectres d'émission des fluorochromes disponibles, il est nécessaire de réaliser une compensation électronique des fuites de fluorescence d'un fluorochrome donné dans le canal d'émission d'un autre. Cette opération est devenue extrêmement complexe avec la sophistication des instruments. Des outils de réglage automatique de ces compensations sont disponibles mais ne dispensent pas d'un choix éclairé des combinaisons marqueur/fluorochrome dans les panels actuels de huit ou dix couleurs. L'effet trompette, ou de *spreading*, qui n'est pas compensable, doit également être pris en compte. D'une manière générale, pour l'étude de sous-populations cellulaires au sein d'un groupe de cellules présentant un marqueur commun, il faut éviter les fuites de la population mère vers les populations filles alors que l'inverse est plus véniel (par exemple, on peut tolérer des fuites vers CD45 mais pas de fuites depuis CD45 pour des sous-populations leucocytaires).

### Trieur de cellules (*Fluorescence Activated Cell Sorter* ou FACS)

Au-delà de sa fonction analytique, le cytomètre en flux permet le tri de sous-populations cellulaires spécifiques. La réalisation de ce tri passe par :

- la définition analytique des cellules à trier par le jeu des fenêtres en cascade isolant la population d'intérêt
- le fractionnement du jet, en aval du laser, en gouttelettes contenant chacune une cellule
- le chargement électrostatique des gouttelettes identifiées comme d'intérêt

- la déviation par un champ électrique des gouttelettes chargées et leur recueil dans un récipient différent de celui destiné au recueil des déchets.

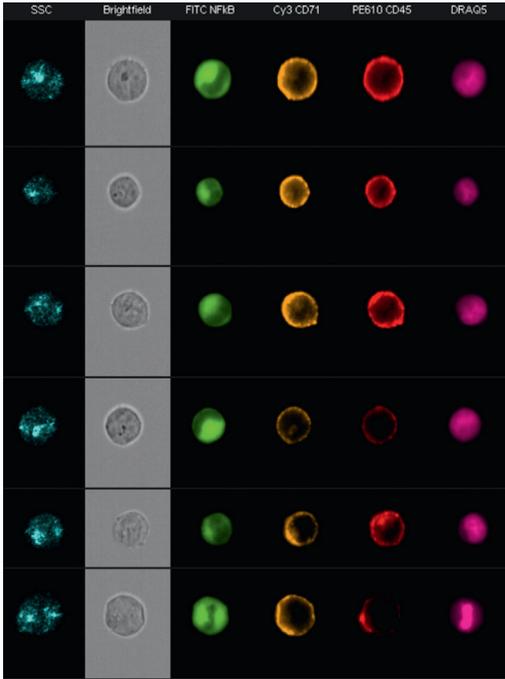
Les cellules ainsi triées peuvent faire l'objet d'analyses complémentaires morphologiques ou moléculaires. Si elles sont encore vivantes, elles peuvent également être mises en culture.

### Imageur en flux

L'inconvénient principal de la cytométrie en flux est de limiter l'analyse morphologique à deux mesures de lumière diffusée. L'utilisation du marqueur panleucocytaire CD45 a apporté une dimension supplémentaire qui ne compense cependant pas totalement l'absence d'observation directe. Les imageurs en flux de type ImageStream Amnis® combinent l'étude quantitative de la cytométrie en flux multilasers à l'étude morphologique. Les cellules (*e.g.* leucocytes, levures, micro-organismes) passent devant un objectif de microscope et des images en fluorescence sont produites pour chaque cellule par une caméra (fig. 4.10). Il est ainsi possible de visualiser directement toutes les caractéristiques de chaque cellule. La vitesse de passage et le nombre de cellules analysées sont toutefois moindres que pour un cytomètre standard, ce qui fait des deux instruments des outils complémentaires. Le puissant logiciel d'analyse associé à ces nouveaux outils permet des applications multiples en termes de morphologie, signalisation cellulaire, localisation intracellulaire (*e.g.* visualisation de translocations moléculaires ou de colocalisations) ou interactions cellulaires.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Analyses multiparamétriques	Coût d'achat et de maintenance des cytomètres Complexité des analyses multiparamétriques Mauvaise stabilité de certains fluorochromes ( <i>e.g.</i> tandems) Non-visualisation des cellules (sauf imageurs en flux)
Analyses qualitatives et quantitatives	
Rapidité d'acquisition	
Analyse d'un grand nombre de cellules	
Identification de populations rares	
Traçabilité et rémanence des données	
Isolement des cellules ( <i>i.e.</i> trieurs en flux)	
Grande variété d'applications	



Imagerie en flux

**Fig. 4.10** Exemple d'image obtenue avec l'ImageStream Amnis®.

### Exemples d'applications

- En recherche : la cytométrie en flux est un outil indispensable à une grande partie des travaux expérimentaux chez l'animal ou avec des lignées cellulaires. D'autres développements intéressent le champ de la microbiologie ou l'océanographie.
- En clinique :
  - la cytométrie en flux est utilisée régulièrement en immunologie et en hématologie pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique de différentes affections. Ces applications peuvent concerner :
    - l'identification (immunophénotypage) des populations et sous-populations cellulaires en fonction de leurs marqueurs de différenciation (*e.g.* évaluation des sous-populations lymphocytaires sanguines, diagnostic des hémopathies),
    - des études fonctionnelles évaluant notamment la prolifération, la cytotoxicité, la production de cytokines, l'apoptose, la dégranulation des basophiles, la phagocytose ;

- la cytométrie en flux offre également une méthodologie rapide et simple à mettre en œuvre pour l'analyse du cycle cellulaire par la mesure de la fluorescence émise par l'ADN marqué par exemple par de l'iodure de propidium, proportionnelle au contenu en ADN de chaque cellule. Ceci permet de suivre, par comparaison avec des cellules normales, la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle G0/G1–S–G2 avec respectivement 1N, entre 1 et 2N, et 2N de chromatine. Cette méthode permet aussi de détecter des cellules présentant un contenu anormal en ADN : par exemple, hypoploïdie (signal 1N trop bas), hyperploïdie (signal 1N trop haut), apoptose (pic sub-G1). De nombreuses études de pharmacologie font ainsi appel à la cytométrie en flux pour l'étude de drogues antimitotiques ou impliquées dans la prolifération cellulaire.

## Marquages cellulaires et tissulaires, immunocytologie et immunohistologie

Les techniques d'immunofluorescence tissulaire ou d'immunohistochimie sont utilisées pour détecter, localiser, voire estimer le niveau d'expression de protéines d'intérêt sur un matériel cytotologique ou des coupes tissulaires. Cette technique se décompose en trois étapes principales qui sont (i) la préparation de l'échantillon contenant l'antigène à étudier, (ii) l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'antigène recherché et (iii) l'apport d'un système révélateur pour visualiser l'immunoréaction.

### Méthodologie

Les tissus sont analysés après fixation chimique, inclusion et coupe en paraffine, ou après congélation et coupe au cryostat.

La fixation avec inclusion en paraffine ou la congélation préviennent de toute dégradation secondaire à une prolifération bactérienne ou à l'action des enzymes libérées lors de la mort cellulaire, et confèrent au tissu une rigidité indispensable à sa découpe.

Le fixateur chimique le plus utilisé est le formaldéhyde. Ce produit réalise des pontages intermoléculaires qui préservent bien la morphologie cellulaire et tissulaire. Cependant, il induit une importante dénaturation des antigènes dont les épitopes peuvent être altérés. L'éthanol et l'acétone sont des fixateurs précipitants qui préservent mieux l'antigénicité des protéines mais qui ont un effet dénaturant sur la morphologie cellulaire et tissulaire.

L'inclusion d'un tissu dans la paraffine ou dans une résine génère des variations thermiques qui peuvent également être délétères pour certains épitopes.

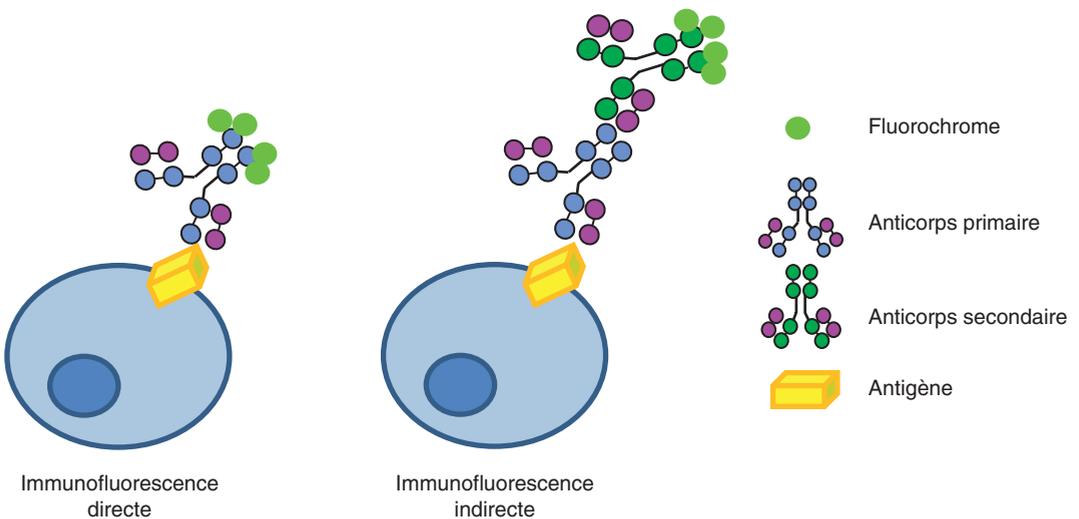
La fixation en congélation est obtenue par l'immersion du tissu dans un liquide refroidissant (isopentane à  $-130^{\circ}\text{C}$ ) ou directement dans l'azote liquide (*snap-freezing*,  $-196^{\circ}\text{C}$ ) puis son maintien en vapeur d'azote liquide ou au moins à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Avant la coupe, le tissu congelé est enrobé dans une substance protectrice (cryoprotecteur OCT) qui se solidifie rapidement au froid et permet de constituer un bloc plus facile à manipuler au cryomicrotome. Le maintien de l'intégrité des antigènes est préservé dans les tissus congelés car les protéines se trouvent dans un état structural moins dénaturé. Cependant, la préservation de la morphologie du tissu est moins bonne qu'avec un fixateur chimique.

Les blocs inclus en paraffine sont découpés avec un microtome en coupes d'une épaisseur de 4 à 5  $\mu\text{m}$ . Un cryomicrotome (ou cryostat) permet de réaliser des coupes de tissus congelés à une température de  $-30$  à  $-20^{\circ}\text{C}$ , d'une épaisseur de 5 à 10  $\mu\text{m}$ .

Pour les tissus fixés, un démasquage antigénique est nécessaire pour rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur, modifier la configuration spatiale des épitopes et améliorer leur accessibilité aux anticorps. Ce démasquage peut être enzymatique, avec de la pronase (0,1 % à  $37^{\circ}\text{C}$ ) ou physique par chauffage au micro-ondes ou en autocuiseur en tampon citrate ou EDTA.

Des anticorps monoclonaux ou polyclonaux peuvent être utilisés pour rechercher l'expression de la protéine d'intérêt dans le tissu. Les anticorps monoclonaux sont plus sensibles à la qualité de la fixation en raison de leur spécificité plus étroite. Les anticorps polyclonaux de spécificité plus large ont l'avantage de reconnaître différents épitopes de l'antigène. Leur avidité et leur spécificité sont variables suivant les lots.

Pour révéler la fixation de l'anticorps au tissu, une méthode directe ou indirecte peut être employée. La méthode directe utilise directement des anticorps marqués (ou conjugués), appelés anticorps de révélation. Cette technique est simple et rapide, de localisation précise mais de sensibilité médiocre (fig. 4.11).



**Fig. 4.11** Principe d'un marquage immunocytologique par immunofluorescence directe ou indirecte.

La méthode indirecte utilise un anticorps primaire non marqué spécifique de l'antigène, dont sa fixation est révélée par un anticorps secondaire marqué. Cette méthode est privilégiée lorsque le niveau d'expression de l'antigène à analyser est faible. Une amplification supplémentaire du signal initial peut être obtenue par l'utilisation d'un système streptavidine–biotine ou avidine–biotine (*e.g.* ABC) décrit dans le chapitre sur les traceurs enzymatiques. Il est également possible de réticuler un anticorps tertiaire marqué par la protéine A ou la protéine G.

Les traceurs fluorescents tels que l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou la phycoérythrine (PE) sont surtout utilisés sur coupes congelées. Ils confèrent une grande sensibilité à la technique et permettent des analyses confocales, autorisant l'examen de colocalisations cellulaires. Ils nécessitent un montage en milieu aqueux labile et la lumière émise disparaît au cours du temps.

Les traceurs enzymatiques, tels que la peroxydase de raifort (HRP) associée pour chromogène à la diaminobenzidine (DAB), donnent une coloration stable brune. La phosphatase alcaline est également utilisée avec le chromogène *Fast blue* pour une coloration bleue ou avec le *Fast red* pour une coloration rouge. Ces traceurs permettent une visualisation en microscopie optique. Les marquages sont stables, des doubles marquages peuvent être réalisés sans pour autant permettre de visualiser de colocalisation. La précision du marquage est moyenne en raison d'une diffusion du précipité.

### Recommandations de mise en œuvre

Il est nécessaire de s'assurer de la spécificité du marquage et de l'absence de bruit de fond. Des marquages non immuns peuvent se produire, secondaires à des interactions ioniques, hydrophiles ou hydrophobes entre l'anticorps et des protéines du tissu ou encore secondaires à une activité biotine endogène du tissu ou une mauvaise inhibition des peroxydases endogènes tissulaires. Des marquages immuns non spécifiques peuvent être la conséquence de réactions croisées.

Une étape de mise au point est nécessaire pour déterminer les conditions d'un marquage optimal : conditions de démasquage, concentration des anticorps primaire et secondaire, concentration des chromogènes, temps de révélation.

Il faut souligner qu'un anticorps performant en western-blot n'est pas nécessairement adapté à l'immunohistochimie. Les fournisseurs d'anticorps précisent généralement si l'anticorps a été testé sur coupes de tissus congelés ou inclus en paraffine.

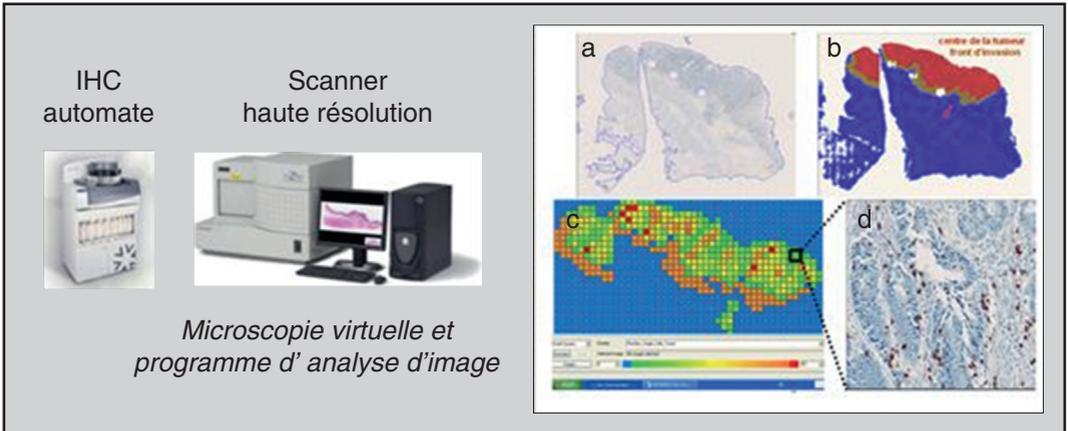
Des contrôles négatifs et positifs doivent être réalisés. Les contrôles négatifs peuvent être (i) un immunomarquage sans incubation avec l'anticorps primaire, (ii) une incubation avec un anticorps de même isotype à la même concentration que l'anticorps primaire, dirigé contre un antigène absent du tissu, (iii) une incubation de l'anticorps sur un tissu ne renfermant pas l'antigène ou (iv) une incubation avec l'anticorps primaire spécifique préalablement saturé par l'antigène purifié.

Les contrôles positifs sont réalisés en utilisant des témoins externes et internes.

L'analyse de l'immunomarquage est le plus souvent qualitative et tente de définir quelles cellules sont positives et quelle est la localisation cellulaire du marquage (membranaire, cytoplasmique ou nucléaire). Une analyse visuelle semi-quantitative peut être réalisée en prenant en compte le comptage des structures ou cellules immunomarquées par unité de surface ou champ microscopique.

Des outils spécifiques ont été développés pour permettre une analyse quantitative des immunomarquages. La première étape consiste le plus souvent en une numérisation de l'immunomarquage par un scanner haute résolution. Une analyse quantifiée de l'immunomarquage est ensuite réalisée par un programme d'analyse d'image dédié.

Un exemple récent d'utilisation des immunomarquages à des fins pronostiques en pathologie tumorale colorectale est fourni dans la [figure 4.12](#). Un score immunitaire basé sur la quantification des populations immunitaires CD3 et CD8 respectivement dans la tumeur et au niveau du front d'invasion est calculé. Ce score immunitaire améliore la prédiction de récurrence des patients.



**Fig. 4.12** Exemple d'immunomarquage de tumeur colorectale pour le calcul informatisé du score immunitaire prédictif.

a. Détection automatique du tissu.

b. Identification de la région tumorale et du front d'invasion.

c. Quantification des populations immunomarquées (CD8<sup>+</sup>) et représentation des résultats selon une cartographie de densité.

d. Illustration de la détection des cellules immunomarquées CD8<sup>+</sup>.

## Puce tissulaire (Tissue MicroArray)

La technique des puces tissulaires ou *Tissue MicroArrays* (TMA) est une technologie à haut débit permettant d'obtenir des profils d'expression de protéines d'intérêt par immunohistochimie ou hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) à partir de tissus fixés inclus en paraffine. Des carottes de tissus sont prélevées au moyen d'un carotteur tissulaire (*tissue arrayer* ou *microarrayer*) dans des zones sélectionnées du bloc tissulaire donneur, puis sont incluses selon un plan préétabli dans un bloc receveur. Une puce tissulaire peut réunir d'une centaine à un millier de carottes tissulaires dans un seul bloc. Ainsi, une seule coupe histologique d'une puce tissulaire permet d'analyser simultanément plusieurs centaines d'échantillons tissulaires formant des spots. Cette analyse assure une grande homogénéité de la technique sur l'ensemble des spots analysés et constitue une économie de temps, de réactifs et de matériel biologique.

Les techniques des puces tissulaires permettent de constituer des archives de tissus tumoraux. Une fois le bloc constitué, l'expression de protéines d'intérêt sur une large cohorte de patients peut

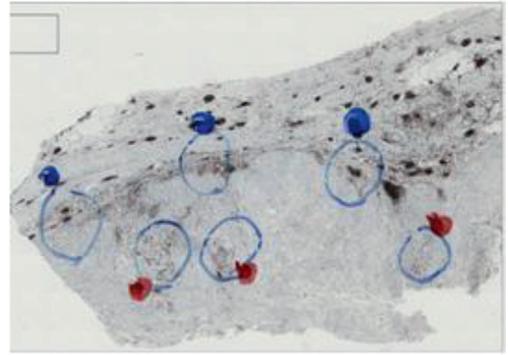
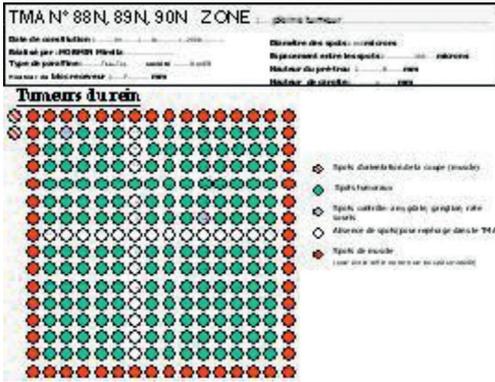
être évaluée de manière extrêmement rapide sur un grand nombre d'échantillons.

### Méthodologie

#### Différentes étapes d'une puce tissulaire

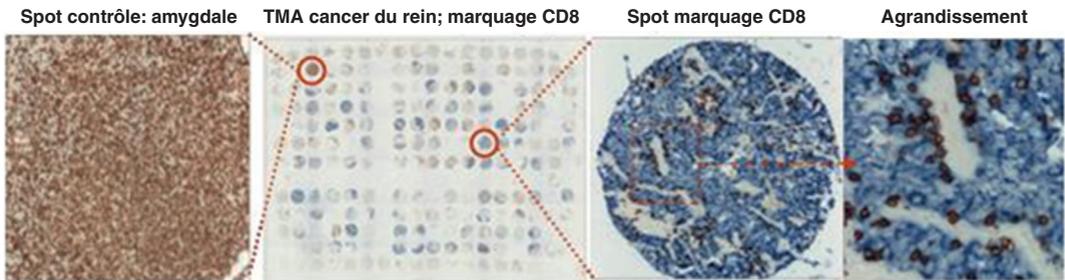
##### Construction de la puce

Pour la construction de la puce tissulaire (bloc TMA), un plan de fabrication est tout d'abord défini. Une carte de la puce est élaborée, décrivant les échantillons à positionner dans chaque emplacement de la matrice lignes/colonnes du bloc. La zone tissulaire prélevée sur le bloc donneur est sélectionnée d'après l'examen microscopique de la coupe histologique colorée à étudier (fig. 4.13). Selon les instructions du plan de fabrication, chaque carotte de tissu de 0,6 à 2 mm de diamètre est prélevée dans le bloc donneur à l'aide du carotteur tissulaire. Un trou correspondant, de même diamètre, est préparé dans le bloc receveur. La carotte tissulaire est alors incluse à son emplacement dans le bloc TMA. Pour éviter des variations de hauteur des carottes qui pourraient provoquer des pertes de spots lors de la coupe, la totalité du trou receveur doit être remplie au besoin par plusieurs fragments du même tissu. La réalisation de blocs contenant des centaines de carottes tissulaires est une tâche



**Fig. 4.13** Schéma de construction de la puce tissulaire.

Partie gauche, plan de bloc TMA du centre de la tumeur. Partie droite, sélection sur les coupes histologiques des régions à transférer sur la puce.



**Fig. 4.14** Lame de puce tissulaire immunomarquée par un anticorps anti-CD8.

Partie gauche : amygdale (spot contrôle positif); centre, vue générale de la puce tissulaire; partie droite, spot de tumeur du rein et son agrandissement (*spot assay*).

longue et minutieuse nécessitant au préalable de disposer d'une large gamme d'échantillons.

Des cultures cellulaires peuvent également faire l'objet d'inclusions en blocs spécifiques en utilisant des culots fixés.

### Réalisation des coupes

Le bloc receveur est ensuite coupé par un microtome standard afin d'obtenir des puces (ou bio-puces) tissulaires. Chaque coupe de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est placée sur une lame de verre. Ce transfert est délicat, avec une perte estimée entre 10 et 30 % des spots.

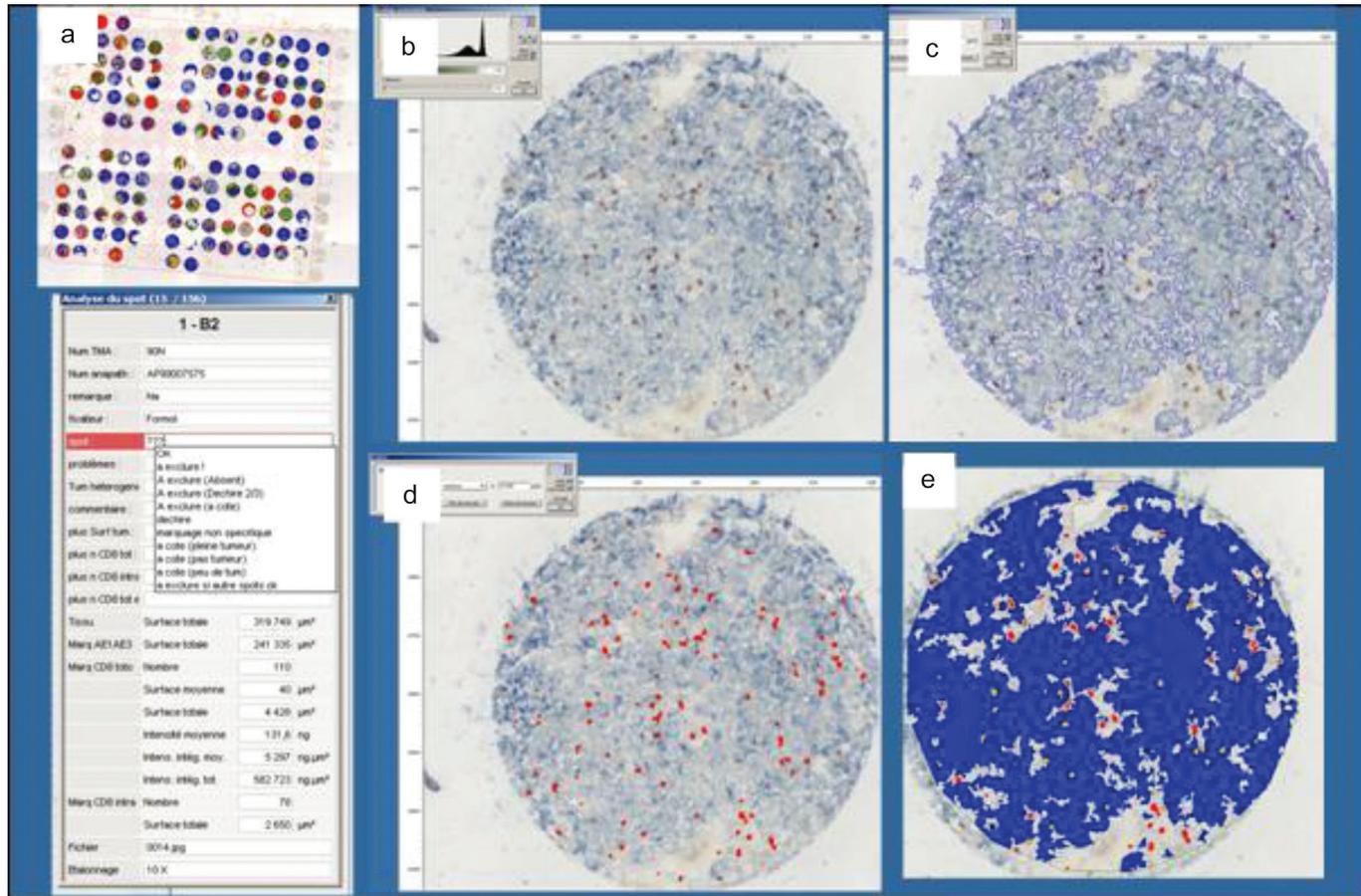
### Immunomarquages

Les puces tissulaires sont immunomarquées comme des coupes tissulaires standard, à l'aide d'un automate dédié ou selon une technique

manuelle. Le résultat d'un immunomarquage est représenté sur la [figure 4.14](#).

### Recommandations de mise en œuvre

Le bloc donneur doit avoir une épaisseur minimum de 3 à 4 mm afin d'éviter des variations de hauteur des carottes. Pour compenser les effets de bord observés en périphérie lors des immunomarquages, des carottes de tissus normaux doivent être disposées en périphérie de la puce tissulaire. Le plan de construction de la puce doit être minutieusement défini. Une orientation du bloc TMA par des repères d'architecture ou des carottes tissulaires témoins est nécessaire afin d'éviter des erreurs d'identification des spots. Enfin, des programmes d'analyse d'image dédiés à la quantification des immunomarquages sur puce tissulaire sont disponibles pour faciliter la lecture de chaque spot ([fig. 4.15](#)).



**Fig. 4.15** Exemple d'analyse d'image d'un immunomarquage sur puce tissulaire.

a. Quantification par analyse d'image d'une coupe de TMA de cancer de rein immunomarquée avec un anticorps anti-CD8.

b. Spot témoin bruit de fond.

c. Détection de la tumeur.

d. Spot essai immunomarqué par des anticorps anti-CD8.

e. Spot analysé : tumeur en bleu, lymphocytes péri-tumoraux en rouge, lymphocytes intratumoraux en jaune.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Détection et visualisation de la localisation histologique des antigènes et des structures associées	Problème de représentativité des échantillons en TMA
Visualisation des interactions cellulaires	Dégradation de certains épitopes par les techniques de fixation
Analyses tissulaires à haut débit (i.e. TMA)	Techniques longues et délicates
Données histologiques archivables	Reproductibilité variable
	Méthode semi-quantitative

## Exemples d'applications

- En recherche : l'immunofluorescence tissulaire est particulièrement utilisée pour la localisation précise des infiltrats immunitaires dans les tissus inflammatoires des modèles animaux pathologiques.
- En clinique : la recherche d'auto-anticorps spécifiques de maladies auto-immunes dans les tissus, ainsi que l'étude des infiltrats immunitaires dans les tumeurs, font généralement appel à la technique d'immunohistochimie. L'utilisation du principe de TMA permet des analyses à haut débit d'échantillons tissulaires.

## ELISpot

La technique ELISpot (*enzyme-linked immunospot*) permet de détecter individuellement des cellules produisant une protéine sécrétée spécifiquement (*e.g.* cytokine, granzyme, immunoglobuline). La protéine sécrétée par la cellule est captée par un anticorps fixé préalablement sur une membrane de Nylon ou de nitrocellulose dans le fond de puits de culture où sont placées les cellules, additionnées éventuellement de stimuli adéquats (*e.g.* mitogènes, antigènes). La présence de la protéine sécrétée est révélée, après élimination des cellules, par un deuxième anticorps couplé à une enzyme et la formation d'un produit chromogène. Chaque point (ou spot) représente l'empreinte d'une cellule productrice de la protéine d'intérêt. Le nombre de cellules ayant produit un spot coloré est déterminé à l'aide d'une

loupe ou d'un microscope, éventuellement relié à un système informatique.

## Méthodologie

L'exemple décrit ici est celui le plus couramment utilisé détectant la sécrétion de cytokines par des lymphocytes T spécifiques (fig. 4.16).

La technique ELISpot est réalisée dans des plaques de culture de 96 puits dont le fond est constitué d'une membrane de Nylon ou de nitrocellulose. La membrane est préalablement recouverte par un anticorps dit de capture reconnaissant la cytokine d'intérêt pendant au moins 18 heures à 4 °C. Après cette étape de sensibilisation de la membrane du fond des puits, la suspension cellulaire ajustée à 1.10<sup>6</sup> cellules/mL en milieu de culture approprié est mise en présence des antigènes d'intérêt (*e.g.* peptides viraux, tumoraux ou bactériens). La présence de cellules dendritiques, de monocytes et/ou de lymphocytes B assure la présentation de ces antigènes aux cellules T spécifiques, leur activation et l'induction de la sécrétion de cytokines. Les antigènes utilisés sont des peptides synthétiques (de huit à dix acides aminés correspondant à des peptides optimaux présentés par des molécules du CMH ou de 15 acides aminés recouvrant toute une protéine d'intérêt), des protéines entières ou des virus recombinants. Un puits contrôle négatif (cellules seules) et un puits contrôle positif (cellules stimulées par un mitogène, le plus souvent la phytohémagglutinine ou PHA) sont réalisés en parallèle. Chaque condition de stimulation est appliquée en duplicat ou triplicat.

Les plaques sont incubées à l'étuve à 37 °C pendant 6 à 20 heures. Les cellules T spécifiques de l'antigène testé sécrètent la cytokine qui est fixée localement par l'anticorps de capture. Après des étapes de lavage visant à éliminer les cellules, les plaques sont incubées à 37 °C pendant 4 heures avec un deuxième anticorps biotinylé dit de révélation, reconnaissant un épitope de la cytokine mais différent de celui reconnu par l'anticorps de capture. La révélation fait intervenir la streptavidine couplée à une enzyme (le plus souvent la phosphatase alcaline). Après de nouveaux lavages, les plaques sont ensuite incubées entre 10 et

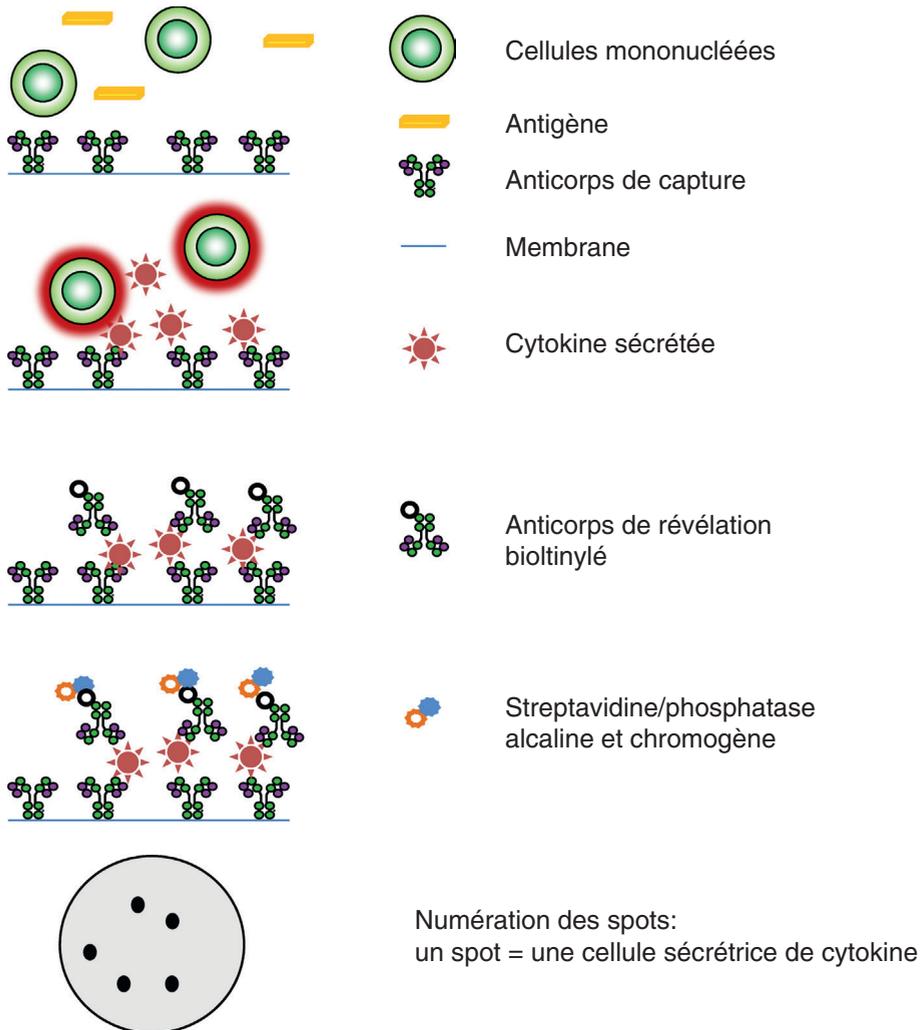


Fig. 4.16 Étapes d'une technique ELISpot cytokine.

15 minutes avec un substrat de l'enzyme (*e.g.* BCIP/NBT, 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate et chlorure de nitro-bleu de tétrazolium) qui, catabolisé par l'enzyme, se colore, précipite et identifie les zones de production de la cytokine. La réaction colorimétrique est arrêtée par de l'eau distillée. Après séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière, les points colorés (spots) qui apparaissent sur la membrane correspondent aux cellules spécifiques de l'antigène ayant produit la cytokine en réponse à la stimulation. Les spots sont comptés dans chaque puits à l'aide d'une

loupe ou d'un microscope, éventuellement équipé d'une caméra assistée par ordinateur. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules formant des spots (*Spot Forming Cells* ou SFC) par million de cellules mononucléées (SFC/ $10^6$  cellules) pour chaque condition de stimulation après soustraction du bruit de fond obtenu dans les puits correspondant aux cellules seules (témoin négatif).

### Recommandations de mise en œuvre

L'intérêt de cette technique repose sur l'identification individuelle de cellules productrices de la

protéine d'intérêt. Elle nécessite donc de travailler à partir de cellules fraîchement prélevées, séparées et mises en culture quelques heures après le recueil. La période de culture impose également des conditions stériles. Enfin, la quantification nécessite de disposer d'un comptage le plus précis possible des cellules pour lesquelles la production de la protéine d'intérêt est recherchée. Les suspensions de cellules mononucléées obtenues après centrifugation sur gradient de densité (Ficoll®) contiennent plusieurs types cellulaires, et une quantification spécifique de la population cellulaire testée, avant l'ajustement de la suspension cellulaire, peut nécessiter une analyse en cytométrie en flux. Ceci permet par exemple un décompte précis des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, producteurs de cytokines, ou des lymphocytes B producteurs d'immunoglobulines.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Bonne sensibilité Test fonctionnel Quantification du nombre de cellules productrices d'une cytokine Applicable aux biothérapies Technique simple au regard des informations obtenues Permet l'identification simultanée de plusieurs cytokines sécrétées (ELISpot fluorescent)	Nécessite de travailler avec des cellules isolées, fraîchement mises en culture en conditions stériles Sécrétion cytokinique spontanée pouvant induire un bruit de fond au regard d'une stimulation antigénique spécifique Technique sensible aux vibrations lors de l'incubation sur la nuit Ne permet pas de doser les molécules sécrétées L'ELISpot fluorescent nécessite un appareillage spécifique pour la lecture du résultat

### Exemples d'applications

- En recherche :
  - dans le cas de l'analyse des réponses lymphocytaires T CD8<sup>+</sup>, la détection de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  est généralement utilisée. En effet, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> reconnaissent leur épitope à la surface d'une cellule cible et

lysent cette dernière. Parallèlement à leur activité cytolytique, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques produisent des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$ . Les deux fonctions (cytotoxicité et production de cytokines) sont globalement corrélées et induites par les mêmes signaux. La technique ELISpot IFN- $\gamma$  est maintenant reconnue comme étant la méthode de référence pour quantifier rapidement, à partir d'une faible quantité de cellules mononucléées, le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes viraux ou tumoraux. Elle permet aussi d'identifier les peptides immunodominants et d'analyser la diversité du répertoire des réponses lymphocytaires T CD8<sup>+</sup>;

- les cytokines Th2 (IL-4 notamment) sont particulièrement intéressantes pour analyser les réponses allergiques de faible intensité qui peuvent être détectées plus facilement par cette technique sensible;
- la technique ELISpot B est utilisée pour caractériser les réponses humorales. Elle permet de déterminer le nombre de lymphocytes B sécrétant des immunoglobulines, ou le nombre de lymphocytes B spécifiques d'un antigène. Dans le premier cas, un anticorps anti-isotype est fixé sur la membrane, permettant de détecter la production d'immunoglobulines (*e.g.* IgM, IgG, IgA). Dans le second cas, c'est l'antigène fixé sur la membrane qui capture l'immunoglobuline spécifique produite. Dans les deux cas, les immunoglobulines sécrétées sont révélées par un anticorps biotinylé anti-immunoglobuline, puis une réaction colorimétrique.
- En clinique : la technique d'ELISpot basée sur la détection de cytokines, grâce à sa sensibilité et sa reproductibilité, est largement utilisée pour analyser les réponses immunes spécifiques T ou B au cours de pathologies comme les infections virales chroniques, les cancers et les allergies. Elle permet aussi l'évaluation des protocoles vaccinaux.

# Chapitre 5

## Techniques de biologie moléculaire

### Techniques d'amplification utilisées en immunologie

La biologie moléculaire, qui concerne principalement l'étude des acides nucléiques, a connu un essor important depuis la fin du xx<sup>e</sup> siècle. En immunologie, ces techniques sont par exemple appliquées à l'étude du répertoire des récepteurs aux antigènes des lymphocytes B et T. Elles reposent sur l'amplification de séquences nucléotidiques spécifiques à partir d'ADN ou d'ARN de façon qualitative ou quantitative. Une application récente originale, l'immuno-PCR, utilise ce principe pour la détection d'une réaction antigène-anticorps.

### Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR), conceptualisée en 1983 par Kary Mullis (prix Nobel de chimie en 1993), permet d'obtenir des copies multiples d'ADN (jusqu'à quelques microgrammes) à partir de quelques molécules d'ADN à l'aide de la Taq polymérase, une ADN polymérase résistante aux températures élevées. Cette technique a été automatisée avec le développement de thermocycleurs qui peuvent faire varier la température de l'échantillon de façon très précise. Cette technologie a donné lieu à de très nombreuses applications fournissant aussi bien des

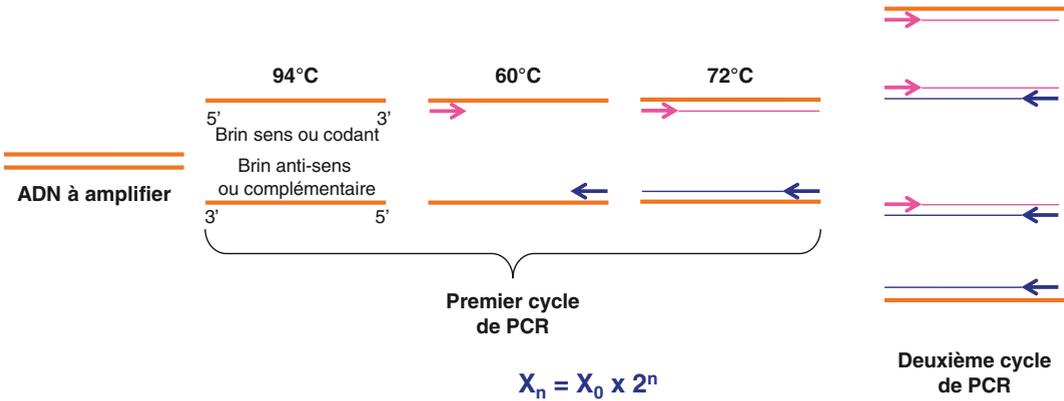
informations qualitatives que quantitatives lorsque l'ADN est en quantité trop faible pour être analysé ou utilisé dans des réactions biochimiques.

### Méthodologie

Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice d'ADN double brin. Deux oligonucléotides (fragments d'ADN simple brin synthétiques de 20 à 30 nucléotides également appelés amorces), définis par l'expérimentateur, correspondent à des séquences spécifiques des brins sens et anti-sens de la matrice cible. Chaque amorce s'hybride sur un brin opposé de l'ADN de la matrice et borde la séquence à amplifier. La PCR comprend trois étapes réalisées à des températures clés différentes, en présence d'un mélange des quatre nucléotides (A, C, G et T) et de Taq polymérase (fig. 5.1) :

- dénaturation de l'ADN double brin à 94 °C en matrice simple brin ;
- hybridation des amorces sur la matrice ;
- copie de la zone cible de l'ADN par la Taq polymérase.

Ces trois étapes sont répétées 30 à 40 fois (cycles de PCR), doublant à chaque fois la quantité d'ADN. Les produits de chaque étape servant de matrices pour les étapes suivantes, la quantité d'ADN évolue de façon exponentielle puis linéaire pour finalement atteindre un plateau. Ainsi, après 30 cycles de PCR, en quelques heures, on obtient théoriquement  $2^{30}$  copies de la cible initiale. Les produits de la PCR (amplicons) sont détectés sous forme de bandes selon leur



**Fig. 5.1** Principe de la réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction* ou PCR).

L'ADN est soumis à une succession de changements de température : dénaturation à 94 °C (séparation des deux brins d'ADN); hybridation (ou *annealing*) des amorces spécifiques (amorce sens en rose, amorce anti-sens en bleu) avec la matrice à la température de fusion ( $T_f$  vers 60 °C); polymérisation enzymatique à 72 °C à partir des amorces. Répétition des trois étapes entre 30 et 40 fois. La quantité de la séquence à amplifier est définie par l'équation  $X_n = X_0 \times 2^n$  ( $n$  : nombre de cycles;  $X_0$  : quantité initiale d'ADN;  $X_n$  : quantité d'ADN au  $n$ ème cycle).

taille après électrophorèse en gel d'agarose et coloration (*e.g.* bromure d'éthidium ou BEt), ou par électrophorèse capillaire.

### Recommandations de mise en œuvre

En plus de la Taq polymérase classique, plusieurs autres types d'ADN polymérase sont commercialisés, telles que les *Hot Start DNA* polymérases utilisées pour réduire les réactions non spécifiques et les polymérases fidèles qui, comme leur nom l'indique, font très peu d'erreurs lorsqu'elles recopient l'ADN cible. Ces dernières travaillent généralement moins vite que les polymérases classiques et sont utilisées pour les applications exigeant le moins d'erreurs possibles telles que le séquençage et la mutagenèse dirigée.

La spécificité des amorces est un facteur crucial pour le succès de la PCR. Cette spécificité résulte en grande partie de la façon dont elles ont été définies. Pour une PCR classique, les amorces doivent mesurer 18 à 20 nucléotides de long, avoir un pourcentage de guanine et cytosine (GC) de 40 à 60 %, ne pas s'hybrider sur elles-mêmes, ne pas présenter de mésappariement avec la cible, ne pas être complémentaires entre elles et enfin être choisies au sein d'une zone spécifique d'une seule cible. Pour améliorer la spécificité, il est sou-

haitable de déterminer expérimentalement la température optimale d'hybridation des amorces.

Enfin, cette réaction étant très sensible aux contaminations, il faut toujours travailler avec des gants, des pointes avec filtre pour pipettes automatiques et du matériel dépourvu de toute trace d'ADN. Un contrôle négatif (sans ADN) doit être systématiquement réalisé pour chaque PCR afin de s'assurer de l'absence de contamination. Un circuit à sens unique, avec plusieurs pièces dédiées séparées, doit être mis en place dans le laboratoire afin d'éviter le mélange des produits nucléotidiques.

### Exemples d'applications

- En recherche : la technique de PCR permet d'étudier les variations génétiques et d'identifier les déficits moléculaires. La PCR a de très nombreuses applications dans le domaine de la microbiologie et pour l'étude des variations génétiques dans les cellules humaines ou animales.
- En clinique :
  - la clonalité est évaluée par l'analyse des gènes des récepteurs pour l'antigène;
  - les tests de diagnostic microbiologique utilisant la PCR sont capables de détecter la présence d'agents pathogènes plus tôt que les méthodes sérologiques.

## Reverse transcription-PCR

La *Reverse Transcription*-PCR (RT-PCR) vise à détecter et analyser des ARN (ARNm ou totaux) présents même en très faible quantité dans un échantillon biologique et comprend deux étapes. La première utilise une transcriptase inverse pour transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). La seconde étape est la PCR qui permet d'amplifier cet ADNc. Le résultat est visualisé par migration sur gel ou électrophorèse capillaire.

### Méthodologie

La transcription inverse (*Reverse Transcription* ou RT) consiste tout d'abord à mélanger les ARN avec un oligo-dT, oligonucléotide composé uniquement de thymidine qui s'hybride à la queue poly-A des ARNm, ou avec un mélange d'oligonucléotides longs de six nucléotides (hexamères) et de séquences aléatoires qui s'hybrident sur tous les ARN (avec ou sans queue poly-A), selon que l'on souhaite amplifier uniquement les ARNm pour l'ensemble du *pool* de la cellule. Ces mélanges sont ensuite dénaturés pour limiter les éventuelles structures secondaires. Pour cela, l'ensemble est placé durant 2 min à 70 °C, puis 2 min supplémentaires sur la glace pour éviter la renaturation. Ensuite, un mélange des quatre nucléotides et la transcriptase inverse sont ajoutés pour une incubation à 37 °C durant 1 h 30. L'étape de PCR se déroule telle que décrite précédemment.

### Recommandations de mise en œuvre

L'intégrité de l'ARN est un élément essentiel pour disposer d'une matrice ADNc de qualité. Il faut donc éviter de le contaminer ou de le dégrader. Pour cela, quelques précautions doivent être prises telles que porter des gants pour protéger les échantillons des RNases apportées par le manipulateur, utiliser les tampons et du matériel sans RNase (matériel dit RNase-free). Il est aussi recommandé d'ajouter un inhibiteur de RNases à la transcriptase inverse.

Il existe deux grands types de transcriptases inverses : celui du virus du myéloblastome aviaire

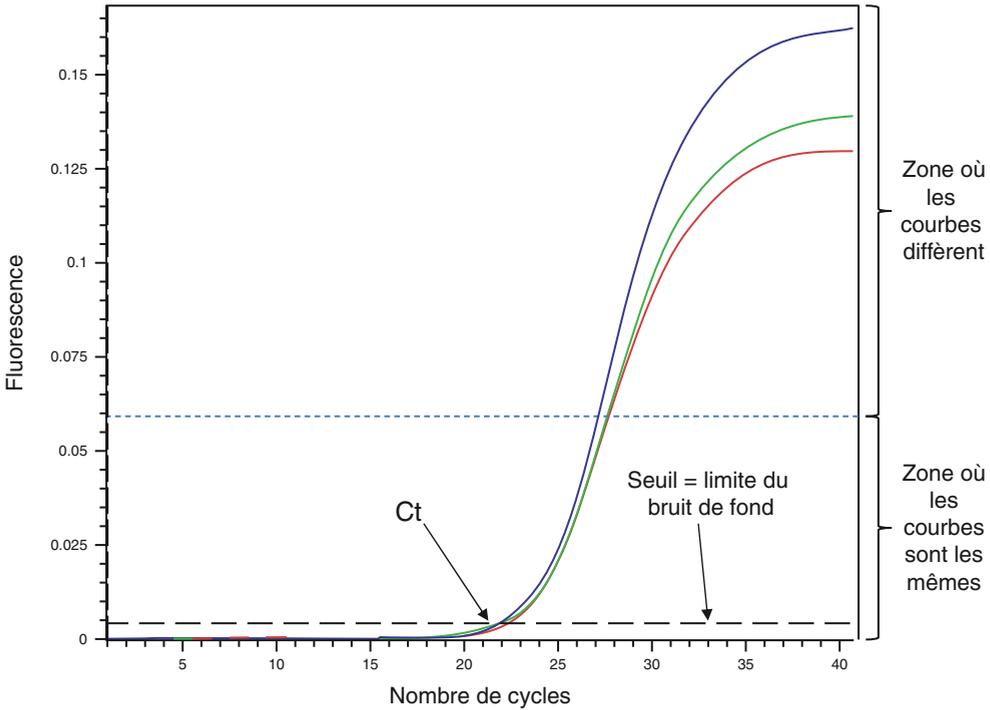
(AMV) et celui du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV). En pratique, les MMLV sont les plus utilisées.

### Exemples d'applications

- En recherche :
  - l'étude du profil d'expression génique permet d'avancer dans la compréhension des mécanismes de physiologie immunitaire ;
  - la RT-PCR permet de détecter n'importe quel transcrite dans un échantillon biologique ;
  - cette technique s'applique également à la détection des virus à ARN, ou des gènes en cours de transcription dans les cellules immunitaires comme les cytokines ou les TLR.
- En clinique :
  - la technique de PCR s'applique à l'analyse des variations d'expression génique impliquées dans une pathologie. Elle ouvre vers de nouvelles cibles thérapeutiques ou de diagnostic ;
  - la détection de cellules tumorales peut être réalisée par la recherche de la présence de transcrits spécifiques (*e.g.* mutations, transcrits de fusion).

### qRT-PCR ou RT-PCR quantitative

La PCR quantitative en temps réel (*Quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction* ou qRT-PCR), permet la quantification d'un ADN ou d'un ARN spécifique de façon fiable. Cette méthode est basée sur la détection et la mesure quantitative d'un marqueur fluorescent (la plupart du temps le SYBR Green I) dont l'émission est proportionnelle à la quantité d'ADN générée pendant la PCR. La réaction de PCR est suivie directement sur la quantité de fluorescence émise à la fin de chaque étape d'élongation pendant laquelle la polymérase recopie l'ADN (fig. 5.2), d'où le nom de PCR en temps réel très fréquemment utilisé. Le concept de cycle seuil (*cycle threshold* ou Ct) est à la base d'une quantification précise et reproductible. Il est défini par le nombre de cycles de PCR requis pour atteindre un signal d'émission de fluorescence statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce dernier



**Fig. 5.2** Courbes de fluorescence obtenues lors d'une PCR en temps réel quantitative (qPCR, triplicata).

Le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis pour que le signal de fluorescence soit significativement supérieur au bruit de fond. Cycle seuil déterminé au cours de la phase exponentielle, phase la plus reproductible de la réaction de PCR (cf. courbe verte).

est d'autant plus petit que la matrice initiale à amplifier est abondante. La valeur du Ct est toujours définie au cours de la phase exponentielle d'amplification, phase la plus reproductible de la réaction. Cette valeur de Ct peut ensuite être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs de Ct générées lorsque des transcrits de gènes de ménage (*housekeeping genes*, e.g.  $\beta$ -actine,  $\beta$ 2-microglobuline), dont l'expression est constante, sont amplifiés. La quantification ne requiert aucune manipulation post-PCR.

## Méthodologie

Les étapes de la qRT-PCR sont les mêmes que celles d'une PCR classique, excepté la révélation des amplicons qui est analysée en temps réel. Les amorces pour la qRT-PCR répondent aux mêmes critères de spécificité que celles de la PCR classique pour un fragment de 100 à 200 paires de bases (pb). Comme pour une PCR classique, il faut appliquer la température d'hy-

bridation aux caractéristiques des amorces et à leur concentration. Le programme type pour une qRT-PCR est le suivant : (1) dénaturation de l'ADNc (e.g. 94 °C, 5 min) ; (2) dénaturation rapide du double brin (e.g. 94 °C, 15 sec) ; (3) hybridation à la température d'hybridation optimale des amorces (e.g. 45 sec) ; (4) élongation (e.g. 72 °C, 30 sec) ; (5) répétition 40 fois des étapes 2 à 4 ; (6) élongation finale à 72 °C.

## Recommandations de mise en œuvre

La qRT-PCR est encore plus sensible aux contaminations que la PCR classique. Il faut donc respecter les mêmes règles à ce sujet et extraire les ARN dans une pièce spécifique lorsqu'elle est réalisée sur des ADNc.

Il est recommandé de déterminer l'efficacité de la qRT-PCR pour chaque couple d'amorces afin de s'assurer que la modification d'expression d'un gène n'est pas due à une différence d'efficacité d'amplification. Pour cela, il faut appliquer la qRT-

PCR sur une gamme de dilutions d'ADNc afin de déterminer l'équation de la droite  $Ct = f(\log cc \text{ ADNc matriciel})$ . L'efficacité,  $E = 10^{(-1/pente)}$ , correspondant au pourcentage de doublement entre chaque cycle, est acceptable entre 90 et 110 %. Enfin, les qRT-PCR doivent être développées au moins deux fois en triplicat. Idéalement, les Ct doivent être normalisés par rapport à plusieurs gènes de référence ou gènes de ménage.

### Exemples d'applications

- En recherche : la qRT-PCR est utilisée à la fois dans des modèles animaux et de lignées cellulaires, pour étudier les modulations géniques générées par les manipulations expérimentales, par exemple les variations de l'activation de la production de cytokines.
- En clinique : la qRT-PCR est utilisée pour une quantification de l'expression génique, par exemple, la modulation hormonale ou iatrogène de tissus ou de cellules. Elle permet aussi la recherche de mutations ponctuelles ou de polymorphismes (*Single Nucleotide Polymorphism* ou SNP) et la recherche du chimérisme après greffe de cellules souches hématopoïétiques. En microbiologie, elle est utile pour la détection et la quantification rapide d'agents pathogènes viraux, bactériens ou parasitaires.

### Génotypage par PCR-SSO, PCR-SSP et PCR-SBT (fig. 5.3)

Les techniques de PCR-SSO (pour *Sequence Specific Oligoprobes*) ou PCR-ASO (pour *Allele Specific Oligonucleotides*), PCR-SSP (pour *Sequence Specific Primers*) et PCR-SBT (pour *Sequencing Based Typing*) font appel à la PCR classique pour amplifier des régions comportant un polymorphisme et permettent de détecter les SNPs. Leur intérêt est d'amplifier considérablement la séquence recherchée. L'utilisation de sondes spécifiques permet selon les cas de détecter le polymorphisme positivement (la sonde n'hybride qu'avec l'ADN variant) ou négativement (il n'y a pas d'amplification/hybridation si le polymorphisme est présent).

### Méthodologie

La PCR-SSO/ASO comprend deux étapes :

- amplification avec des amorces génériques ;
- puis hybridation avec des sondes oligonucléotidiques spécifiques.

Cette technologie permet d'analyser un grand nombre d'échantillons à moindre coût. Différentes techniques de réalisation et de révélation existent, hybridation directe ou inverse sur membrane de nitrocellulose ou sur puce, électrophorèse en gel d'agarose, restriction enzymatique, voire RT-PCR.

La PCR-SSP fait appel à des amorces spécifiques des régions polymorphiques qui sont les seules à être amplifiées. Les produits amplifiés sont séparés sur gel et les résultats interprétés en fonction des bandes observées.

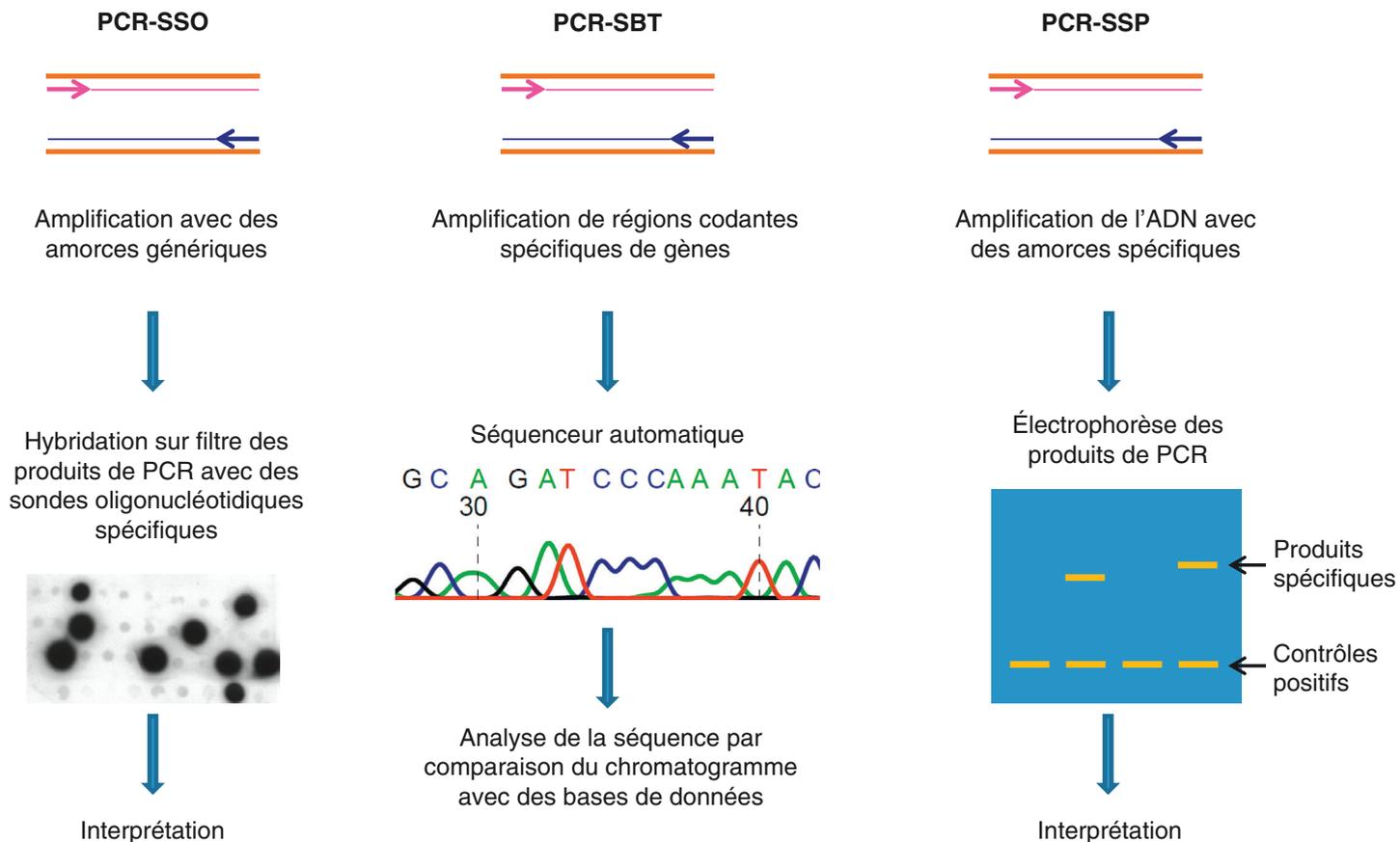
Enfin, la PCR-SBT implique une amplification par PCR suivie du séquençage direct du produit de PCR.

### Exemples d'applications

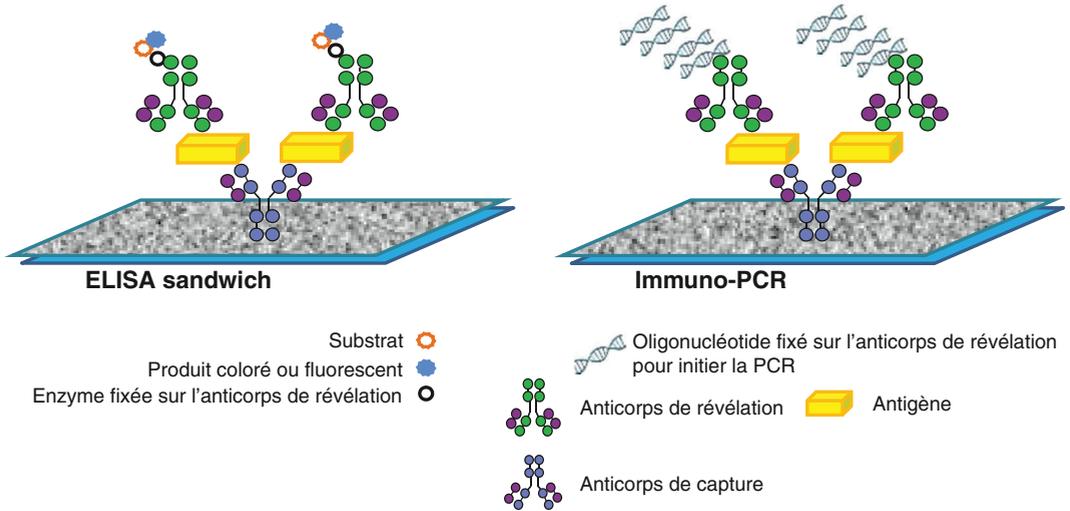
- En recherche : ces techniques font également partie de l'arsenal des technologies de médecine légale et criminelle.
- En clinique : ces techniques sont très utiles pour le typage du CMH (typage HLA générique) et pour l'analyse des réarrangements des gènes des immunoglobulines, notamment à la recherche de maladie résiduelle dans les hémopathies lymphoïdes.

### Immuno-PCR

Le cas particulier de l'immuno-PCR est celui d'une technique récente qui associe à la détection de l'antigène cible par un anticorps l'amplification exponentielle, par PCR, d'un ADN fixé à ce dernier (fig. 5.4). Cette méthode combine les avantages des deux systèmes analytiques engagés successivement de l'immunodosage (spécificité et affinité) et de la révélation (amplification qPCR). Elle permet de détecter de petites quantités de protéines antigéniques de l'ordre du picogramme ou du femtogramme. Le choix de l'oligonucléotide comme marqueur est infini et permet d'appliquer cette méthode en multiplex.



**Fig. 5.3** Comparaison des techniques de PCR-SSO, PCR-SBT et PCR-SSP.



**Fig. 5.4** Systèmes de détection des antigènes par test immuno-enzymatique (ELISA) et par l'immuno-PCR.

Ses principales applications actuelles sont dans le champ de la microbiologie, avec la détection de

protéines d'agents infectieux (bactéries, virus, moisissures, polypeptides des maladies à prions).

**Avantages/inconvénients**

	PCR	RT-PCR	qRT-PCR	Immuno-PCR
<b>Avantages</b>	Étude qualitative et semi-quantitative de l'ADN Coût faible Rapidité Grand nombre d'échantillons Nombreux couples d'amorces disponibles dont les conditions d'utilisation ont été optimisées Stabilité des matrices ADN	Étude qualitative et semi-quantitative des ARN Coût faible Rapidité Grand nombre d'échantillons Nombreux couples d'amorces disponibles dont les conditions d'utilisation ont été optimisées	Étude quantitative des ADN et ARN Rapidité Grand nombre d'échantillons Sensibilité plus élevée que la PCR et la RT-PCR Suivi en direct de la réaction Analyse immédiate de la qualité de l'amplification	Détection d'antigènes Rapidité Grand nombre d'échantillons Faible volume Sensibilité élevée (pico- à femtogramme) Suivi en direct de la réaction Applications en système multiplexé
<b>Inconvénients</b>	Sensibilité plus faible que la qRT-PCR Attention aux contaminations Pas de suivi en direct de la réaction Qualité de l'amplification examinée obligatoirement sur la migration	Sensibilité plus faible que la qRT-PCR ARN sensible aux nucléases Attention aux contaminations Pas de suivi direct de la réaction Qualité de l'amplification examinée obligatoirement sur la migration	Coût du thermocycleur plus élevé Mise au point plus longue mais de plus en plus de couples d'amorces avec des conditions d'utilisation optimisées sont disponibles ARN sensible aux nucléases Attention aux contaminations	Nécessite un thermocycleur en temps réel (qRT-PCR) Contaminations possibles par l'échantillon

## Diagnostic de clonalité, analyse du répertoire

Lors de l'ontogénie lymphocytaire T ou B, les précurseurs cellulaires réarrangent les gènes codant pour la partie variable de leur récepteur, TcR (*T cell Receptor*) ou BcR (*B cell Receptor*), respectivement. Ce sont les gènes V ( $\pm$  D) et J des chaînes lourdes (IgH), puis des chaînes légères kappa et lambda pour les lymphocytes B et les gènes des chaînes delta, puis gamma, puis bêta, puis alpha pour les lymphocytes T exprimant un TCR $\alpha\beta$ . Lors de ces réarrangements, la région la plus hypervariable du récepteur (CDR3) est constituée par la jonction des segments V (D) J. Cette jonction est spécifique de la cellule dans laquelle est effectué ce réarrangement qui implique des délétions et des additions de nucléotides aléatoires en nature et en nombre. Cette jonction représente la signature génétique du lymphocyte (fig. 5.5). L'extrême variabilité ainsi générée se traduit par des différences de taille des régions hypervariables entre lymphocytes. Cette variabilité de taille est exploitée pour étudier globalement le répertoire lymphocytaire. Le nombre de bases enlevées et ajoutées au niveau des jonctions étant aléatoire, la répartition des tailles de la région hypervariable dans un échantillon polyclono-

nal suit une distribution gaussienne (fig. 5.6). La population lymphocytaire issue de l'expansion d'un seul lymphocyte forme un clone lymphocytaire. Chaque cellule du clone a la même région hypervariable. Cette expansion provoque la surreprésentation dans l'échantillon d'une taille de séquence hypervariable donnée (voir fig. 5.6).

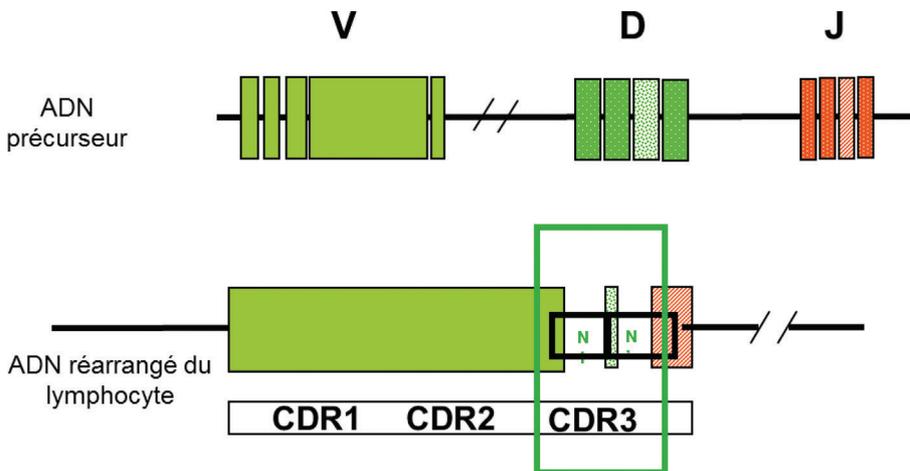
Le principe de l'analyse de la clonalité ou des analyses du répertoire consiste à mettre en évidence la présence ou l'absence d'expansion d'un lymphocyte au sein d'une population polyclonale.

Deux remarques sont importantes à ce stade :

- la mise en évidence d'une sur-représentation d'un clone lymphocytaire ne préjuge pas de la cause de la prolifération clonale et monoclonalité n'est pas synonyme de malignité. Certaines infections virales peuvent en effet induire des expansions lymphocytaires de diversité très étroite;
- il s'agit bien d'étudier la déviation observée par rapport à une répartition gaussienne de référence et l'analyse doit être faite sur des prélèvements riches en lymphocytes.

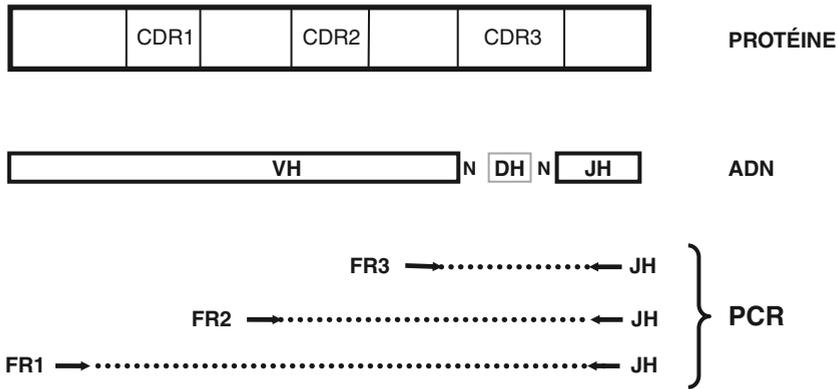
### Méthodologie

Bien que le principe soit le même, la méthodologie est un peu différente selon que l'on cherche à mettre en évidence une population clonale dans



**Fig. 5.5** Création de la région hypervariable CDR3 lors de l'ontogénie B.

Locus 14q32, gènes de chaîne lourde du BCR (IgH). N1 et N' correspondent à des délétions et des additions de nucléotides aléatoires en nature et en nombre.



**Fig. 5.6** Amplification des régions CDR3.

un échantillon suspect de maladie lymphoproliférative clonale (*e.g.* lymphome, leucémie lymphoïde chronique) ou selon que l'on étudie la réaction immunitaire à un processus physiologique ou pathologique non tumoral.

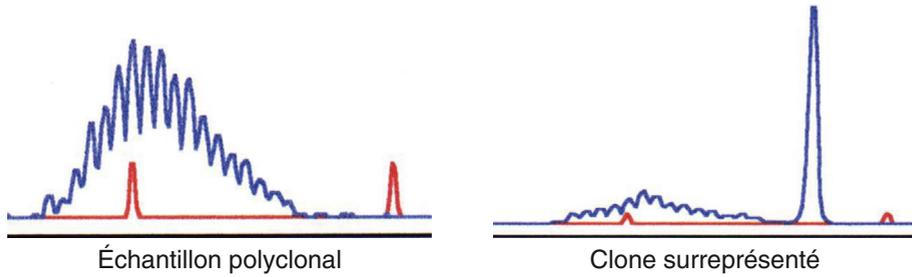
### Diagnostic de clonalité B dans un contexte tumoral

La recherche d'une clonalité B est effectuée le plus souvent sur l'ADN extrait de l'échantillon à analyser. Il s'agit d'amplifier toutes les séquences hypervariables présentes dans l'échantillon et d'en étudier la taille. Pour ce faire, on utilise un oligonucléotide consensus capable de s'hybrider sur les six segments J présents dans le génome, combiné à des oligonucléotides complémentaires des segments VH en 5' de la région CDR3. Les segments VH étant regroupés en six familles, il est nécessaire d'utiliser six oligonucléotides VH dans chaque réaction de PCR multiplex. De plus, les oligonucléotides VH peuvent être complémentaires soit de la région FR3 (PCR FR3-JH), soit de la région FR2 (PCR FR2-JH), soit de la région FR1 (région FR1-JH) des segments VH (fig. 5.7). Le choix des oligonucléotides a été optimisé lors d'une étude européenne appelée Biomed 2 et leur séquence est publique. Une fois les séquences amplifiées, l'analyse de leur taille est faite par migration sur gel d'acrylamide, le plus souvent sur un séquenceur qui permet une résolution à la base près, en utilisant le logiciel public GeneScan.

L'oligonucléotide JH doit alors être couplé à un fluorochrome. Les lymphoproliférations tumorales B que l'on cherche à mettre en évidence par cette technique étant le plus souvent constituées de cellules de type centro- ou post-germinatif, la région VDJ spécifique du clone tumoral comporte généralement des mutations somatiques non prédictibles. Celles-ci pouvant empêcher l'hybridation des oligonucléotides, il est impératif de n'affirmer l'absence de clone tumoral qu'après avoir réalisé les trois PCR FR1, FR2 et FR3. En cas de négativité, il est fortement recommandé de compléter avec une analyse des réarrangements des chaînes légères.

### Diagnostic de clonalité T dans un contexte tumoral

Il existe deux types de récepteurs T, alpha-bêta et gamma-delta. Les proliférations tumorales sont très largement alpha-bêta. Cependant, le locus bêta est très complexe. Si cette complexité permet de bien aborder les analyses de répertoire immunitaire, elle rend difficile l'utilisation de ce locus pour des analyses de clonalité en routine. Par contre, les gènes codant la chaîne gamma étant réarrangés très précocement au cours de l'ontogénie T, ils peuvent servir de marqueur de clonalité quel que soit le type de récepteur exprimé *in fine* par la population tumorale. De plus, le locus gamma est d'organisation très simple, ce qui facilite son exploration. Sur le même principe que



**Fig. 5.7** Migration des produits PCR.  
Marqueur de taille en rouge, échantillon en bleu.

pour la clonalité B, il est possible, en utilisant quatre oligonucléotides complémentaires des régions V et trois oligonucléotides complémentaires des régions J, d'amplifier la signature clonale de tous les lymphocytes T présents dans un échantillon. Il est parfois demandé des précisions sur la nature TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  de la population clonale. Pour y répondre, il est nécessaire d'analyser les réarrangements des chaînes delta et bêta du TCR. Ceci n'est fait que dans quelques laboratoires spécialisés.

### Étude du répertoire lymphocytaire au cours de la réponse immune

La question posée est différente dans ce contexte car on ne cherche pas à mettre en évidence une population tumorale unique, mais à étudier les variations de toutes les populations lymphocytaires. Il s'agit le plus souvent de populations lymphocytaires T alpha-bêta. Ces analyses font appel soit simplement à la diversité du segment Vb utilisé dans le réarrangement (analyse en cytométrie en flux) soit à la diversité VDJ (technique de biologie moléculaire).

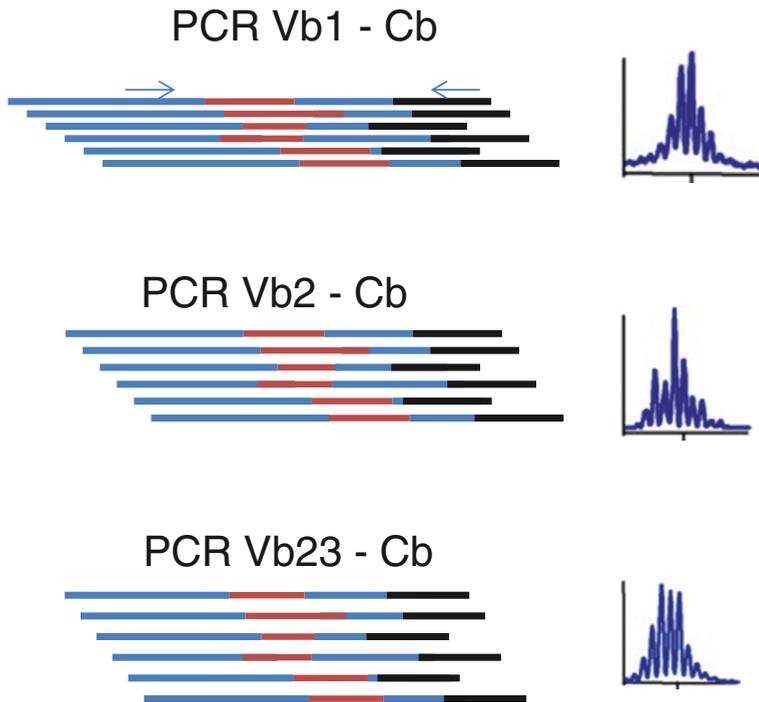
Lors de l'analyse par biologie moléculaire, le locus Vb est caractérisé par la grande diversité des segments Vb, qui peuvent être regroupés en 24 familles Vb. Les segments Jb étant également très divers (13 oligonucléotides sont nécessaires pour reconnaître tous les segments Jb), la technique la plus courante consiste à utiliser comme matrice de l'ARN transformé en ADN complémentaire après transcription *reverse*. Ceci permet de réduire l'analyse du répertoire à 24 PCR : un PCR par segment Vb en utilisant le même oligo-

nucléotide Cb (complémentaire du segment constant) pour toutes les PCR. Chaque PCR donne lieu à une analyse de fragments. Un répertoire est ainsi représenté par 24 images qui constituent un spectratype, initialement obtenu en rendant les produits radioactifs avant migration sur gel d'acrylamide, mais actuellement réalisé par migration en fluorescence comme pour une analyse de clonalité (fig. 5.8). Le logiciel Immunoscope a été développé initialement par l'équipe de Philippe Kourilsky à l'Institut Pasteur, puis largement amélioré pour intégrer les données et les interpréter.

L'analyse du répertoire par cytométrie en flux utilise des anticorps monoclonaux spécifiques de chacune des familles Vb. Leur utilisation permet de reconnaître 70 % des cellules T CD3<sup>+</sup>.

### Modalités de mise en œuvre

Pour être interprétable, le diagnostic de clonalité ne peut se faire que dans un tissu envahi par une population lymphocytaire suspecte en quantité suffisante. En pathologie tumorale, ceci intervient donc en deuxième intention, lorsque l'anatomo-pathologiste ou le cytométriste a des doutes sur la nature clonale (tumorale) de la population. Il convient d'être prudent concernant les prescriptions d'analyse de clonalité dans le sang où le risque d'exploitation abusive des résultats est maximal (*e.g.* conclure à l'absence de lymphome parce que la clonalité circulante est négative, alors que la tumeur est dans la peau ou le poumon). L'étude de la clonalité au cours des réponses immunitaires nécessite de connaître le contexte de l'immunisation explorée.



**Fig. 5.8** Étude du répertoire Vbêta.

### Avantages/inconvénients

	Biologie moléculaire	Cytométrie en flux
<b>Nécessité d'une expertise</b>	Oui	Oui
<b>Coût élevé</b>	Non	Oui
<b>Précision sur la nature du répertoire modifié</b>	Non (sauf à trier les cellules avant analyse)	Oui, combinaison des anticorps anti-V $\beta$ avec des anticorps d'intérêt (e.g. CD4, CD8, CD25)
<b>Analyse rétrospective possible</b>	Oui	Non
<b>Analyse de matériel tissulaire fixé</b>	Oui	Non
<b>Identification précise d'un clone pour le suivi</b>	Oui : nécessite une étape de séquençage	Non

### Exemples d'applications

- En recherche : ces techniques sont utilisées pour analyser des variations dans les répertoires lymphocytaires T et/ou B, dans la recherche de nouveaux vaccins ou du micro-environnement tumoral. En expérimentation animale, ces méthodes permettent de monitorer la réponse recherchée ou modulée.
- En clinique : l'analyse des variations des répertoires T et/ou B permet d'immunomonitorer la reconstitution immunitaire post-greffe, ainsi que l'évolution de ces répertoires sous trithérapie ou après vaccination.

### Puces à ADN (DNA microarrays)

La technologie des puces à ADN (micropuces ou *microarrays*) utilise les propriétés que possède l'ADN monocaténaire (simple brin) à

reformer spontanément, par réaction d'hybridation, une structure bicaténaire (double brin) lorsqu'il rencontre un brin complémentaire dans des conditions optimales de température et de salinité. Le principe de la technique consiste à hybrider sur une micromatrice (*e.g.* lames de verre) recouverte de sondes (oligonucléotides simple brin dont la taille peut varier de 20 à 70 nucléotides) des acides nucléiques d'intérêt ou cibles (cDNA ou ADN génomique) préalablement marqués par un fluorophore. Après hybridation, l'acquisition des signaux de fluorescence est réalisée à l'aide d'un scanner lors de l'excitation des fluorophores par un laser. Les cyanines 3 et 5 (Cy3 et Cy5) de la famille des polyméthines sont les molécules fluorescentes les plus classiquement utilisées pour le marquage des acides nucléiques.

Les deux champs d'application les plus courants concernent les études d'hybridation génomique comparative (*Comparative Genomic Hybridization* ou CGH) et de transcriptomique ou profil d'expression génique (*Gene Expression Profile* ou GEP).

Plus récemment, le développement de micro-puces dédiées à l'exploration des micro-ARN (miRNA) et des profils de méthylation du génome a étendu les capacités d'investigation de cette technologie.

À l'inverse des techniques ciblées, quantitatives mais limitées en termes de nombre de cibles explorées, les technologies des puces à ADN permettent des études comparatives pangénomiques explorant plusieurs dizaines de milliers de cibles simultanément en une seule expérience sur chaque puce. La plasticité de cette technique a également permis la réalisation de puces à façon contenant un enrichissement en sondes pour certaines régions génomiques (CGH) ou certains gènes (transcriptomique) d'intérêt. Ainsi, l'évolution et le développement de puces ciblées sur l'ensemble des kinases exprimées dans une cellule (kinome), sur l'apoptose ou sur le cycle cellulaire, ont permis d'appliquer cette technologie à de nouveaux champs d'exploration.

## Hybridation génomique comparative sur puce (CGH array)

Le caryotype a longtemps constitué l'approche pangénomique exclusive permettant d'identifier des anomalies de nombre ou de structure des chromosomes. L'hybridation chromosomique grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes (*Fluorescence In Situ Hybridization* ou FISH) a augmenté les capacités de résolution de cette approche cytogénétique et permis la recherche ciblée d'anomalies récurrentes au sein de groupes de pathologies.

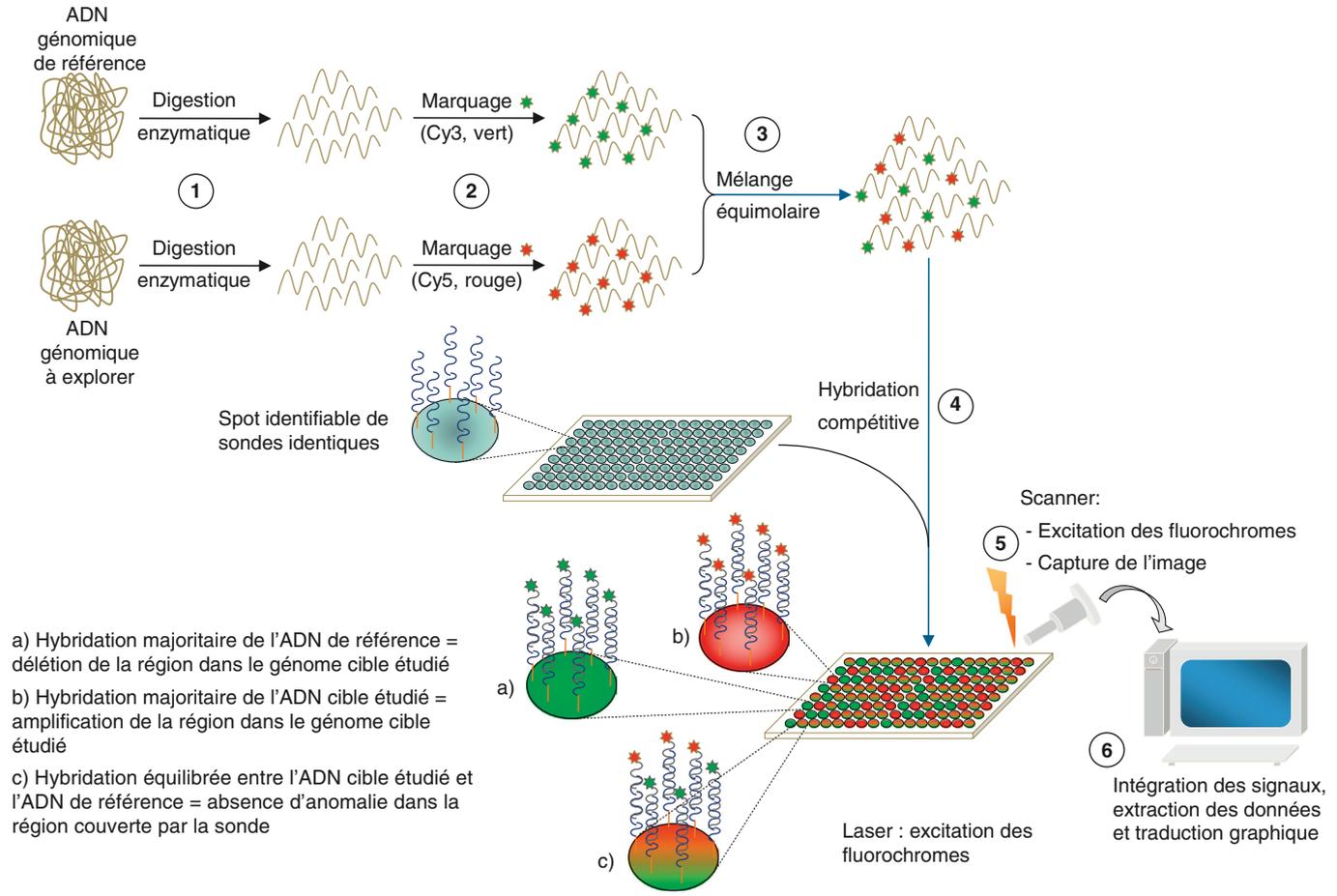
L'hybridation génomique comparative sur puce à ADN ou *Comparative Genomic Hybridization array* (CGH array), également appelée caryotype moléculaire, constitue désormais le lien entre l'approche microscopique traditionnelle représentée par le caryotype ou la FISH et les techniques de biologie moléculaire. Elle permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques quantitatives (amplification ou délétion) de petite taille (20 à 30 kilobases, Kb) non visibles sur les caryotypes conventionnels. La sensibilité de cette technologie varie, selon la résolution des puces utilisées, de 15 Kb (15 000 sondes) à 1 Mb (1 million de sondes). Avec une densification accrue du nombre de sondes dans les régions codantes, la technique de CGH array permet une approche globale et hautement résolutive d'exploration de la totalité du génome.

### Méthodologie

La technique comprend six étapes majeures dont les principales sont schématisées sur la [figure 5.9](#) :

1. extraction d'ADN génomique ;
2. digestion enzymatique de l'ADN génomique ;
3. marquage et purification ;
4. hybridation ;
5. digitalisation de la puce (scanner) ;
6. lecture et interprétation à l'aide de logiciels dédiés.

L'extraction de l'ADN génomique est réalisée suivant les techniques classiques de déprotéinisation au chloroforme et au phénol, suivies d'une



**Fig. 5.9** Schématisation des différentes étapes de l'hybridation génomique comparative sur puce. ADN<sub>g</sub> = ADN génomique.

précipitation de l'ADN dans l'éthanol. Il convient cependant d'obtenir une quantification précise et une évaluation fiable de la qualité de l'ADN extrait.

La seconde étape consiste à procéder à une digestion enzymatique de l'ADN génomique à l'aide des enzymes *RsaI* et *AluI* (5 U/500 ng d'ADN pendant 2 h à 37 °C), suivie d'une inactivation de ces dernières par dénaturation thermique (20 minutes à 65 °C). La digestion permet l'obtention de fragments d'ADN génomique de petite taille (200–500 paires de bases) adaptés à l'hybridation. Il est essentiel de contrôler l'efficacité de la digestion par électrophorèse microcapillaire afin de s'assurer de la digestion complète des échantillons, de l'absence de fragments d'ADN de haut poids moléculaire et d'une quantité d'ADN homogène entre échantillons.

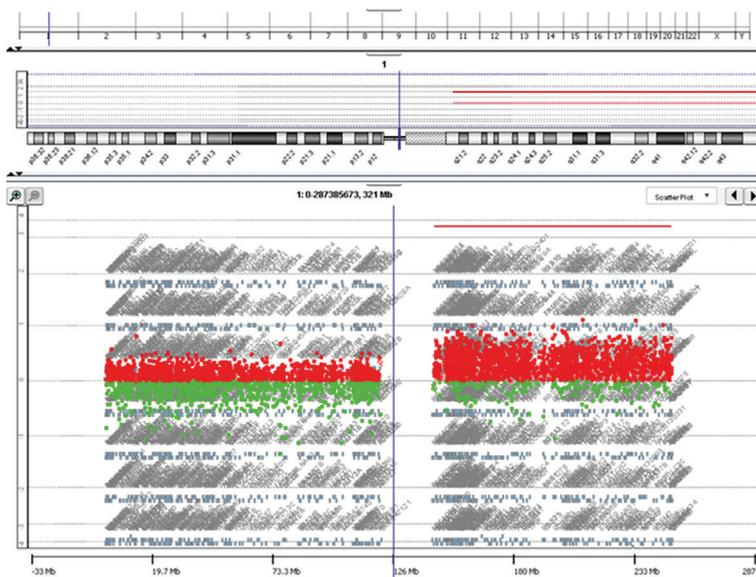
Le marquage à la cyanine est réalisé par incorporation aux fragments d'ADN digérés, de déoxy-nucléotides (dUTP) marqués à la cyanine (Cy3 ou Cy5) en utilisant l'enzyme Exo(-)Klenow (2 heures à 37 °C). Une étape d'inactivation thermique de l'enzyme (10 minutes à 65 °C) est également nécessaire. L'incorporation des cyanines est mesurée par spectrophotométrie à micro-volume qui permet d'évaluer l'efficacité du mar-

quage et de calculer l'activité spécifique en pmol de cyanine/ $\mu$ g d'ADN. Les fragments d'ADN marqués sont purifiés par centrifugation sur membrane filtrante de 30 kDa, qui permet d'éliminer l'excédent d'enzyme, de cyanines et de nucléotides susceptibles d'interférer avec l'étape d'hybridation.

L'échantillon d'ADN cible marqué à la Cy5 (rouge) et l'ADN de référence marqué à la Cy3 (vert) sont mélangés de façon équimolaire, dénaturés à 95°C pour l'obtention de fragments simple brin et déposés sur la puce à ADN pour l'étape d'hybridation sur les sondes (24 heures à 65°C).

Lorsque la période d'hybridation est écoulée, plusieurs lavages successifs dans des tampons différents sont nécessaires avant de pouvoir obtenir une image digitalisée de la puce. Lors de la lecture par le scanner, chaque spot est excité par un laser et l'intensité de fluorescence est mesurée pour les deux longueurs d'ondes d'excitation, 550 (Cy3) et 647 nm (Cy5).

L'intégration des signaux de fluorescence, l'extraction des données et leur traduction graphique (fig. 5.10) sont réalisées à l'aide de logiciels dédiés. Une différence dans le nombre de copies entre



**Fig. 5.10** Représentation graphique d'une aberration chromosomique (amplification du bras long du chromosome 1) retrouvée dans les cellules CD38<sup>+</sup>/CD138<sup>+</sup> de myélome multiple d'un patient.

l'ADN cible étudié et l'ADN de référence, pour un locus donné, modifie le rapport d'intensité des deux fluorochromes. Les ratios de fluorescence ( $\text{Log}_2[\text{intensité Cy5}/\text{intensité Cy3}]$ ) permettent de déterminer l'amplification ou la délétion d'une région génique, en se basant sur la fluorescence de l'ADN de référence.

### Recommandations de mise en œuvre

Le *CGH array* permet d'analyser des déséquilibres quantitatifs du génome en termes de perte ou de gain. Cette technologie constitue un outil de choix pour rechercher et caractériser en une seule expérience des anomalies chromosomiques sur l'ensemble du génome d'un individu. Cependant, de nombreux paramètres peuvent interférer avec le succès du résultat de l'hybridation. Les étapes de contrôle, de quantification, de marquage et de lavage sont essentielles et critiques pour la validation du résultat. Un défaut de digestion de l'un ou des deux ADN en compétition pour l'hybridation sur les sondes a pour effet la génération de fragments d'ADN de trop grande taille, inappropriés pour l'hybridation, et fausse le résultat. Un défaut de marquage de l'un des deux ADN a pour conséquence une sous-estimation du signal. Le pH des tampons et la stringence des lavages sont également critiques pour limiter le bruit de fond lié à des hybridations inadéquates et assurer une plus grande sensibilité.

Plusieurs jours sont nécessaires pour l'obtention d'une hybridation sur puce, cependant en dehors d'une hotte chimique (ou sorbonne) et d'un four à hybridation, les différentes étapes décrites ne nécessitent pas d'équipement spécialisé et/ou coûteux. Il est donc possible de procéder à l'essentiel de la réalisation de la technique dans un laboratoire habitué à manipuler les acides nucléiques. Le passage sur le scanner pour l'obtention d'une image digitalisée de la puce et l'acquisition des données ne durent que quelques minutes. Le temps d'occupation du scanner étant très court, il est possible de mettre en œuvre cette technique dans un laboratoire indépendant mais pouvant bénéficier d'un accès à un parc technologique, dans le cadre de mutualisation d'équipements.

Enfin, il est important de considérer le choix de la résolution des puces (15 K, 44 K, 60 K, 105 K, 180 K, 244 K, 400 K ou 1 M) qui permet d'optimiser le coût et les besoins analytiques.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
<p>Contrairement au caryotype traditionnel ou à la FISH, le <i>CGH array</i> ne nécessite pas de matériel frais <i>ex vivo</i> ni d'étape de culture cellulaire ni l'obtention de mitoses en nombre suffisant</p> <p>Cette analyse peut être réalisée à distance du prélèvement (plusieurs années) à partir du moment où les ADN ont été correctement conservés. Elle permet donc de procéder à des études rétrospectives et des échanges de matériel interlaboratoire</p> <p>Des protocoles dédiés à l'analyse de tissus fixés (FFPE) se développent. Du fait d'une fragmentation de l'ADN par le processus de fixation, la technique reste pour le moment moins robuste que lorsqu'elle est appliquée à des ADN extraits de tissus frais</p>	<p>Compte tenu du principe de compétition de la technique, notamment pour l'exploration d'anomalies au sein de populations tumorales, il est essentiel de s'assurer que la population étudiée représente au moins 40 % de l'échantillon analysé. Il ne faut pas négliger le recours à un tri cellulaire afin d'obtenir un enrichissement de la population cible</p> <p>Les translocations équilibrées correspondant à un échange parfaitement conservé de matériel génétique (sans perte ni gain) ne peuvent pas être détectées par cette technologie</p> <p>Le coût reste actuellement élevé</p>

### Exemples d'applications

- En recherche : permettant une exploration complète du génome, ces techniques ont de multiples applications pour la compréhension du fonctionnement cellulaire.
- En clinique : dans les syndromes lymphoprolifératifs, la présence ou l'absence d'anomalies génomiques ont souvent une valeur pronostique importante. Dans la leucémie lymphoïde chronique par exemple, la délétion des chromosomes 11 ou 17 (17p avec perte du gène suppresseur de tumeur p53) ou des anomalies du bras long du chromosome 11 (11q23) sont de mauvais pronostics. L'identification des gènes présents dans les régions ciblées par ces micro-anomalies peut également permettre une meilleure compréhension du processus physiopathologique de ces proliférations.

## Transcriptomique

L'analyse du transcriptome recherche l'ensemble des gènes exprimés (transcrits) dans une cellule et traduit un processus dynamique, contrairement à l'analyse du génome. Les techniques de transcriptomique mesurent les niveaux d'expression des gènes, révélés par la quantification des ARN, par exemple : ARN messagers (ARNm), micro-ARN (miRNA). Ces techniques peuvent permettre la caractérisation d'un tissu ou d'un type cellulaire défini, ou la comparaison de transcriptomes entre différentes conditions expérimentales.

### Méthodologie

Les différentes méthodes d'analyse du transcriptome nécessitent la transformation préalable des ARN en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse et, le plus souvent, leur amplification.

L'analyse du transcriptome peut être réalisée avec des techniques reposant sur les propriétés d'hybridation de l'ADN simple brin à son brin complémentaire. En conditions contrôlées, cette hybridation est très spécifique, même en présence d'une faible concentration de brins complémentaires.

Les analyses supervisées portent sur la quantification de transcrits sélectionnés *a priori*. Cette analyse peut être effectuée par northern-blot ou PCR quantitative (Q-PCR simple ou multiplex), en puits ou sur des cartes permettant la réalisation de 384 réactions simultanément (*array cards*).

Les approches non supervisées quantifient simultanément l'expression de dizaines de milliers de transcrits sur des puces d'expression. Ces dernières sont de petits supports en verre ou en silicium sur lesquels sont déposées plusieurs milliers de sondes, séquences d'oligonucléotides dessinées par le fabricant pour reconnaître le plus spécifiquement possible des brins d'ADNc. Ces puces sont mises en contact avec l'ensemble des ADNc préparés, marqués avec une molécule fluorescente. L'hybridation permet la reconnaissance des ADNc spécifiques appelés cibles par les sondes de la puce par complémentarité et appariement. Suite à cette étape, la puce d'expression est lue grâce à un scanner repérant les tandems sonde/cible fluorescents. La quantification est possible grâce à

l'utilisation d'un laser excitant la molécule fluorescente. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité d'ADNc présente, et donc à la quantité de transcrits du gène cible initialement contenue dans la population cellulaire étudiée.

L'analyse non supervisée du transcriptome peut également être réalisée par séquençage d'une librairie de fragments d'ADNc obtenus après transcription inverse des ARN extraits à partir d'une population cellulaire cible. Il s'agit des techniques SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) et de leurs variantes. La technique RNA-Seq, développée plus récemment que les précédentes, utilise directement un séquençage haut débit des ADNc.

### Recommandations de mise en œuvre

Pour toutes ces techniques, la validation des résultats nécessite la présence de contrôles internes d'expression négative et positive. De plus, la notion de normalisation est importante afin de comparer les niveaux d'expression des gènes entre différents échantillons cellulaires. Dans la plupart des cas, un ou plusieurs gènes dont l'expression est considérée comme invariante ou peu variante pour le ou les types cellulaires étudiés sont utilisés pour cette normalisation. Ces gènes, appelés gènes de ménage ou *housekeeping genes*, servent d'étalon interne et les résultats sont le plus souvent exprimés en valeur relative d'expression par rapport à un échantillon de référence.

La préparation des ARN destinés à être convertis en ADNc avant analyse est un point crucial et utilise différentes techniques selon ce que l'on souhaite explorer. Ainsi, les ARNm sont repérés par leur extension poly-A, par exemple à l'aide de billes magnétiques couplées à des oligonucléotides poly-T, alors que les miRNA sont séparés sur la base de leur taille.

Les études transcriptomiques, contrairement aux études du protéome, peuvent être réalisées à partir d'une quantité faible de matériel biologique. Les techniques d'analyse non supervisée peuvent être mises en œuvre à partir d'une quantité d'ARN de l'ordre du nanogramme, et donc d'une quantité minimale de cellules. Certaines techniques permettent même d'étudier l'expression *a priori* de dizaines de gènes à partir d'une cellule unique

(*single cell Q-PCR*), amenant à la révélation de sous-populations cellulaires non encore identifiées.

Il n'y a cependant pas de corrélation systématique entre les niveaux d'expression génique apportés par les analyses transcriptomiques et la production des protéines correspondantes. En effet, les modifications post-transcriptionnelles contribuent à des variations importantes de l'abondance et des caractéristiques des protéines traduites. L'analyse du transcriptome fournit ainsi des informations qui nécessitent une validation, à l'échelle protéique ou fonctionnelle.

### Avantages/inconvénients

Technique	Q-PCR	Array cards	Puces d'expression	SAGE	RNA-Seq
Analyse supervisée	Oui	Oui	Non	Non	Non
Identification de transcrits alternatifs	Non	Non	Non	Oui	Oui
Débit d'analyse	Très faible	Faible	Haut	Moyen	Haut
Quantité de matériel nécessaire	Moyenne	Moyenne	Faible	Faible	Faible

### Exemples d'applications

- En recherche : la comparaison de profils transcriptomiques est un puissant outil d'analyse pour comprendre les modifications induites par des conditions expérimentales contrôlées, qu'il s'agisse de cellules en culture ou de variations à l'échelle d'un ou plusieurs organes dans des organismes entiers.
- En clinique : l'apport de la transcriptomique, et plus particulièrement l'analyse par puces d'expression réalisée à partir de prélèvements tumoraux dans les années 2000, a eu un impact fort sur la définition de sous-types de pathologies tumorales. En effet, des valeurs pronostiques ont pu être attribuées à des groupes de patients de profils d'expression génique différents. C'est le cas par exemple pour les lymphoproliférations B matures, comme les lymphomes B diffus à grandes cellules ou les lymphomes folliculaires. La technique de RNA-Seq, permettant la détection de transcrits résultant de mutations

géniques, est un apport important dans la compréhension des mécanismes de cancérogenèse.

## Polymorphismes géniques

Le polymorphisme est défini au niveau d'une population par le nombre et les fréquences des allèles à un locus donné. Un gène polymorphe est un gène présentant au moins deux formes alléliques de fréquence supérieure ou égale à 1%, et le degré de polymorphisme d'une population est défini par son pourcentage de gènes polymorphes. Pour des formes alléliques de fréquence inférieure ou égale à 1%, c'est-à-dire dans la majorité des maladies génétiques humaines, on parle de cryptopolymorphisme ou, s'agissant de pathologie, de mutation causale. La mesure du polymorphisme fournit une estimation de la diversité globale entre individus d'une même population ou entre populations. L'analyse de la diversité génétique entre populations résout les questions phylogénétiques. Des marqueurs du polymorphisme génétique sont examinés pour leurs associations à des pathologies.

### Les polymorphismes et leur utilité en immunogénétique

Les mutations géniques qui affectent un gène dans l'une de ses séquences peuvent influencer sur sa fonction et retentir sur le phénotype associé. Sur le plan fonctionnel, une mutation peut s'associer à une perte ou à un gain de fonction. Les marqueurs polymorphes de l'ADN sont des polymorphismes d'un seul nucléotide (*Single Nucleotide Polymorphism* ou SNP), des polymorphismes de longueur de fragments de restriction (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP) ou des polymorphismes de courtes séquences répétées en tandem (microsatellites ou STR, pour *Short Tandem Repeat*), parfois des insertions/délétions.

Les polymorphismes sont examinés pour :

- mesurer la diversité génétique afin de définir la composition génétique d'une population (notion de fréquence allélique);
- rechercher l'émergence d'une mutation pathologique (notion d'ancêtre commun dans les études génétiques des populations);

- évaluer la susceptibilité à un phénotype pathologique (notion de gène associé);
- identifier un gène modificateur pour une maladie (sévérité) ou un traitement (pharmacogénétique).

Le polymorphisme sur l'ADN-Y ou l'ADN mitochondrial constitue le support des lignages paternels ou maternels, respectivement.

Les polymorphismes sont relevés sur les séquences nucléotidiques de l'ADN génomique par des techniques conventionnelles d'amplification PCR-SSP ou PCR-RFLP ou par séquençage direct.

Pour toutes les applications en immunogénétique bi-allélique, le modèle Hardy-Weinberg est introduit, le cycle vital considérant deux sexes séparés entre les stades adultes reproducteurs de deux générations successives et postulant qu'il

existe un équilibre des fréquences alléliques et génotypiques d'une génération à l'autre.

Le polymorphisme génétique affecte la plupart des gènes impliqués dans la réponse immunitaire, générant une susceptibilité à certaines pathologies ou des variabilités d'efficacité thérapeutique (tableau 5.1). Il est particulièrement important dans le système HLA où l'ensemble des allèles aux différents loci constitue l'haplotype caractéristique d'un individu.

### Exemples d'applications

- En recherche : la recherche des polymorphismes peut permettre d'expliquer certaines variations de résultats expérimentaux.

**Tableau 5.1** Exemples de polymorphismes hors HLA associés à des dysfonctions de l'immunité

	Protéine	Gène(s)	Type de polymorphisme	Association pathologique
<b>Complément</b>	C4	<i>C4A</i> <i>C4B</i>	SNP	C4AQo et/ou C4BQo marqueurs de susceptibilité aux maladies à complexes immuns
	Facteur H	<i>CFH</i>	SNP	Variant Y402H : susceptibilité à la dégénérescence maculaire liée à l'âge
	Récepteur CR1	<i>CR1</i>	HindIII RFLP	Génotype L/L associé à une faible réponse à l'éculizumab, anticorps monoclonal dirigé contre la fraction C5 du complément
	<i>Mannan binding lectin</i> (MBL)	<i>MBL2</i>	SNP	Variants R52C, G54D et G57E associés à la susceptibilité aux infections méningococciques
<b>Récepteurs au Fc des IgG</b>	Récepteur FcγRIIb (CD32)	<i>FCGR2B</i>	SNP	Variants -343C et I232T : susceptibilité au lupus érythémateux systémique
	Récepteur Fc <i>short tandem repeat</i> RIIa (CD16)	<i>FCGR3A</i>	SNP	Variant V158F associé à une faible réponse au rituximab (anti-CD20) et à l'infliximab (anti-TNF)
	Récepteur Fc <i>short tandem repeat</i> RIIIb (CD16, antigène du neutrophile HNA-1/2)	<i>FCGR3B</i>	SNP	Variants R36S, N65S et D82N : susceptibilité à la neutropénie allo-immune du nouveau-né
<b>Cytokines</b>	TNF-α	<i>TNFA</i>	SNP	Variant A308 allèle de susceptibilité au syndrome de Löfgren
			SNP	Variant T857 allèle de susceptibilité à la sarcoïdose
			Microsatellite	5 <i>long tandem repeats</i> (LTR) identifiés comme marqueurs de susceptibilité à la polyarthrite rhumatoïde
	Récepteur au TNF de type 1	<i>TNFRSF1A</i>	SNP	Variant rs1800693 (intron 6) associé au risque de sclérose en plaques
	Récepteur au TNF de type 2	<i>TNFRSF1B</i>	SNP	Variant M196R associé à une bonne réponse thérapeutique aux antagonistes du TNF-α
	IL-28B	<i>IFNL3</i>	SNP	Variant C/C rs12979860 (séquence 5') associé à une bonne réponse au traitement de l'hépatite C par interféron-ribavirine et à une clairance naturelle du VHC

- En clinique : l'étude du polymorphisme génétique s'applique aux activités enzymatiques, avec perte ou gain de fonction, aux fonctions immunologiques, avec les modifications associées pouvant affecter l'efficacité d'une thérapie ciblée (pharmacogénétique) ou la protection vis-à-vis d'une infection, ainsi qu'aux polymorphismes de l'ADN en déséquilibre de liaison à des gènes de causalité.

## Transfections cellulaires/ expression conditionnelle

### Transfections cellulaires d'ADN

La transfection est une procédure qui permet l'introduction d'acides nucléiques étrangers dans des cellules. Cet outil est utilisé pour l'étude de la fonction des gènes, de leur régulation et de leurs produits, les ARN messagers et les protéines.

On distingue deux types majeurs de transfections. Une transfection dite stable introduit le matériel génétique dans le génome de l'hôte et l'expression du transgène est maintenue même lorsque les cellules transfectées se répliquent. À l'inverse, les gènes transfectés de façon transitoire sont exprimés pour une période de temps limitée et ne sont pas intégrés dans le génome. Le choix de la transfection stable ou transitoire dépend de l'objectif de l'expérience.

La transfection permet de produire des protéines recombinantes dans des cellules de mammifères ou de procaryotes. C'est aussi un outil fin pour augmenter ou inhiber l'expression d'un gène ciblé dans des cellules spécifiques et analyser son rôle. Il est également possible d'étudier la localisation intracellulaire des protéines codées par le transgène et les conditions de leur adressage.

### Méthodologie

De nombreux procédés de transfection ont été développés reposant sur des méthodes biologiques, chimiques ou physiques. La technique est choisie en fonction de son utilisation *in vitro* ou

*in vivo*, du type de cellule utilisée et de l'objectif de l'expérimentation. Les cellules utilisées peuvent être des procaryotes ou des eucaryotes, des cellules primaires, des lignées cellulaires, des cellules immunitaires, des cellules issues d'autres organes (*e.g.* rein). Le transgène doit d'abord être extrait ou construit. Cette construction peut être très sophistiquée et associer au gène d'intérêt un ou plusieurs autres gènes. Par exemple, le gène codant pour une protéine fluorescente, la *green fluorescent protein* (GFP), permet de repérer visuellement ou en cytométrie en flux les cellules ayant intégré le transgène. Les constructions peuvent aussi contenir des gènes induisant une résistance aux antibiotiques qui permettent ensuite de sélectionner les cellules transfectées en ajoutant cette molécule au milieu de culture. Il est également possible d'inclure des gènes suicides, qui permettent de détruire *in vivo* les cellules transfectées si elles deviennent inutiles ou dangereuses, par exemple en administrant du ganciclovir aux animaux ou aux patients après transfection cellulaire de la thymidine kinase (TK). Enfin, des systèmes encore plus précis permettent de conditionner l'expression du transgène à son intégration dans certains types cellulaires ou à des conditions spécifiques d'activation en fonction d'un promoteur inclus dans la construction. Les recombinases *Cre* sont particulièrement utilisées dans ce cas. Les techniques biologiques impliquent l'insertion de la construction à transférer dans un vecteur d'expression, le plus souvent un virus. On parle alors de transduction. Les techniques chimiques reposent sur la composition cationique du milieu dans lequel est placé l'ADN à transférer. L'ADN est alors inclus dans un complexe chargé positivement, attiré par la surface chargée négativement des membranes cellulaires. Les techniques physiques ciblent directement la ou les cellules à transférer. Il peut s'agir d'une injection directe, de l'utilisation de particules recouvertes d'ADN propulsées de manière ballistique (on parle de fusil/pistolet à gène ou *gene gun*), ou de rayons laser pulsés formant de petits pores dans la membrane par lesquels l'ADN peut pénétrer dans le cytosol. Enfin, une des techniques les plus utilisées se sert du courant électrique pour réaliser une électroporation.

## Recommandations de mise en œuvre

La technique idéale doit avoir une efficacité de transfection élevée, une faible toxicité cellulaire, des effets minimes sur la physiologie normale, être spécifique, facile à utiliser et reproductible.

L'utilisation de vecteurs viraux soulève la question de leur potentiel infectieux ou tumorigène, qui doit être contrôlé en manipulant aussi le génome viral. Ils sont également susceptibles d'induire des réponses immunitaires potentiellement délétères pour la transfection envisagée. L'intégration des gènes apportés par le virus se fait de façon aléatoire dans le génome et peut avoir des effets inattendus comme l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs, l'arrêt de la transcription de gènes importants pour le fonctionnement cellulaire, l'activation d'oncogènes.

Les méthodes chimiques et physiques peuvent être toxiques pour les cellules.

## Avantages/inconvénients

Méthodes	Avantages	Inconvénients
<b>Biologiques :</b> Vecteurs viraux, par exemple adénovirus, virus adéno-associés (AAV pour <i>adeno-associated virus</i> ), virus de la vaccine, lentivirus	Très efficaces Faciles à utiliser Utilisables <i>in vivo</i>	Difficiles à construire Risque de mutation insertionnelle Immunogénicité si utilisation <i>in vivo</i> Taille limitée de l'ADN à transfecter
<b>Chimiques :</b> – polymères cationiques : DEAE-dextran, polyéthylèneimine, dendrimères, polybren – phosphate de calcium – lipides cationiques : lipofectine, lipofectamine	Très efficaces Faciles à utiliser Applicables à des tissus Pas de limite de taille pour le transgène	Efficacité variable selon les types cellulaires Toxicité pour certaines cellules
<b>Physiques :</b> – injection directe par micro-aiguille – inoculation par particules ballistiques – électroporation – laser pulsé – nanoparticules magnétiques	Principe simple Faciles d'utilisation <i>in vivo</i>	Nécessite une instrumentation adaptée

## Exemples d'applications

- En recherche : de nombreux modèles expérimentaux reposent sur l'introduction de matériel génétique dans des lignées cellulaires ou des cellules souches embryonnaires pour générer des animaux transgéniques. Un exemple est l'introduction du gène de CD5 dans des cellules B de la lignée Daudi pour mimer des cellules CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup> tumorales (LLC, lymphome du manteau).
- En clinique : des lymphocytes T transfectés pour exprimer un récepteur pour l'antigène (TCR) chimérique spécifique d'antigènes cellulaires (*e.g.* CD19) sont utilisés pour cibler des cellules tumorales. On parle de récepteurs chimériques ou *chimeric antigen receptor* (CAR).

## La transfection d'ARN

Il est également possible de transfecter directement des ARN messagers dans les cellules. Les avantages de ce procédé par rapport à la transfection d'ADN sont nombreux. Il supprime le risque d'intégration dans le génome de l'hôte. L'efficacité de la transfection est indépendante du cycle cellulaire. Il n'est pas nécessaire d'utiliser un vecteur potentiellement immunogène. L'expression est rapide et ajustable en modifiant la quantité d'ARNm transfectée et la fréquence de transfection. Enfin, les ARNm transfectés sont exprimés en quelques minutes car ils ne nécessitent pas de passage par le noyau et la transcription.

La découverte que des petites molécules d'ARN peuvent régir la stabilité et/ou la traduction de l'ARN messager, et par conséquent la synthèse des protéines, a révélé un nouveau niveau de régulation post-transcriptionnelle. Les microARN (miARN ou miRNA) sont de petits ARN non codants qui régulent l'expression des gènes après leur transcription en s'appariant à des séquences complémentaires dans les régions non traduites en 3' des ARNm cibles. Ils font partie du réseau d'ARN modulateurs qui jouent un rôle central dans le fonctionnement des cellules. Les études fonctionnelles indiquent que les miARN sont

impliqués dans la régulation de presque toutes les voies biologiques et que leurs changements d'expression sont associés à plusieurs pathologies humaines, dont les cancers et les maladies auto-immunes. En ciblant les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs, les miARN ont la capacité de moduler les processus cellulaires clés qui définissent le phénotype de la cellule, ce qui en fait des outils thérapeutiques très prometteurs.

## Méthodologie

L'interférence d'ARN (ARNi ou RNAi) est un outil puissant pour induire l'inactivation spécifique d'un gène et en observer les conséquences phénotypiques. Deux voies peuvent être utilisées pour obtenir des ARNi dans une cellule. La première consiste à introduire directement de l'ARN synthétique dans le cytoplasme sous forme de duplex, le plus souvent à l'aide de polymères lipidiques. On parle de petits ARN interférents (siARN ou siRNA, pour *small interference RNA*). La seconde consiste à construire une cassette d'expression dans le noyau, le plus souvent par infection virale. Ses produits sont ensuite exportés dans le cytoplasme sous forme d'ARN en épingle à cheveux (shARN ou shRNA, pour *short hairpin RNA*) ou de pré-miARN. Les ARN interférents forment des complexes capables d'inhiber la formation des produits d'expression des gènes (protéines), on parle de RISC pour *RNA-Induced Silencing Complex*.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Pas d'intégration au génome Transfection indépendante du cycle cellulaire Pas de vecteur immunogène Expression rapide	Fragilité des ARN Sensibilité aux RNAses Interférence avec les réseaux de régulation des ARN

## Exemples d'applications

- En recherche : les technologies de transfection se sont beaucoup développées et sont à l'origine de multiples travaux ayant permis d'élucider le fonctionnement cellulaire. Dans le futur, il est envisagé de pouvoir délivrer des acides nucléiques étrangers (surtout des ARN) dans

des compartiments cellulaires précis comme des axones ou des dendrites, ou dans des organelles comme les mitochondries, l'appareil de Golgi, ou le noyau. La transfection, de façon sûre et fiable, dans un organisme entier ouvre des perspectives thérapeutiques importantes dont les premières applications commencent à se faire jour.

- En clinique : plusieurs essais thérapeutiques ont été développés en utilisant l'interférence ARN pour traiter des cancers, des infections virales ou des anomalies génétiques.

## Protéomique

Sont rapportées ici les grandes lignes méthodologiques nécessaires aux études des protéomes, à savoir les électrophorèses mono- ou bidimensionnelles, la digestion sur gel et l'identification et caractérisation des protéines par spectrométrie de masse (*mass spectrometry* ou MS).

Il est reconnu qu'il n'existe pas toujours, dans une cellule, une corrélation exacte entre la quantité d'ARNm et l'abondance des protéines correspondantes. À la simple traduction de l'ARNm s'ajoutent des mécanismes de modification post-traductionnelle susceptibles de contrôler le taux de synthèse, la demi-vie et la fonctionnalité des protéines. Il est donc important de pouvoir compléter les données de génomique et de transcriptomique par une étude de l'ensemble des protéines ou protéome.

Ce concept de protéome a été introduit par Wilkins en 1994 lors de la première édition de la conférence sur l'électrophorèse bidimensionnelle (2D). Le premier rapport faisant référence à la protéomique est apparu en 1995. La protéomique désigne l'étude du protéome comme l'ensemble des protéines présentes dans une cellule, un tissu, un organe ou un organisme. La protéomique est une étude dynamique, car un génome peut conduire à différents protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de la réponse à différents signaux biologiques ou d'états physiologiques/pathologiques variés. En pratique, la protéomique s'attache à identifier et caractériser les protéines extraites d'un organe, d'un tissu,

d'une cellule ou d'un fluide biologique. Elle vise aussi à définir leur localisation subcellulaire et leur rôle biologique, ainsi que les interactions protéines-protéines, protéines-ADN ou protéines-ARN. La spectrométrie de masse est devenue la méthode de choix pour les études protéomiques grâce au développement des méthodes d'ionisation douce telles que la désorption laser assistée par matrice<sup>6</sup> (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* ou MALDI) et l'électronebulisation (*Electrospray Ionization* ou ESI).

## Protéomique conventionnelle

### Méthodologie

Une analyse protéomique par spectrométrie de masse, réalisée par une approche *bottom-up* ou par une approche *top-down*, est composée des principales étapes suivantes :

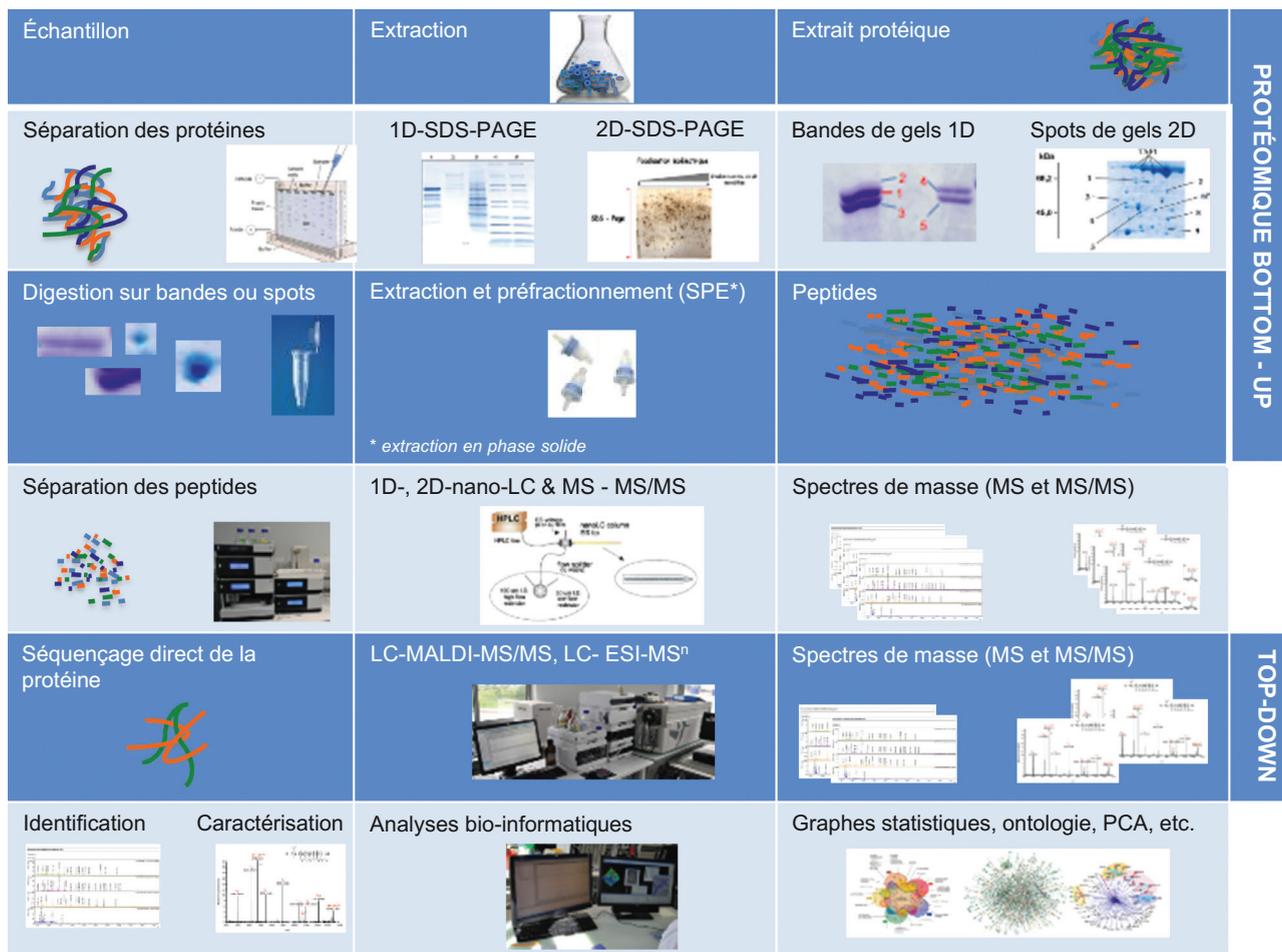
- préparation des échantillons par extraction des protéines à partir de la matrice biologique et décomplexification des extraits par séparation des protéines sur gels d'électrophorèse (1D-/2D-SDS-PAGE pour *1 Dimension/2 Dimensions Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) ou par chromatographie liquide (LC);
- incorporation des protéines à une matrice pour analyse par MALDI ou séparation par chromatographie liquide, couplée ou non à une source ESI, puis spectrométrie de masse simple ou combinée (MS et MS/MS pour *Tandem Mass Spectrometry*);
- interprétation des données : identification, caractérisation ou quantification (fig. 5.11).

La **première étape** consiste à enrichir l'extrait en protéines par l'intermédiaire d'une solution de solubilisation (tampon de lyse) adaptée à l'électrophorèse sur gel ou à la séparation par chromatographie liquide. Ce tampon de lyse est composé d'un agent dénaturant/chaotropique (*e.g.* urée et/ou thiourée), de détergents zwitterioniques

comme le CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) et/ou non ioniques (Triton® X100), afin d'aider à la solubilisation et de prévenir la précipitation des protéines extraites. Des inhibiteurs de protéases sont également ajoutés ainsi que des inhibiteurs de phosphatases. L'extrait protéique est concentré par précipitation à l'acétone ou à l'acide trichloroacétique glacial. Après centrifugation, le culot protéique est solubilisé et les protéines quantifiées. Pour une analyse par électrophorèse 1D- ou 2D-SDS-PAGE, environ 40 à 50 µg de protéines sont mélangées avec du glycérol (10 %) dans le tampon d'électrophorèse. La séparation des protéines par électrophorèse 1D se fait en conditions dénaturantes, l'ouverture des ponts disulfures étant réalisée par les conditions réductrices et le SDS qui se fixe sur les protéines, les dénature et leur confère des charges négatives masquant les charges de la protéine native. La séparation se fait alors uniquement en fonction de la masse moléculaire. La résolution de la migration est obtenue en modifiant la taille des pores du gel par la concentration en acrylamide (10 à 15 %) ou le pH du tampon d'électrophorèse. L'analyse sur un gel 2D combine une isoélectrofocalisation (IEF) dénaturante et une électrophorèse SDS-PAGE. La première dimension est une migration horizontale en fonction du point isoélectrique (pI) des protéines. Cette séparation se fait sur des bandelettes de gel présentant des gradients de pH immobilisés (pH 3–10). Après cette migration, les protéines sont regroupées en fonction de leur pI. Elles sont séparées une seconde fois orthogonalement en fonction de leur masse moléculaire par un SDS-PAGE. Les gels sont colorés (*e.g.* bleu de Coomassie, bleu colloïdal, nitrate d'argent, fluorophore).

Pour la **deuxième étape**, après excision des bandes de gel 1D ou des spots de gels 2D, la(les) protéine(s) est(sont) hydrolysée(s) en fragments peptidiques par la trypsine. Après réduction par le dithiothréitol (DTT) et alkylation des résidus cystéine par l'iodoacétamide, la trypsine est insérée dans les morceaux de gel par déshydratation avec de l'acétonitrile et réhydratation dans le tampon de trypsinolyse : 25 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Après une nuit à 37°C, les fragments tryptiques sont extraits du gel (*e.g.* 50 à

<sup>6</sup> Les trois principales matrices pour les protéines sont l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (4HCCA), l'acide sinapinique (SA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB).



**Fig. 5.11** Paradigme de la protéomique *bottom-up* et *top-down*.  
 PCA : *Principal Component Analysis*.

70% d'acétonitrile en milieu acide). Le mélange peptidique peut être fractionné par nanochromatographie en veine liquide (nano-LC) 1D ou 2D avant analyse en spectrométrie de masse. Il peut également être analysé directement, après incorporation à la matrice sélectionnée, en MALDI-MS ou MALDI-MS/MS (ce qui ajoute une dimension de caractérisation structurale) pour définir une empreinte massique (MALDI-TOF pour le mode linéaire et MALDI-TOF/TOF pour le mode réflectron sur des peptides < 4–5 kDa pour une résolution optimale) représentative de la(des) protéine(s) digérée(s). Cette approche est dite *bottom-up*. Par opposition, une approche *top-down* est utilisée lorsque l'on s'attache à l'identification d'une protéine entière sans digestion enzymatique préalable. Le mélange peptidique est alors analysé par MALDI-MS ou MALDI-MS/MS pour définir une empreinte massique représentative de la(des) protéine(s) digérée(s). Il peut également être fractionné par nanochromatographie en veine liquide (nano-LC) 1D ou 2D avant analyse en spectrométrie de masse. La séparation 1D-nano-LC se fait par chromatographie liquide HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) en phase inverse ou *Reversed-Phase* (RP de type C4, C8, C18), alors qu'en 2D une première dimension d'enrichissement par échange d'ions (cations) ou affinité est suivie d'une RP-nano-HPLC. Les fractions sont éluées par un gradient d'acétonitrile en milieu acide (0,1 % TFA si LC-MALDI-MS ou MALDI-MS/MS, 0,1 % acide formique si LC-ESI-MS/MS).

La **troisième étape**, d'identification et de caractérisation des protéines, se fait par analyse MS et MS/MS sur des équipements présentant différentes géométries. Il existe cinq types d'analyseurs utilisant le temps de vol (*time of flight* ou TOF) des ions, une trappe ionique, un quadripôle, la spectrométrie de masse à transformée de Fourier (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* ou FT-ICR) ou un orbitrap (trappe ionique couplée à un piège à ions). Ces instruments sont équipés de sources d'ionisation de type MALDI ou ESI. L'acquisition des spectres de fragmentation (MS/MS, voire MS<sup>n</sup>) se fait soit

en mode d'acquisition données-dépendant (DDA), soit en mode d'acquisition données-indépendant (DIA). Les fragments obtenus expérimentalement sont comparés à des masses, issues de la digestion théorique *in silico* des protéines, présentes dans les banques de séquences et de la fragmentation théorique des peptides associés (*e.g.* bases Sequest, Mascot, OMSSA, X!tandem). Il existe de nombreux moteurs de recherche pour l'analyse des données de protéomique basée sur une approche dite d'empreinte de fragmentation massique (*Peptide Mass Fingerprinting* ou PMF). Chacun présente ses spécificités et ses critères de score, de qualité, de similitudes entre les données expérimentales et les données théoriques issues des banques criblées.

### Recommandations de mise en œuvre

Les analyses protéomiques sont sensibles aux contaminations par les kératines, omniprésentes sur les cheveux et la peau. Il est donc nécessaire de manipuler en portant des gants à usage unique, une charlotte, un masque et une blouse. Les contrôles positifs et négatifs sont importants afin de minimiser les risques de faux positifs et de faux négatifs pour les analyses protéomiques différentielles. Une protéine comme la sérum-albumine bovine peut être utilisée comme contrôle positif parmi les échantillons afin de monitorer les différentes étapes, de l'enrichissement à la digestion enzymatique des bandes de gels. À titre de contrôle négatif, une bande de gel non colorée peut être prélevée et traitée comme une bande d'intérêt. Ceci permet de vérifier une éventuelle contamination durant la préparation du gel et les étapes de digestion. Il est souhaitable de laver l'ensemble des consommables (tubes, cônes) et les pipettes par de l'eau acidifiée (0,1 % acide trifluoroacétique ou formique), puis par de l'acétonitrile à 50 % et de les sécher à l'alcool. Cette précaution minimise les risques de contamination par les kératines. La découpe de spots ou bandes de gels 2D ou 1D doit être soigneuse car ce carottage peut être extrêmement variable d'une bande ou d'un spot à l'autre, d'un gel à l'autre et même au sein d'une même bande de gel. Il en résulte un risque élevé de variabilité et donc de faux positifs ou de faux négatifs (tableau 5.2).

## Exemples d'applications

Le séquençage et l'annotation du génome de la drosophile ont été achevés en 2000. Alors que les analyses génomiques et transcriptomiques engendraient une somme croissante d'informations sur les séquences et sur l'expression des ARNm, aucune donnée protéomique relative à la réponse immunitaire de la drosophile n'était publiée. Afin d'analyser cette réponse à différents agents infectieux (champignons, levures, bactéries par exemple), une étude protéomique différentielle a été menée (fig. 5.12).

## Protéomique et imagerie MALDI

L'objectif est ici de décrire les principes de l'étude protéomique par imagerie moléculaire ou « histoprotéomique moléculaire » par spectrométrie de masse (MS) et désorption laser assistée par matrice (imagerie MALDI).

L'imagerie MALDI a émergé à la fin du xx<sup>e</sup> siècle. Elle permet de rechercher, d'identifier et de réaliser une quantification relative de

biomolécules, telles que des peptides et des protéines, au sein même de tissus. Contrairement à la protéomique conventionnelle dans laquelle l'information spatiale est perdue, l'imagerie MALDI offre la possibilité de corrélérer la masse moléculaire et l'abondance relative de protéines recensées en spectrométrie de masse avec la localisation de ces informations au sein même du tissu. Il est ainsi possible de repérer en histologie ou en immunohistologie des groupes de cellules d'intérêt (jusqu'à une vingtaine) et d'en cartographier les peptides/protéines par une analyse par MS/MS avec ou sans digestion enzymatique, directement à partir de la zone d'intérêt.

## Méthodologie

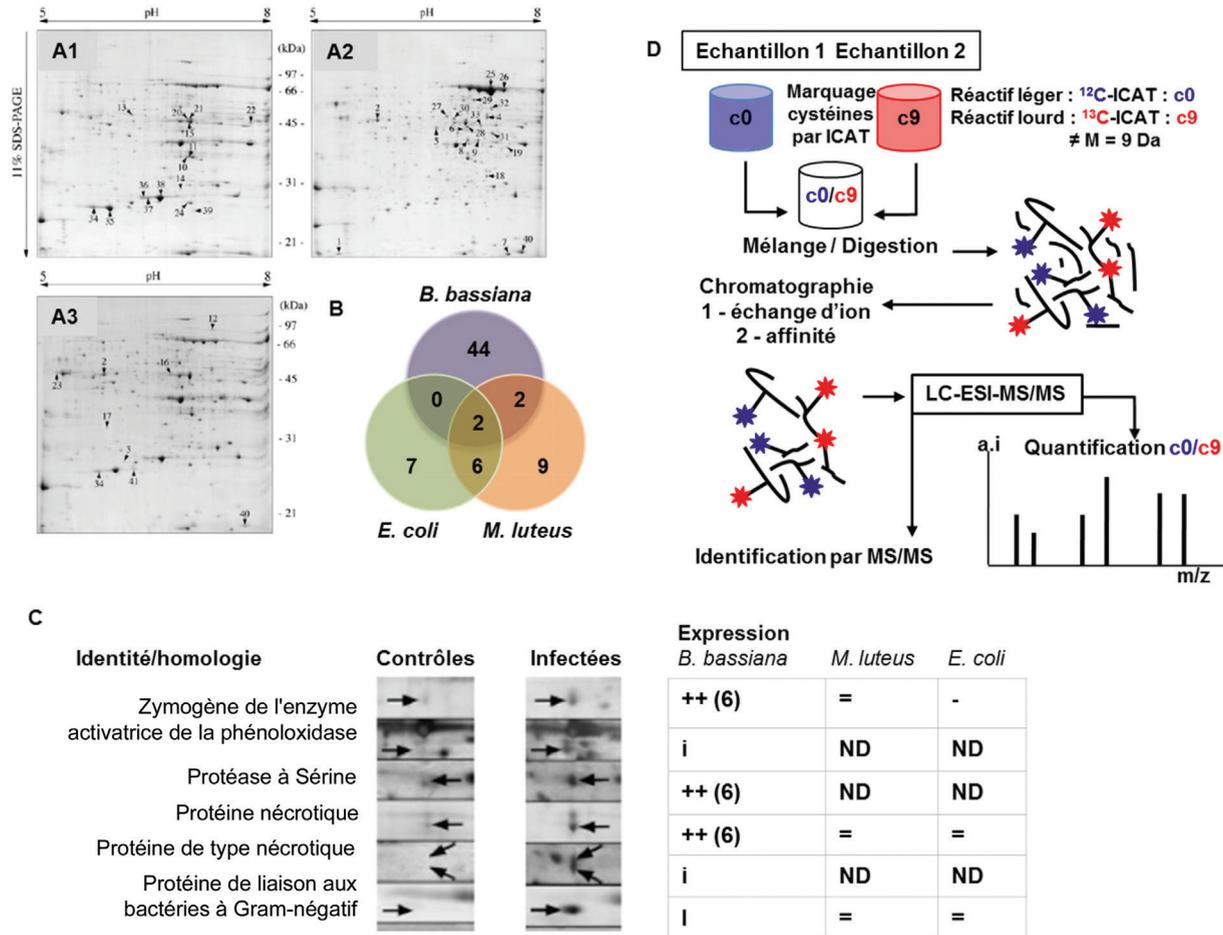
Dans sa composante la plus classique, la procédure d'imagerie MALDI est résumée sur la figure 5.13. Les tissus prélevés sont congelés ou fixés et inclus en paraffine, la congélation étant préférée. Des coupes sont ensuite réalisées à l'aide d'un microtome. Chaque coupe est déposée sur un support

**Tableau 5.2** Avantages et limites des techniques protéomiques *bottom-up* et *top-down*

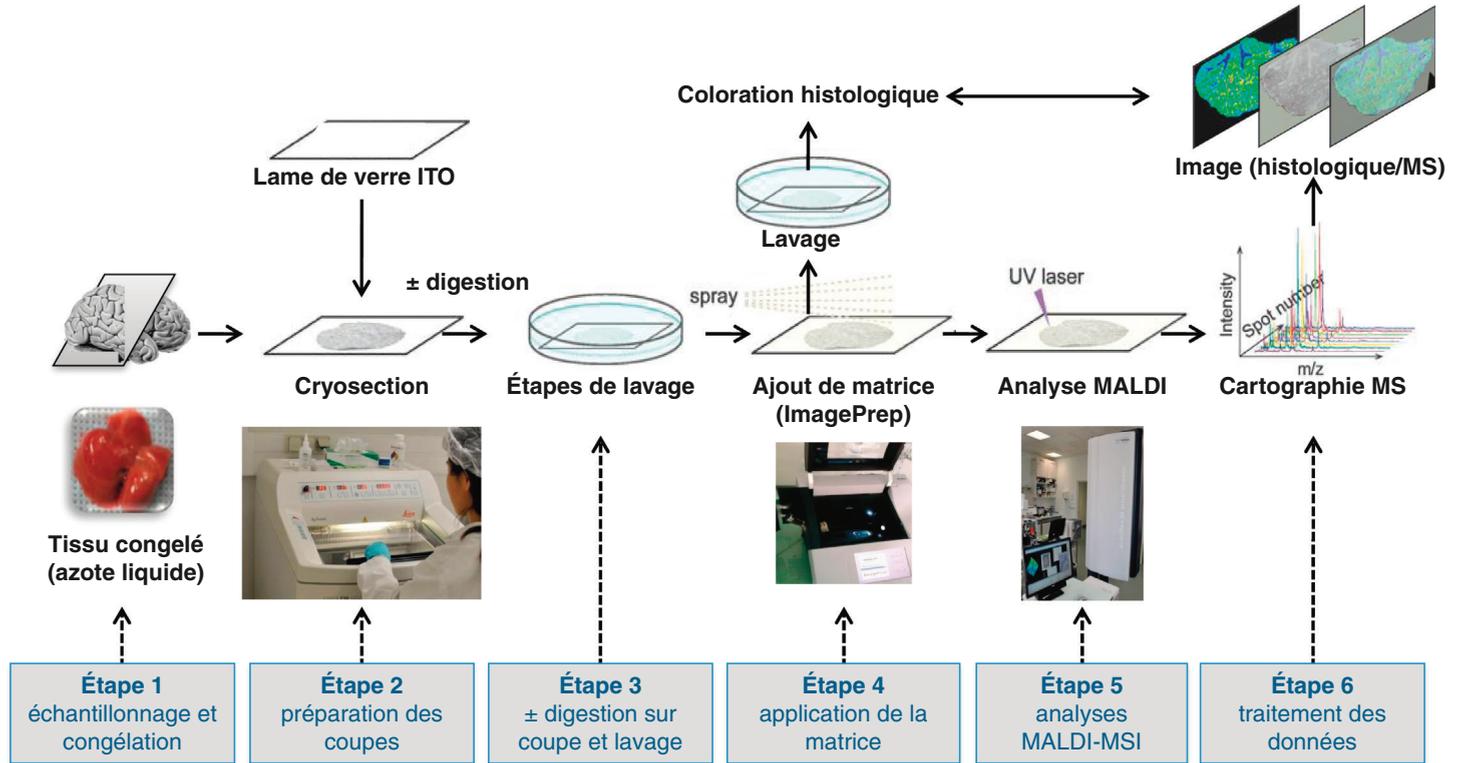
	<i>Bottom-up</i>	<i>Top-down</i>
<b>Avantages</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Approche mature</li> <li>Adaptée aux grosses protéines</li> <li>Permet l'étude des protéines membranaires</li> <li>Études quantitatives possibles avec des tags d'affinité ou des isotopes stables</li> <li>Études différentielles possibles</li> <li>Analyses haut débit</li> <li>Couplage LC-ESI-MS/MS</li> <li>Analyses sur des mélanges complexes</li> <li>Gels commerciaux précoulés</li> <li>Méthodes de coloration variées</li> <li>Large gamme de gels d'isofocalisation</li> <li>La digestion trypsique génère des fragments chargés positivement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Permet d'identifier et de localiser les PTMs sur les protéines</li> <li>Observation de la protéine sur plusieurs états de charge</li> <li>Précision de la mesure</li> <li>Bon recouvrement</li> <li>Moindre sensibilité aux contaminations</li> </ul>
<b>Limites</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Limitée aux protéines de plus de 10 kDa</li> <li>Identification d'isoformes difficile</li> <li>Perte d'informations (localisation, présence de PTMs)</li> <li>Faible couverture de séquence</li> <li>La coloration à l'argent diminue le rendement d'extraction des fragments de digestion</li> <li>Perte de fragments trypsiques</li> <li>Parc instrumental coûteux</li> <li>Difficulté du carottage (spots/bandes), faux positifs et faux négatifs</li> <li>Attention aux contaminations (kératine)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Approche récente</li> <li>Protéines isolées</li> <li>Protéines solubles</li> <li>Taille de la protéine</li> <li>Instrument de haute résolution de 100 000 à 500 000 m/<math>\Delta</math>m*</li> <li>Techniques de fragmentation multiples : CID, ETD, ECD**</li> <li>Environ une dizaine de protéines identifiées par expérience</li> </ul>

\* m/ $\Delta$ m ou FWHM pour *Full Width at Half Maximum peak height* désignant la largeur du pic à 50 % de sa hauteur maximale.

\*\* CID : *Collision-Induced Dissociation* ; ETD : *Electron Transfer Dissociation* ; ECD : *Electron Capture Dissociation*.



**Fig. 5.12** Exemple d'analyse protéomique *bottom-up* de la réponse immunitaire de la drosophile (avec et sans marquage isotopique). L'analyse différentielle consiste à comparer les protéines contenues dans le sang de drosophiles avant et après une infection microbienne. L'inductibilité de la réponse immunitaire chez la drosophile suite à une infection microbienne a été mise à profit dans cette étude. A. Cartes 2D colorées au bleu de Coomassie colloïdal. Infection par : un champignon (A1); une bactérie G + (A2); une bactérie G- (A3). B. Diagramme de Venn représentant la répartition du nombre de spots régulés en fonction de l'agent infectieux. C. Identité de quelques protéines dont l'abondance varie en fonction de l'agent infectieux. D. Deuxième analyse protéomique menée avec un marquage isotopique différentiel ICAT (*Isotope-Coded Affinity Tag*) en solution, digestion enzymatique, prépurification par chromatographie d'affinité et séparation des fragments peptidiques par LC-ESI-MS/MS.



**Fig. 5.13** Déroulé expérimental de l'approche d'histoprotéomique moléculaire par imagerie MALDI (six étapes fondamentales).

Étape 1 : collecte de l'échantillon et cryoconservation. Étape 2 : préparation au cryomicrotome de la coupe histologique déposée sur une lame conductrice ITO (oxyde d'indium étain). Étape 3 : digestion enzymatique optionnelle, puis lavage de la coupe en particulier pour éliminer les lipides. Étape 4 : application de la matrice (nébulisation ou goutte). Étape 5 : analyses par MALDI en mode linéaire positif ou négatif. Étape 6 : traitement des données (cartographie et statistiques) et rendu des images.

conducteur puis délipidée par passage dans des bains successifs de solvants organiques (*e.g.* éthanol, chloroforme, hexane, isopropanol) avec ou sans digestion enzymatique préalable par la trypsin. Après déshydratation et séchage sous vide (20 min), l'extraction sans délocalisation peut être réalisée directement à cette étape en déposant la matrice sur la coupe sous atmosphère contrôlée, afin de permettre l'ionisation et l'acquisition des spectres de masse ( $> 500$  Da). Les données sont acquises en mode linéaire positif/négatif pour l'identification du peptidome/protéome. En cas de caractérisation structurale, des analyses complémentaires en mode réflectron positif sont effectuées. Suite à l'acquisition des données par MALDI-MSI (*Mass Spectrometry Imaging*), la matrice est lavée de la surface de la coupe afin d'effectuer une coloration histologique. Dans les spectres acquis par imagerie MALDI, l'intensité des signaux est matérialisée par une échelle de couleur superposée à la coupe histologique numérisée. Ces spectres sont analysés par des logiciels spécialement développés pour l'imagerie afin de fournir une étude statistique des données acquises par analyse en composantes principales (APC) ou *Principal Component Analysis* (PCA). L'analyse est effectuée en mode non supervisé afin de créer des groupes de spectres représentatifs des ions moléculaires dans la région choisie de la coupe. Dans le cas où des régions histologiques distinctes sont caractérisées sur une coupe, une analyse supervisée peut être réalisée dans les différentes zones d'intérêt. Une classification (*hierarchical clustering*) de l'ensemble des ions détectés sur une coupe histologique par imagerie MALDI permet de détecter des peptides/protéines partageant une localisation commune au sein d'une coupe histologique. La corrélation entre les images MALDI et les colorations histologiques permet la reconstitution de cartes peptidiques/protéiques tridimensionnelles.

### Recommandations de mise en œuvre

La congélation des pièces histologiques à analyser se fait suivant une procédure adaptée à l'imagerie MALDI avec un contrôle précis (température et durée) de la congélation et de la conservation des pièces étudiées. Les coupes de 5 à 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont transférées sur un

support compatible avec les sources MALDI utilisées. Il est préférable que le support soit conducteur pour ne pas altérer les champs électriques en source. Les conditions de dépôt de la matrice doivent être adaptées en fonction de l'échantillon. Dans le cas d'une analyse directe de tissus, des spots discrets de matrice peuvent être réalisés soit par l'intermédiaire d'une micropipette, soit par l'utilisation d'un appareil de microdépôt automatisé. Pour la réalisation d'une image entière, la coupe de tissu doit être entièrement recouverte de matrice soit à l'aide d'une micropipette, soit par vaporisation par un spray pneumatique. La méthode de microdépôt est de plus en plus utilisée pour minimiser la délocalisation des molécules pouvant être entraînées par les solvants. Le choix de la matrice (tableau 5.3) est important pour optimiser l'analyse des composés en termes de nombre de molécules détectées, de résolution des pics, d'intensité du signal et de la gamme de masse accessible. Dans le cas d'une identification, les analyses sont effectuées en mode automatique linéaire positif. Le mode négatif peut être envisagé dans des cas très particuliers de recherche de phosphopeptides. Le mode réflectron positif est utilisé lorsque la coupe de tissu a subi un traitement par digestion trypsique afin d'obtenir la caractérisation des peptides/protéines. Le temps d'analyse est un facteur limitant pour l'acquisition des spectres. Ce temps dépend de la fréquence des tirs laser, de la rapidité de déplacement du support pendant l'analyse et du temps d'acquisition de l'électronique. L'utilisation de lasers pouvant atteindre de grandes fréquences de répétition est particulièrement souhaitable (200–1000 Hz) et permet de prévenir la dégradation de l'échantillon. La reproductibilité du déplacement de la cible support des lames est un paramètre important pour la qualité des images. La résolution spatiale de l'image reconstruite est dépendante du nombre de points d'acquisition. La distance entre deux points doit être au minimum égale au diamètre du faisceau laser. De nombreux paramètres peuvent affecter la reconstruction de l'image, notamment le traitement des données avant extraction (*e.g.* lissage, soustraction du bruit de fond, filtrage).

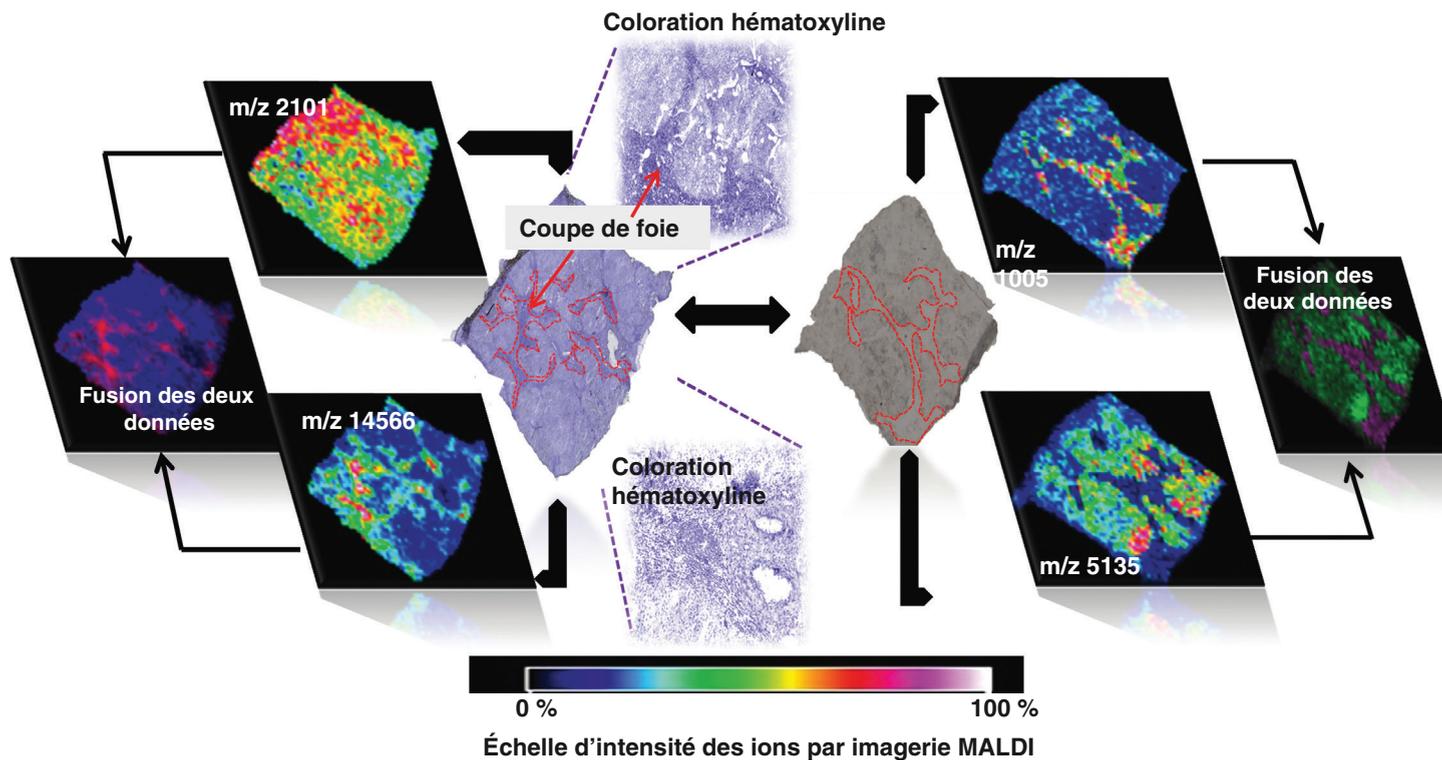
**Tableau 5.3** Matrices utilisées pour l'imagerie MALDI

Matrice	Nom complet	Biomolécules	Aspect de la cristallisation
CHCA	<i><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>	Peptides/polypeptides (< 20 kDa)	Homogène petits cristaux ++
CHCA/ANI	<i><math>\alpha</math>-cyano-4-hydroxycinnamic acid + aniline</i>	Peptides/polypeptides (< 20 kDa)	Homogène petits cristaux +++
DHB	<i>2,5-dihydroxybenzoic acid</i>	Peptides/polypeptides (< 20 kDa) Drogues, lipides	Peu homogène gros cristaux ---
DHB/ANI	<i>2,5-dihydroxybenzoic acid + aniline</i>	Peptides/polypeptides (< 20 kDa) Drogues, lipides	Homogène Faible désorption des protéines +
DHB/3-AP	<i>2,5-dihydroxybenzoic acid + 3-acetyl pyridine</i>	Peptides/polypeptides (< 20 kDa) Drogues, lipides	Homogène Faible désorption des protéines +
SA	<i>3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid</i>	Protéines (> 10 kDa)	Irrégulière Gros cristaux --
SA/ANI	<i>3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid + aniline</i>	Protéines (> 10 kDa)	Homogène +++
SA/3-AP	<i>3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid + 3-acetyl pyridine</i>	Protéines (> 10 kDa)	Homogène +++

### Exemples d'applications

À l'ère des omiques, l'imagerie MALDI ouvre de nouvelles perspectives à la protéomique appliquée en médecine et en biologie. À ce titre, l'imagerie MALDI peut être utilisée pour la recherche de marqueurs de pathologies comme le carcinome

hépatocellulaire. Dans l'exemple montré en [figure 5.14](#), un modèle d'inflammation hépatique chez la souris a été utilisé pour mettre en place la procédure méthodologique avant d'entamer l'étude sur des biopsies de foie humain.



**Fig. 5.14** Exemple d'analyse par imagerie MALDI.

Des coupes histologiques de foie de souris, avec un intérêt particulier sur les zones d'infiltration lymphoïde, sont analysées en MALDI-MSI afin d'effectuer un regroupement (clusterisation) des peptides et protéines exprimés. Une échelle d'intensité des abondances relatives de chacun des ions moléculaires des peptides et protéines ( $m/z$ ) est exprimée par un gradient de couleur à travers la zone d'analyse afin de générer une image moléculaire.

# Chapitre 6

## Tests cellulaires

### Étude cytologique des cellules immunitaires

---

Le décompte et l'analyse microscopique des cellules immunitaires sont des étapes importantes et critiques des investigations utilisant des tests cellulaires. Cela peut intervenir à différents stades des expérimentations, pour qualifier l'échantillon initial ou observer les modifications induites par les tests pratiqués. Le comptage et l'observation phénotypique des cellules immunitaires concernent différents types d'échantillons biologiques : sang, moelle osseuse, liquide céphalo-rachidien (LCR), humeurs vitrée et aqueuse, liquides d'épanchement, liquides de lavage, organes lymphoïdes et tissus dilacérés mécaniquement ou digérés par des enzymes, cultures cellulaires.

### Méthodologie

De façon traditionnelle, les cellules sont comptées sur des lames en verre ou en plastique à l'aide d'un quadrillage délimitant un volume précis ( $0,1 \text{ mm}^3$ ) défini par la profondeur entre la lame et la lamelle (fig. 6.1). Le nombre de cellules par unité de volume est établi par l'observation en microscopie optique. Ces lames sont appelées cellules de comptage ou hématimètres. Les plus usitées sont les cellules de Malassez, de Thoma, de Nageotte et de Neubauer. La coloration des cellules en présence d'une substance ne pénétrant que dans les cellules mortes (*e.g.* bleu trypan) permet de compter précisément les cellules vivantes.

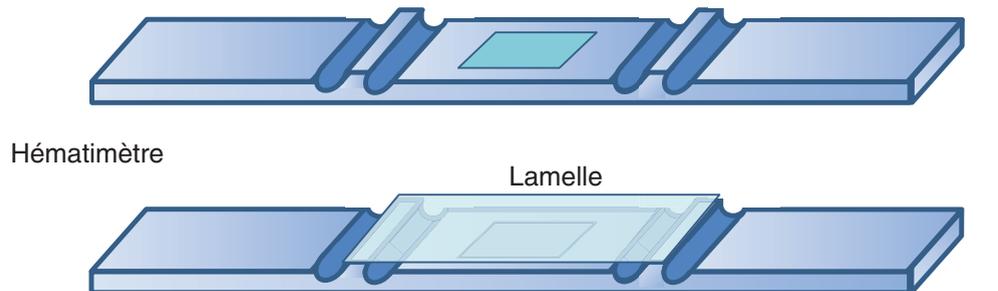
Au milieu du  $\text{xx}^{\text{e}}$  siècle, la découverte du principe Coulter<sup>7</sup> a conduit au développement de compteurs automatiques plus ou moins miniaturisés. Certains sont également capables d'établir la viabilité cellulaire. L'avènement de la cytométrie en flux à la fin des années 1960 a permis la fabrication d'instruments associant le nombre de cellules détectées au volume prélevé. Certains de ces compteurs disposent d'un système s'apparentant à la cytométrie en flux et tiennent compte de la diffraction de la lumière par les cellules et de leur conductivité pour différencier les sous-populations de l'échantillon (*e.g.* lymphocytes, granulocytes ou « polynucléaires », monocytes).

La simple observation en contraste de phase d'une suspension cellulaire entre lame et lamelle, ou au fond d'un puits ou d'une boîte de culture avec un microscope inversé, permet de visualiser la taille, la forme et la granularité des cellules. Lors du comptage cellulaire en hématimètre, l'addition préalable d'un colorant pénétrant dans les cellules et marquant le noyau (*e.g.* colorant de Türk), permet de différencier plus précisément les différents types cellulaires.

La technique la plus classiquement utilisée, en particulier pour les prélèvements sanguins, consiste à déposer puis étaler quelques microlitres de l'échantillon sur une lame de verre, appelé frottis (*e.g.* frottis sanguin). Il est également possible de projeter les cellules sur une

---

<sup>7</sup> Le principe Coulter repose sur la mesure de la différence de résistance électrique (impédance) générée par le passage dans un orifice de cellules en suspension dans une solution saline tamponnée.

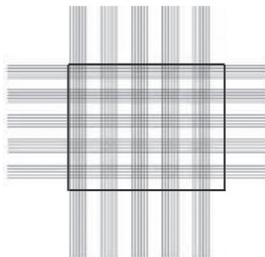


Hématimètre

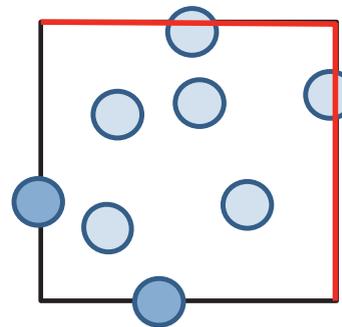
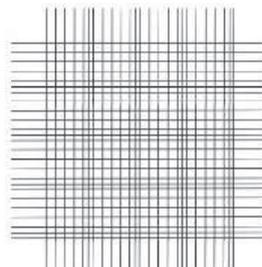
Lamelle

**Cellule de Malassez.**

Dimensions : L : 2,5 mm, l : 2 mm, profondeur 0,20 mm. Constituée de 100 rectangles d'égales surfaces. Le quadrillage total a un volume de 1  $\mu\text{L}$ . Comptage dans 10 carrés et résultat multiplié par 10.

**Cellule de Thoma.**

Le quadrillage total a un volume de 0,1  $\mu\text{L}$ , côté : 1 mm, hauteur : 0,1 mm. 16 grands carrés contenant chacun 16 petits carrés + 4 groupes de 3 lignes horizontales + 4 groupes de 3 lignes verticales. Côté de chaque petit carré : 0,05 mm. Volume délimité par 1 petit carré : 0,00025  $\mu\text{L}$ . Volume délimité par 16 petits carrés : 0,004  $\mu\text{L}$ .



Par convention, les cellules à cheval sur un trait ne sont comptées que sur deux des côtés de chaque carré. Ici on comptera 6 cellules. Les cellules plus foncées seront comptées dans les carrés adjacents.

**Fig. 6.1** Schéma d'une cellule de comptage cellulaire ou hématimètre.

lame de verre par une cyto centrifugeuse, le milieu étant absorbé par un buvard. Les cellules sont concentrées en un disque sur la lame, appelé cytospin ou cyto centrifugat. Après séchage à l'air, les cellules sont fixées et colorées par immersion de la lame dans une série de solutions de colorant tamponnées. À titre d'exemple, la coloration de May-Grünwald-Giemsa fait intervenir le méthanol (fixateur), l'éosine (colorant acide qui se fixe aux structures basiques), le bleu de méthylène (colorant basique qui se fixe aux structures acides) et l'azur de méthylène (colorant métachromatique qui passe du bleu au rouge en contact avec la chromatine et les structures azurophiles). De plus, un marquage de ces cellules avec différents anticorps permet les études par immunocytochimie ou immunofluorescence.

Le microscope s'est aujourd'hui diversifié pour améliorer l'observation des structures. Les microscopes optiques actuels utilisent la lumière directe ou la fluorescence. Les progrès réalisés dans les sources d'excitation, les recueils des fluorescences émises, l'accès à des images de très faible profondeur de champ et la reconstitution informatique des images tridimensionnelles (microscopie confocale) ont considérablement fait évoluer l'analyse cytologique.

Une autre manière d'observer les cellules à une résolution plus forte consiste à utiliser la microscopie électronique à transmission – MET (*Transmission Electron Microscopy* ou TEM) ou à balayage – MEB (*Scanning Electron Microscopy* ou SEM). Dans le premier cas, des coupes ultra-fines de cellules ou de tissus sont fixées dans une résine pour une observation précise des constituants subcellulaires. Dans le second cas, la surface de l'échantillon fixé et éventuellement recouvert d'une fine couche de métal résistant au passage des électrons (*e.g.* or) est visualisée lors de son balayage par le faisceau d'électrons. Ces techniques permettent aussi d'étudier les interactions cellulaires (*e.g.* synapses immunologiques, phagocytose). Enfin, l'utilisation d'anticorps couplés à des particules d'or permet de réaliser des immunomarquages en microscopie électronique.

## Recommandations de mise en œuvre

Les cellules à compter doivent être en suspension homogène dans un milieu tamponné préservant leur structure ou leur survie. Les cellules sont dénombrées sur un échantillon représentatif de la suspension. Il peut être nécessaire de diluer ce dernier, en particulier pour les comptages en microscopie optique, lorsque la suspension est trop riche pour l'individualisation des cellules. À l'inverse, il peut être intéressant de concentrer une suspension cellulaire trop diluée par cyto centrifugation pour disposer du nombre suffisant de cellules dans l'hématimètre et d'une meilleure précision. L'évaluation de la concentration cellulaire rapporte le nombre relevé au volume de l'hématimètre et des dilutions–concentrations éventuelles de l'échantillon. Le volume total de la suspension est considéré pour le nombre absolu de cellules disponibles.

Des précautions sont nécessaires pour minimiser la mortalité cellulaire, notamment en travaillant rapidement après le recueil de l'échantillon (*e.g.* échantillon sanguin vieilli). De même, l'utilisation du bleu trypan nécessite un comptage dans les minutes qui suivent en raison de sa toxicité pour les cellules. Dans le cas particulier de cellules décongelées, il convient d'attendre la restauration de l'intégrité de la membrane cytoplasmique avant d'utiliser les cellules, en particulier pour le comptage en présence de bleu trypan.

Une observation optimale des caractéristiques cellulaires impose de respecter les fonctions vitales des cellules (*e.g.* pH, osmolarité, température). L'observation de cellules en culture (dans leur puits ou leur boîte) ne doit pas perturber les conditions de stérilité et d'atmosphère. Il est impératif de fixer les cellules à observer après leur dépôt sur une lame de verre. Cette fixation rend les cellules adhérentes au support, préserve les structures cellulaires, facilite la pénétration des colorants ou des anticorps et assure une conservation sur le long terme. Les lames peuvent être recouvertes d'une lamelle avec un milieu de montage et scellées (lutage) pour une conservation prolongée.

Dans le cas de populations cellulaires complexes, il est souhaité de déterminer les proportions de chaque sous-population identifiée par ses

caractéristiques morphologiques, en pourcentage. Il faut dans ce cas compter un effectif de cellules suffisant pour obtenir un résultat fiable et représentatif de chaque pourcentage. Par la connaissance concomitante du nombre absolu de cellules dans la population est évaluée la taille de chaque sous-population en valeur absolue.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Approche qualitative et quantitative	Limites de la microscopie nécessitant un entraînement spécifique
Garant de la qualité des techniques ultérieures d'immunologie cellulaire	Petit nombre de cellules examinées (sauf dans les compteurs automatisés)
Techniques d'observation diversifiées apportant plusieurs types d'informations	Préparation et stabilité des colorants
Automatisable	Temps de coloration long Délai à respecter pour la viabilité des cellules Pré-analytique stérile parfois nécessaire

## Exemples d'applications

- En recherche :
  - le comptage des cellules conditionne les tests fonctionnels *in vitro* ou la mise en culture de cellules primaires ou de lignées. C'est également un des indicateurs de l'expansion d'une population en prolifération ;
  - un contrôle morphologique permet de vérifier l'intégrité des cellules ou au contraire leur entrée en apoptose ou en nécrose. Dans le cas particulier des cellules microgliales, la forme des cellules donne des indications sur leur stade d'activation ;
  - la microscopie électronique apporte des informations précieuses sur les structures subcellulaires.
- En clinique :
  - dans les laboratoires d'analyses médicales, les cellules immunitaires du sang circulant sont dénombrées avec l'aide des automates de cytologie qui comptent les leucocytes et les pourcentages de polynucléaires (ou « granulocytes ») neutrophiles, polynucléaires éosinophiles, poly-

nucléaires basophiles, lymphocytes et monocytes. La valeur absolue de chaque population est ensuite calculée. En cas d'anomalies détectées par l'automate, un frottis sanguin est réalisé et coloré au May-Grünwald-Giemsa : les pourcentages et la morphologie de ces différentes cellules sont examinés au microscope optique par un cytologiste ;

- des liquides comme les lavages broncho-alvéolaires ou le LCR sont examinés au microscope après coloration d'un cytocentrifugat.

## Immunophénotypage

L'immunophénotypage consiste à identifier et éventuellement à numérer dans un échantillon de cellules hétérogènes une population particulière, parfois très minoritaire, en utilisant comme sonde des anticorps marqués dirigés contre des antigènes exprimés sélectivement par la population d'intérêt. Les cellules peuvent être en suspension (*e.g.* sang) ou au sein de tissus (*e.g.* coupe) et les antigènes peuvent être membranaires ou intracytoplasmiques, leur identification nécessitant alors une étape de perméabilisation. Les marqueurs les plus utilisés sont des fluorochromes ou des enzymes. Après marquage des cellules, la lecture est réalisée au microscope pour les coupes tissulaires et les cellules adhérentes ou étalées, ou à l'aide d'un cytomètre en flux pour les cellules en suspension.

## Méthodologie

La méthode la plus courante est l'immunofluorescence avec analyse par cytométrie en flux. Les cellules peuvent également être analysées au microscope après avoir été déposées sur une lame. Des techniques directes ou indirectes sont utilisées. Les méthodes directes sont les plus répandues car elles permettent des marquages multiples en incubant les cellules avec un ou plusieurs anticorps, le plus souvent monoclonaux, conjugués à des fluorochromes. Les méthodes indirectes consistent à incuber les cellules avec un anticorps non marqué, lui-même révélé ensuite par un

second anticorps anti-immunoglobuline conjugué à un fluorochrome. Dans ce cas les marquages multiples sont plus délicats, nécessitant d'utiliser des anticorps provenant d'espèces différentes révélés par des anti-immunoglobulines adaptées. Des techniques d'amplification, basées sur l'utilisation de systèmes de type streptavidine-biotine, peuvent être utilisées pour augmenter le signal. Quand la suspension cellulaire à analyser contient une proportion très faible de cellules d'intérêt, le marquage peut être précédé ou suivi d'étapes d'enrichissement comme la préparation de cellules mononucléées par un milieu de séparation. Il est également courant de lyser les globules rouges après marquage pour les échantillons sanguins. La cytométrie en flux permet d'analyser de huit à dix fluorescences de manière simultanée sur un grand nombre de cellules et de réaliser ainsi une analyse statistique quantitative de la répartition des cellules. Les résultats sont exprimés soit en pourcentage de cellules marquées au sein d'une population complexe, soit directement en valeur absolue, en ajoutant à un volume donné de la suspension cellulaire un volume identique de microbilles fluorescentes. Cette technique est directement applicable aux échantillons non enrichis. Il est à noter que, puisque la cytométrie en flux permet d'évaluer l'intensité de la fluorescence, chaque cellule peut être identifiée par la présence ou l'absence de marquage, ou par le niveau d'expression d'un antigène donné : par exemple les sous-populations de cellules NK sont identifiées par des anticorps anti-CD56 en deux catégories, faiblement fluorescentes (CD56<sup>dim</sup>) et fortement fluorescentes (CD56<sup>bright</sup>).

### Recommandations de mise en œuvre

Le délai entre le recueil des cellules et le marquage par les anticorps doit être le plus court possible, de préférence moins de 24 heures. Il existe des stabilisants permettant de différer le marquage jusqu'à 72 voire 96 heures. Il est possible de disperser les cellules contenues dans un tissu, par exemple avec des enzymes, pour obtenir une suspension cellulaire. Il convient alors de s'assurer que le traitement n'altère pas l'expression des antigènes à identifier. Les anticorps utilisés doivent être en

concentration optimale, à la limite de saturation. Le choix des fluorochromes conjugués aux anticorps doit être réalisé avec soin, surtout lors de marquages multiples. Il est ainsi préférable de privilégier des fluorochromes brillants à rendement quantique élevé pour détecter des antigènes faiblement exprimés. Il peut être judicieux d'ajouter des fluorochromes vitaux pour ne pas prendre en compte les cellules mortes susceptibles de fixer les anticorps de manière non spécifique. L'utilisation de billes pour les mesures directes en valeur absolue se fait à l'aide de tubes préremplis contenant les billes et le mélange d'anticorps ou par addition, à la fin du marquage, d'un volume de billes identique à celui de l'échantillon. L'utilisation de billes pour l'évaluation en valeur absolue des cellules d'un échantillon biologique implique de ne pas réaliser d'étape de lavage et d'effectuer une simple lyse des hématies (lyse sans lavage). Les techniques de marquage sont manuelles ou utilisent des automates de préparation.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Techniques rapides et relativement peu coûteuses	Appareillage relativement onéreux
Nombreux anticorps disponibles sur le marché permettant de réaliser des analyses multiparamétriques et d'identifier des cellules rares dans des préparations complexes	Personnel qualifié Délai limité entre le prélèvement et l'immunomarquage
Automatisation possible	Nécessité de disposer de cellules en suspension sans altération de l'expression antigénique
Quantification du niveau d'expression des antigènes	Choix parfois complexe des anticorps pour les analyses multiparamétriques
Mesure des valeurs absolues	

### Exemples d'applications

- En recherche : les techniques d'immunophénotypage ont de nombreuses applications dans l'exploration des modèles expérimentaux ou la caractérisation des mécanismes fonctionnels des lignées cellulaires.
- En clinique :
  - l'immunophénotypage a de très nombreuses applications en immunologie, hématologie, biologie de la reproduction ;

- l'étude des sous-populations lymphocytaires est appliquée au diagnostic des déficits immunitaires congénitaux et au suivi des patients infectés par le VIH, ayant reçu une greffe d'organe ou de cellules hématopoïétiques. L'immunophénotypage permet de : numérer les sous-populations lymphocytaires ; suivre l'état d'immunodépression et/ou apprécier la reconstitution immunitaire ;
- l'immunophénotypage des hémopathies malignes permet de définir la lignée impliquée, le stade de différenciation, le suivi de l'efficacité des thérapeutiques ;
- l'exploration fonctionnelle des cellules circulantes en cytométrie en flux concerne l'étude des capacités de prolifération cellulaire ou de cytotoxicité, la mesure de l'apoptose, l'appréciation des capacités de phagocytose, la détection de l'activation des basophiles...

## Séparation et tri cellulaire

Les méthodes classiques de centrifugation simple ou en gradients de densité sont largement utilisées pour séparer différentes populations cellulaires présentes notamment dans le sang comme les hématies, les leucocytes et les plaquettes. Le développement de nouvelles technologies utilisant des anticorps monoclonaux permet aujourd'hui d'enrichir par sélection positive ou négative une population cellulaire donnée, voire de la purifier à haut niveau grâce aux trieurs de cellules.

## Techniques de séparation par densité

### Méthodologie

Certaines populations cellulaires ont des densités suffisamment différentes pour permettre leur séparation à l'aide de gradients de densité (fig. 6.2). On distingue essentiellement des gradients de densité discontinue dont le plus classique est le Ficoll®. Ce dernier est un glucide ramifié artificiel dont la densité à 20 °C est de

1,077. Il est très utilisé pour isoler les lymphocytes sanguins qui ont précisément cette densité. Dans ce cas, le sang dilué est déposé au-dessus d'une phase de Ficoll®. Après centrifugation entre 400 et 600 g à température ambiante pendant 20 à 30 minutes, les globules rouges et les granulocytes (ou « polynucléaires ») se trouvent dans le fond du tube, en dessous du Ficoll®, tandis que les lymphocytes forment un tapis (ou anneau) à la surface du Ficoll®. Les monocytes restent dans la phase supérieure (plasma + diluant). Le recueil de cette phase et du tapis de lymphocytes permet d'obtenir une suspension de cellules mononucléées dites communément PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Celles-ci sont lavées dans un tampon salin phosphaté (e.g. PBS pour *Phosphate-Buffered Saline*) de façon à éliminer toute trace de Ficoll®, qui peut être toxique pour les cellules si elles y sont exposées trop longtemps.

D'autres gradients tels que le dextran permettent de séparer les granulocytes (ou « polynucléaires ») par simple sédimentation. La densité du Percoll® peut être adaptée à la population que l'on souhaite enrichir (i.e. densité de 1,03 à 1,08).

La technique d'élutriation permet de séparer de grandes quantités de cellules dans de bonnes conditions de stérilité. Elle se réalise dans un élu-triateur qui centrifuge les cellules en gradient de densité avec un prélèvement automatique au niveau des interphases. Cette technique est principalement limitée à des applications cliniques, telles que la séparation de monocytes.

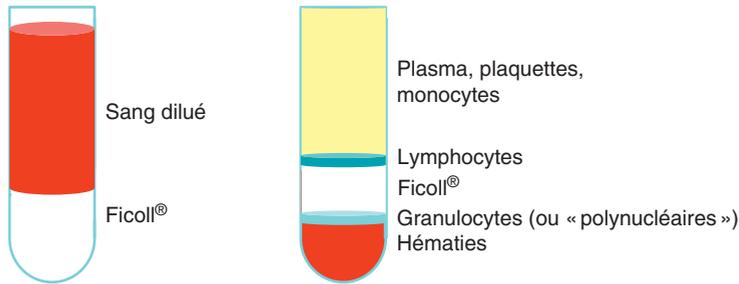
### Recommandations de mise en œuvre

Il faut connaître la densité des cellules à séparer pour effectuer cette sélection correctement en gradient discontinu. Il est particulièrement important de travailler à la bonne température, car la densité varie en fonction de ce paramètre. Ainsi les séparations de lymphocytes sur gradient de Ficoll® doivent s'effectuer à 20 °C et non dans une centrifugeuse réfrigérée.

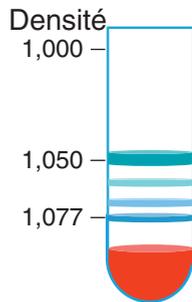
### Exemples d'applications

- En recherche : la séparation de cellules sur gradient de densité est un préalable à de nombreuses techniques d'analyse fonctionnelle des

### Séparation sur gradient de Ficoll®



### Séparation sur gradient de Percoll®



**Fig. 6.2** Séparations en gradients de densité.

lymphocytes. Les suspensions de PBMC contiennent à la fois des lymphocytes et des cellules présentatrices d'antigènes et permettent d'étudier les réponses cellulaires aux antigènes.

- En clinique : comme mentionné plus haut, l'éluatriation est utilisée en biothérapie cellulaire pour séparer les cellules qui sont ensuite injectées au patient.

## Techniques de séparation en phase solide

### Méthodologie

Le principe de la séparation en phase solide est de retenir les cellules soit par une adhérence spontanée, soit par l'intermédiaire d'anticorps ou de lectines fixés sur un support solide.

Certains types cellulaires (*e.g.* monocytes, macrophages) ont la propriété d'**adhérer spontanément** au plastique. Ainsi une simple incubation pendant 2 heures à 37 °C des cellules mononucléées du sang ou de la moelle osseuse permet de faire adhérer au moins 80 % des cellules monomacrophagiques d'une suspension cellulaire préalablement préparée par Ficoll®. Cette technique est très utilisée pour pré-enrichir les lymphocytes présents dans la fraction non adhérente qui sont recueillis avec précaution par un simple lavage. Elle permet aussi de séparer les monocytes/macrophages présents dans la fraction adhérente qui sont ensuite recueillis par lavages en PBS froid contenant un chélateur de calcium (*e.g.* EDTA) et/ou par grattage mécanique (*cell scraper* ou *rubber policeman*).

L'**adhérence immunitaire** ou **panning** consiste à recouvrir préalablement une boîte de Petri à l'aide d'anticorps ou de lectines. Les cellules sont incu-

bées dans la boîte de Petri durant 1 h 30 à température ambiante, permettant la fixation des cellules au fond de la boîte par interaction entre les antigènes membranaires et les anticorps, ou entre la lectine et ses ligands cellulaires. Les cellules non fixées sont ensuite recueillies par aspiration du surnageant et lavages en PBS froid. Il s'agit de la fraction dite négative. Les cellules (fraction positive) ayant adhéré au fond de la boîte peuvent être recueillies par grattage mécanique. Cette technique simple et relativement peu coûteuse permet de pré-enrichir une population cellulaire d'intérêt de façon très spécifique, notamment si des anticorps monoclonaux sont utilisés.

Le **principe des rosettes** est d'entourer les cellules d'intérêt avec des globules rouges et de séparer les rosettes ainsi formées sur un gradient de Ficoll®. Les rosettes se trouvent alors au fond du tube, entraînées par le poids des hématies. Après élimination des autres cellules, les globules rouges peuvent être lysés, et les cellules d'intérêt (enrobées) peuvent être recueillies. Cette technique relativement ancienne a été utilisée pendant longtemps pour enrichir les lymphocytes T humains qui reconnaissent spécifiquement les globules rouges de mouton.

Des **billes** peuvent aussi être utilisées pour séparer les cellules. Ce sont le plus souvent des billes paramagnétiques couplées à des anticorps monoclonaux. Ces billes de taille variable (quelques nanomètres à 3 µm selon le fabricant) sont généralement formées soit de polysaccharide recouvert de ferritine, soit de dextran ou d'époxy recouvert de fer. Le principe repose sur le marquage des cellules avec soit des anticorps monoclonaux directement couplés aux billes (marquage direct), soit des anticorps primaires fixés sur les cellules d'intérêt qui sont ensuite mises en présence d'anticorps secondaires couplés aux billes paramagnétiques (marquage indirect). La séparation des cellules couplées aux billes paramagnétiques s'effectue dans le champ magnétique généré par un aimant. La population spécifiquement reconnue par la réaction antigène-anticorps peut être mélangée aux billes ou déposée sur une colonne remplie d'une matrice de sphères magnétiques. Un champ magnétique est ensuite appliqué et les cellules marquées sont retenues sur la paroi du tube ou

dans la colonne. Les cellules non retenues sont tout d'abord éluées en milieu PBS et recueillies, c'est la fraction négative. Les cellules retenues par l'aimant (fraction positive) sont ensuite recueillies par rinçage après avoir enlevé le champ magnétique. Cette technique est très utilisée soit pour enrichir directement une population cellulaire (sélection positive), soit pour obtenir cette population par élimination des autres populations (sélection négative). La pureté de la suspension obtenue peut atteindre 90 à 95 % selon la fréquence de la population de départ. Toutefois une des limites de cette technique est qu'il n'est généralement possible d'enrichir les cellules par sélection positive qu'à l'aide d'un seul marqueur, car la persistance de billes magnétiques à la surface des cellules empêche de réaliser une deuxième sélection positive. Cette difficulté peut être contournée en utilisant des billes liées à l'anticorps par un pontage clivable par une enzyme. En revanche, il est possible de pré-enrichir une population cellulaire d'intérêt par sélection négative puis d'utiliser, dans un deuxième temps, une sélection positive.

## Recommandations de mise en œuvre

Il est nécessaire de bien choisir sa stratégie de sélection, positive ou négative, en fonction de l'usage ultérieur des cellules, en particulier s'il est souhaité effectuer ensuite des tests fonctionnels qui peuvent être perturbés par la rémanence des billes. La viabilité cellulaire reste en général très bonne.

## Exemples d'applications

- En recherche : le tri cellulaire est très utilisé en recherche fondamentale en préalable à la mise en culture ou pour les tests fonctionnels. Par exemple, un tri des monocytes est nécessaire avant de déclencher leur différenciation en cellules dendritiques par l'addition de facteurs de croissance et de cytokines.
- En clinique : dans le diagnostic de certaines hémopathies où la population pathologique est peu représentée, il peut être utile de la trier au préalable. C'est le cas pour les techniques de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) recherchant la translocation

t(4;14) du myélome au sein des plasmocytes triés sur une colonne CD138. Le chimérisme donneur–receveur dans les suites de greffe de cellules souches hématopoïétiques est également réalisé de façon différentielle après avoir trié les lymphocytes T CD3<sup>+</sup> et les monocytes CD14<sup>+</sup>.

## Tri cellulaire par cytométrie en flux

### Méthodologie (tableau 6.1)

Le trieur de cellules est un cytomètre en flux (voir chapitre 4). La différence consiste en la présence d'un cristal piézo-électrique qui fractionne le jet liquidien contenant les cellules en suspension en gouttelettes individuelles grâce à une vibration à haute fréquence. Les gouttelettes qui passent devant le faisceau laser contiennent ainsi chacune de façon optimale une seule cellule. Ces gouttelettes peuvent être chargées électriquement et ainsi être déviées dans un champ électrique en

fonction du signal recueilli au moment de leur passage et généré par les propriétés de la cellule qu'elles contiennent.

La première phase du tri cellulaire repose ainsi sur une analyse fine et multiparamétrique par cytométrie en flux des populations à séparer. Elle prend en compte, comme la cytométrie en flux classique, la diffraction de la lumière aux petits et aux grands angles, ainsi que des paramètres immunologiques d'expression ou non d'antigènes reconnus par des anticorps fluorescents.

La deuxième phase du tri vise à déterminer, à l'issue de cette analyse, les paramètres permettant de décider quelle(s) est(sont) la(les) population(s) à enrichir ou à éliminer. Les nouvelles générations de trieurs permettent de purifier, à des degrés de pureté supérieure à 99 %, simultanément jusqu'à six populations cellulaires d'intérêt à des vitesses allant jusqu'à 50 000 cellules par seconde, tout en conservant une bonne viabilité cellulaire.

Chaque population cellulaire peut être recueillie stérilement, à condition que la préparation initiale

**Tableau 6.1** Comparaison des techniques de séparation cellulaire

	Gradient de densité	Élutriation	Rosettes	<i>Panning</i>	Tri magnétique	Tri par cytométrie en flux
<b>Enrichissement</b>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
<b>Purification</b>	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
<b>Degré d'enrichissement ou de purification</b>	Bon	Excellent	Bon	Bon	Excellent (pureté > 95 %)	Excellent (pureté > 99 %)
<b>Spécificité</b>	Modérée	Bonne	Modérée à bonne	Bonne	Excellente	Excellente (multimarquages)
<b>Rendement</b>	Excellent	Excellent	Bon	Bon	Variable	Variable
<b>Activation des cellules triées</b>	Modérée	Modérée	Variable (certains tris positifs)			
<b>Viabilité</b>	Bonne	Excellente	Bonne	Bonne	Variable à bonne	Excellente
<b>Stérilité</b>	Possible	Absolue	Possible	Possible	Possible	Possible
<b>Rapidité d'exécution</b>	Très rapide (20 minutes)	Long (> 3 h en moyenne)	Rapide (1 h en moyenne)	Moyen (2 h en moyenne)	Rapide (1 h en moyenne)	Variable (en fonction du nombre de cellules à trier)
<b>Coût</b>	Faible	Élevé	Variable	Variable	Élevé	Élevé
<b>Équipement sophistiqué</b>	Non	Oui	Non	Non	Variable	Oui
<b>Qualification du personnel</b>	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui

le soit, dans des tubes contenant soit un milieu de culture qui permettra de cultiver les cellules après le tri, soit dans un milieu permettant l'extraction d'ARN ou d'ADN. La plupart des trieurs de cellules sont également équipés d'un cloneur permettant le recueil des cellules dans des plaques multipuits (clonage).

Le tri cellulaire par cytométrie en flux est surtout utilisé en recherche. Cette technique extrêmement performante nécessite un appareillage spécifique et coûteux dont le maniement ne peut être fait que par des utilisateurs ayant une formation et une expertise adéquates. Il est important de souligner que la qualité d'un tri cellulaire dépend aussi de la préparation cellulaire de départ quant à son homogénéité, sa viabilité et sa stérilité.

### Recommandations de mise en œuvre

Il est important en amont de maîtriser la préparation cellulaire, surtout si des conditions de stérilité sont nécessaires en aval. La définition des fenêtres d'analyse cytométrique est cruciale, car seules les cellules identifiées comme répondant aux critères du tri peuvent recevoir la charge électrique permettant de les déflécter quelques microsecondes après leur passage devant le système optique.

La viabilité des cellules a longtemps été un problème majeur avec des tris de plusieurs heures. Les nouveaux instruments ont grandement amélioré cet aspect.

### Exemples d'applications

- En recherche :
  - de nombreuses stratégies de recherche peuvent être mises en place après un tel tri. C'est le cas par exemple de l'enrichissement en lymphocytes T régulateurs (Treg) difficiles à isoler par tri magnétique, mais dont les fonctions peuvent être étudiées après séparation en cytométrie (lymphocytes T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>bright</sup>, CD127<sup>low</sup>);
  - un autre exemple est celui de l'isolement de cellules dendritiques plasmacytoïdes CD4<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD123<sup>+</sup>, DR<sup>+</sup>.
- En clinique : comme mentionné plus haut, le tri cellulaire en cytométrie est peu utilisé pour le diagnostic.

## Culture cellulaire et co-cultures

La culture cellulaire permet de maintenir en vie des cellules séparées de leur environnement d'origine. Le terme «culture *in vitro*» est généralement associé à cette technologie. Deux catégories principales de cellules sont utilisées, des cellules dites primaires directement recueillies depuis l'animal ou l'être humain et dont la durée de vie en culture est limitée, et des lignées cellulaires immortalisées ou tumorales qui peuvent être maintenues en culture indéfiniment. La culture cellulaire exige de recréer des conditions nutritives, biochimiques et biophysiques contrôlées, proches de celles dans lesquelles les cellules évoluent naturellement, et de travailler en conditions stériles. Les co-cultures reposent sur la culture conjointe de différents types cellulaires dans le but d'étudier leurs interactions. Les cultures et co-cultures cellulaires sont à la base de nombreux tests classiquement utilisés en laboratoire.

### Méthodologie

La culture cellulaire requiert la manipulation des cellules en condition stérile (poste de sécurité microbiologique ou PSM) afin d'éviter les contaminations par des bactéries, champignons, levures ou virus. De manière générale, les cellules sont mises en culture dans des boîtes, flacons ou plaques en polystyrène dont les surfaces sont éventuellement traitées pour favoriser ou éviter une adhérence des cellules au support. Cette mise en culture se fait dans un milieu nutritif salin, tamponné (pH 7,4) et stérile, dont la composition varie selon le type cellulaire et l'espèce dont proviennent les cellules. Ce milieu est complété par des additifs permettant des apports en nutriments et facteurs de croissance (*e.g.* sérum de veau foetal décomplémenté, glutamine) et par des antibiotiques pour la protection vis-à-vis d'éventuels contaminants. Certaines cellules primaires ou lignées exigent également des facteurs de croissance spécifiques (*e.g.* cytokines) pour se maintenir ou se différencier en culture. Les boîtes, flacons ou plaques multipuits contenant les cellules sont placés dans des incubateurs pour lesquels sont définis la température (37 °C en général), l'hygrométrie (saturation)

et le taux en CO<sub>2</sub> (5 % pour les cellules de mammi-fère). Les contenants ne doivent pas être étanches de manière à assurer les échanges gazeux avec l'atmosphère de l'étuve; ceci est assuré par différents systèmes de circulation des gaz.

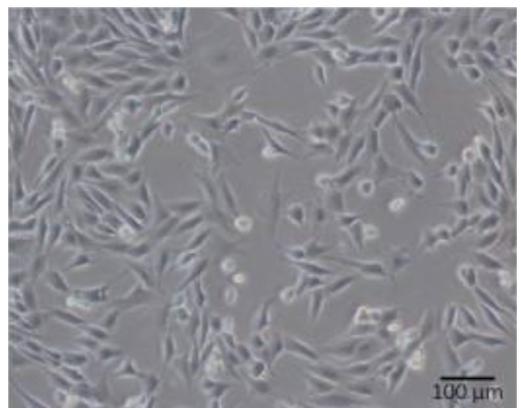
Les cellules en croissance prolifèrent soit en suspension, soit en adhérant au support. Au bout d'un temps variable selon le type cellulaire et la densité initiale, les cellules peuvent atteindre une densité maximale au-delà de laquelle elles ne peuvent plus survivre. Il est nécessaire de collecter les cellules pour les utiliser ou de les diluer pour une nouvelle mise en culture (on parle de passage cellulaire ou repiquage) avant que cette densité maximale ne soit atteinte. Lorsque des cellules adhérentes recouvrent l'ensemble de la surface du support, on dit qu'elles arrivent à confluence. Par ailleurs, l'étape de dilution des cellules adhérentes nécessite de décoller celles-ci du support. Ceci peut être fait soit par décollement mécanique avec un grattoir (*cell scraper* ou *rubber policeman*), soit par action d'un agent de chélation des ions divalents (*e.g.* EDTA) et/ou d'une enzyme (*e.g.* tryp-sine), permettant de rompre les liaisons établies par les cellules avec le support.

Si les cellules d'une culture primaire sont repiquées pour une seconde culture, on parle de culture secondaire. La durée de vie des cellules primaires en culture varie de quelques jours à quelques semaines, à l'exception notable des cellules souches qui peuvent être maintenues pendant des périodes plus longues. La mise en culture des cellules primaires suppose une phase préalable d'isolement et, dans certains cas, de purification. À titre d'exemple, les cellules mononucléées du sang humain peuvent être isolées à partir d'une poche de sang après lyse des globules rouges et/ou centrifugation en gradient de Ficoll®. Une étape de purification peut être utilisée pour sélectionner une population parmi ces cellules (*e.g.* monocytes CD14<sup>+</sup>) par tri magnétique ou cytométrie en flux.

Les lignées cellulaires peuvent dériver de cellules cancéreuses, de cellules embryonnaires (fig. 6.3) ou de cellules immortalisées *ex vivo*, par infection avec un virus par exemple. Elles se maintiennent en culture indéfiniment en se divisant selon un rythme qui dépend de la lignée

considérée et des conditions de culture. La culture de ces lignées impose une dilution régulière, visant à maintenir une concentration cellulaire compatible avec la croissance des cellules et leur utilisation.

Les co-cultures consistent en la mise en culture conjointe de plusieurs types cellulaires. Elles peuvent avoir pour objectif d'analyser la réponse de cellules dites répondeuses suite à leur interaction avec un ou plusieurs autres types de cellules dites stimulantes. Plusieurs types de réponses peuvent être recherchés comme la prolifération cellulaire, la sécrétion de cytokines, la cytotoxicité ou encore la suppression d'une réponse. Une telle analyse suppose d'avoir établi le nombre de cellules à utiliser dans le test, le rapport entre les cellules répondeuses et les cellules stimulantes, ainsi que la technique de mesure de la réponse. Dans certains cas, les co-cultures ont également pour objectif de favoriser la prolifération et/ou la différenciation de cellules difficiles à maintenir, comme les kératinocytes primaires qui se cultivent de façon optimale sur un tapis de fibroblastes produisant des facteurs de croissance. Dans certains cas, il est ainsi possible de réaliser des cultures organotypiques tridimensionnelles, permettant de reconstituer des épithéliums pluristratifiés comme la peau.



**Fig. 6.3** Photographie en microscopie optique à contraste de phase d'une lignée adhérente de fibroblastes de souris (lignée 3 T3-L1) à 70 % de confluence.

Ces cellules ont été obtenues à partir de fibroblastes embryonnaires de souris.

Les cellules peuvent être archivées par congélation en présence d'un cryoprotecteur (*e.g.* DMSO 5–10 %) dans des ampoules conservées dans l'azote liquide. Elles prolifèrent de nouveau après décongélation, élimination du cryoprotecteur et remise en culture.

### Recommandations de mise en œuvre

Il est nécessaire d'observer régulièrement les cellules au microscope afin d'apprécier leur état et leur densité. Dans tous les cas, la mise en culture requiert un comptage préalable des cellules, qui permet de les diluer à la concentration adéquate et de vérifier la viabilité des cellules si nécessaire. Cette numération peut se faire soit au microscope dans des chambres de comptage, soit à l'aide de compteurs automatisés.

Pour éviter que les cellules cultivées et utilisées dans les laboratoires ne dérivent trop par rapport à la lignée d'origine, il est recommandé de relancer régulièrement une culture à partir d'une ampoule du stock initial. Un grand nombre de lignées cellulaires sont référencées et commercialisées par les centres internationaux de référence et de conservation des lignées cellulaires : l'*European Collection of Cell Cultures* (ECACC) et l'*American Type Culture Collection* (ATCC).

Les cultures cellulaires peuvent être accidentellement contaminées par des bactéries extracellulaires ou intracellulaires (*e.g.* mycoplasmes), des levures ou des champignons. Certaines de ces contaminations sont suspectées lors d'un changement de couleur du milieu, lorsque celui-ci contient un indicateur de pH, révélateur d'une acidification (*e.g.* couleur jaune, bactéries) ou d'une alcalinisation (*e.g.* couleur rose, levures), et confirmées par simple observation au microscope. D'autres contaminations (*e.g.* mycoplasmes, virus) peuvent en revanche ne pas être aisément détectées. Le plus souvent, des antibiotiques à large spectre sont utilisés pour prévenir les infections bactériennes. Toutefois, les mycoplasmes ne sont pas sensibles à ces antibiotiques et peuvent infecter les cellules en culture, ce qui peut induire une modification du cycle réplicatif ou des voies de transduction, ou modifier la sensibilité de certains tests. Il est commun de rechercher la présence de

mycoplasmes dans les lignées cellulaires (par coloration des cellules, test enzymatique ou PCR), afin de pouvoir les traiter si nécessaire avec des antibiotiques spécifiques des mycoplasmes.

Le changement de couleur du milieu de culture peut aussi traduire la souffrance cellulaire induite par un simple épuisement des nutriments.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Maintien indéfini des lignées cellulaires	Manipulations en conditions stériles
Stocks de cellules relativement stables permettant des études comparatives à grande échelle	Contrôle des conditions de culture : température, CO <sub>2</sub> , hygrométrie
Co-cultures permettant l'étude fine d'interactions cellulaires	Repiquages/passages fréquents si prolifération rapide
Grande variété de tests applicables aux cellules en culture	Entretien des lignées
	Contaminations par les mycoplasmes
	Viabilité parfois faible des cultures primaires
	Modifications des caractères de certaines lignées cellulaires

### Exemples d'applications

- En recherche : des cellules de mammifères sont cultivées dans la grande majorité des laboratoires de recherche en immunologie. En effet, la culture de lignées est couramment utilisée pour préparer des cellules qui seront utilisées dans de multiples tests (*e.g.* transfection, transduction, cytotoxicité), mais aussi pour produire des anticorps (hybridomes) ou encore des particules virales. Les cellules primaires, isolées de modèles animaux ou à partir de donneurs ou de patients, sont utilisées comme modèles *ex vivo* pour comprendre les propriétés des différents types cellulaires, leurs interactions et les éventuelles modifications qui peuvent être impliquées en pathologie.
- En clinique :
  - les cultures cellulaires sont utilisées pour évaluer la capacité de prolifération des lymphocytes en présence d'un mitogène (recherche de déficit immunitaire fonctionnel) ou d'un antigène (recherche de sensibilisation de l'immunité cellulaire). Les réponses allogéniques peuvent être évaluées dans des cultures mixtes

(*Mixed Lymphocyte Reaction* ou MLR) associant des cellules mononucléées de deux individus différents ;

- les techniques de culture cellulaire sont également à la base du développement des biotechnologies qui permettent de conditionner *ex vivo* des cellules ensuite administrées à leur donneur initial (*e.g.* cellules dendritiques chargées d'antigène) ou à un receveur (*e.g.* cellules souches hématopoïétiques).

## Prolifération cellulaire

L'activation des lymphocytes, spécifique ou non spécifique, *in vivo* ou *in vitro*, conduit à leur prolifération. Les principales stratégies utilisées pour évaluer la prolifération cellulaire reposent sur la détection de la réplication de l'ADN ou sur la mesure de la distribution équitable entre les cellules filles, à chaque division cellulaire, de colorants fluorescents avec lesquels les cellules activées sont initialement marquées.

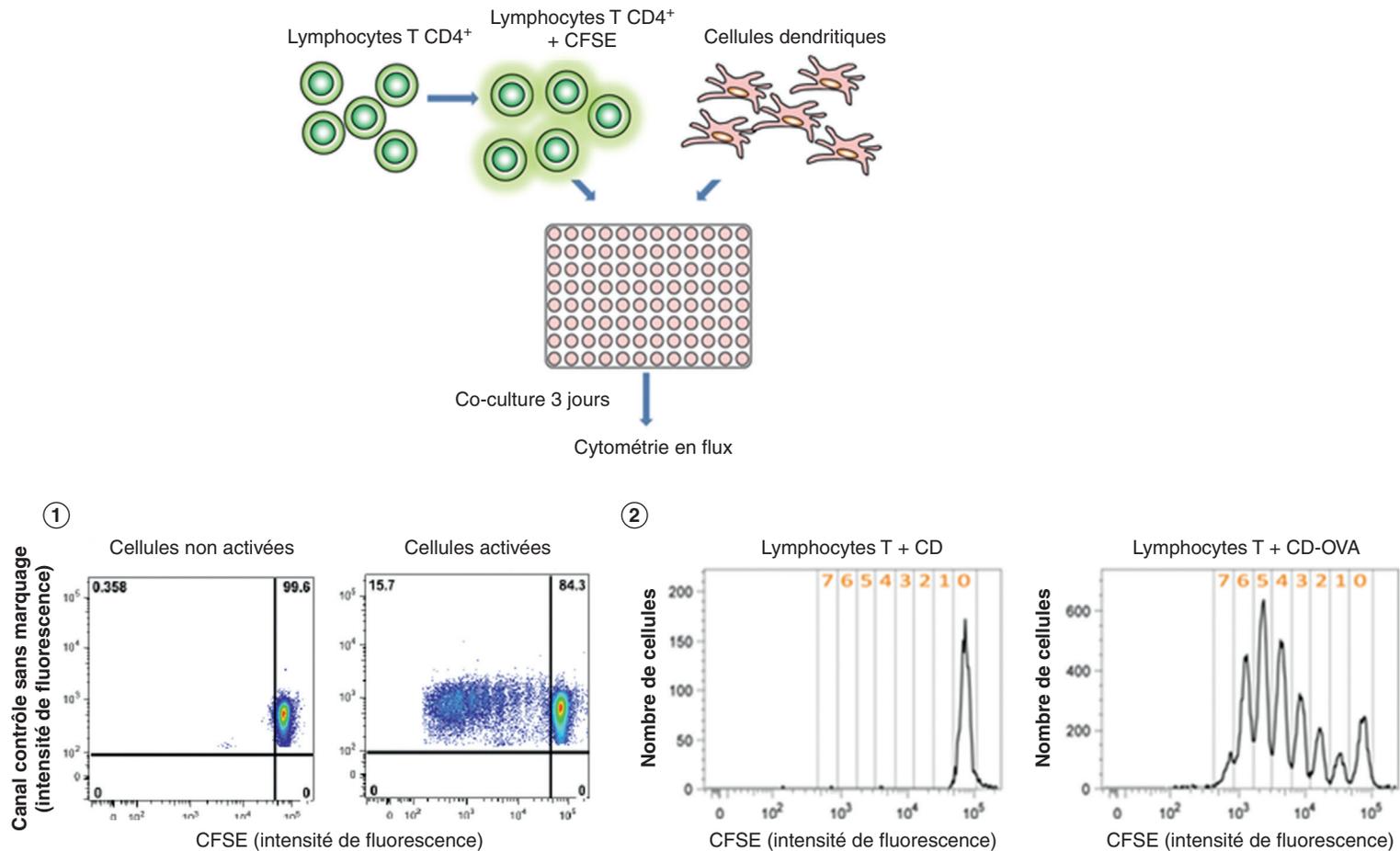
### Méthodologie

La mesure de la réplication de l'ADN consiste à détecter les cellules qui prolifèrent en marquant l'ADN néosynthétisé lors de la phase S du cycle cellulaire. Elle repose sur l'ajout, dans le milieu dans lequel les cellules sont en suspension, de thymidine marquée par un radio-isotope (*e.g.*  $^3\text{H}$ -TdR pour thymidine tritiée) ou d'un analogue de nucléotide, la bromodéoxyuridine (BrdU). Pour les tests *in vitro*, les cellules dont la capacité proliférative doit être mesurée sont isolées et mises en culture dans des conditions de stimulation adaptées. Après 36 à 72 heures de culture, la thymidine tritiée ou le BrdU sont ajoutés au milieu de culture et sont alors incorporés dans l'ADN en cours de réplication des cellules qui entrent en division. Huit à 12 heures plus tard, les cellules incubées avec de la thymidine tritiée sont lavées, lysées et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. Lorsque le BrdU est utilisé, la prolifération est mesurée par immunodétection à l'aide d'un anticorps anti-BrdU, couplé à un fluorochrome ou à une enzyme.

La mise en évidence de la prolifération cellulaire par détection de la réplication d'ADN est également réalisable *in vivo*, dans des modèles animaux. Le BrdU est administré par injection et/ou dans l'eau de boisson, en prise unique ou quotidiennement, selon la nature des cellules à marquer. Les cellules ayant incorporé le BrdU sont détectées par immunocytochimie ou par cytométrie en flux sur des coupes de tissus ou des cellules en suspension. Il est possible de coupler la mesure du BrdU à un immunophénotypage des cellules. Dans certains cas, après plusieurs semaines d'administration, l'apport de BrdU est stoppé et sa dilution dans les cellules filles est suivie.

La détection de la dilution d'un colorant fluorescent dans les cellules filles repose sur le marquage préalable des protéines cytoplasmiques ou membranaires des cellules dont la prolifération souhaite être suivie. Lors de chaque division, ces constituants cellulaires sont distribués de façon égale entre les cellules filles, qui sont donc deux fois moins fluorescentes que la cellule mère. L'intensité de fluorescence des cellules, mesurée par cytométrie en flux, reflète le nombre de divisions qui les séparent des cellules marquées initialement (fig. 6.4).

En pratique, cette technique exige en premier lieu d'isoler les cellules dont la prolifération souhaite être évaluée, souvent des lymphocytes T. Ces cellules doivent être lavées, comptées puis placées en concentration adéquate dans un milieu de culture. Selon le colorant choisi, le marquage résulte de sa liaison covalente aux protéines cytosoliques et membranaires (carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ou CFSE; eFluor 670) ou de son intégration dans les membranes cellulaires (PKH26). L'incubation des cellules avec une concentration de colorant adéquate se fait à l'obscurité pendant 10 à 15 minutes pour les colorants marquant les protéines et en 1 à 5 minutes pour les colorants lipophiles s'intégrant dans les membranes. Le marquage est ensuite stoppé par ajout de sérum de veau fœtal puis les cellules sont lavées. Il est utile de vérifier rapidement à ce stade que les cellules sont marquées de façon intense et homogène. Les cellules marquées sont soit mises en culture dans différentes conditions pour un test de prolifération *in vitro*, soit injectées à un animal



**Fig. 6.4** Mesure de la prolifération de lymphocytes T par dilution du CFSE.

Des lymphocytes T CD4 OT-II, spécifiques d'un peptide de l'ovalbumine de poule (OVA), ont été isolés et marqués avec 5  $\mu\text{M}$  de CFSE pendant 15 minutes.

Après lavage, les lymphocytes ont été mis en culture en présence de cellules dendritiques préalablement chargées ou non en OVA (CD-OVA et CD respectivement), à un rapport de dix lymphocytes pour une cellule dendritique.

① Trois jours plus tard, la prolifération des lymphocytes est visualisée par cytométrie en flux. Pour les lymphocytes cultivés avec des cellules dendritiques ne présentant pas l'OVA (LT + CD), on observe une seule population de lymphocytes intensément fluorescents : ces lymphocytes ne se sont pas divisés. Pour les lymphocytes cultivés avec des cellules dendritiques chargées en OVA (LT + CD-OVA), on détecte huit populations correspondant à des lymphocytes présentant des intensités de fluorescence distinctes.

② Les histogrammes correspondants sont numérotés de 0 (lymphocytes non divisés) à 7 (cellules filles obtenues après sept divisions) en orange. Les logiciels d'analyses permettent de connaître le pourcentage de cellules dans chaque pic et de calculer des index de prolifération.

Il est à noter qu'ici les représentations ① et ② proviennent de deux expériences différentes.

pour le suivi de la prolifération après stimulation *in vivo*. Trois à sept jours plus tard, les cellules sont collectées à partir des puits de culture ou à partir des organes lymphoïdes de l'animal. Pour chaque condition de stimulation, les cellules sont mises en suspension dans un tampon salin additionné de protéines, marquées si nécessaire avec un mélange d'anticorps couplés aux fluorochromes adéquats et enfin analysées au cytomètre en flux. L'analyse des résultats bénéficie de l'existence de logiciels ayant des fonctions dédiées à l'analyse de prolifération par dilution de colorants fluorescents.

Une autre alternative consiste à mesurer la prolifération par l'activité succinate déshydrogénase qui transforme les sels de tétrazolium en formazan jaune. La densité optique du surnageant cellulaire est proportionnelle à la prolifération (fig. 6.5).

La prolifération peut également être mesurée par le marquage de la protéine Ki67 qui est exprimée au cours de la transcription de l'ARN ribosomal dans les cellules en division. Cette technique est surtout appliquée aux coupes tissulaires en immunofluorescence ou en immunohistochimie.

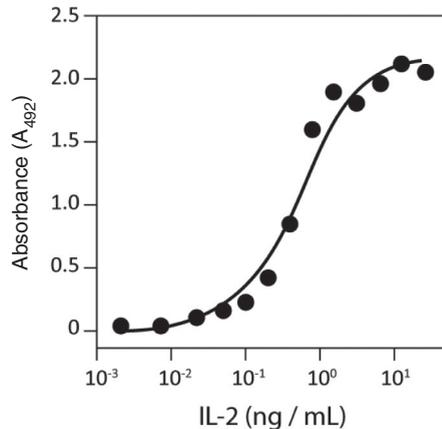
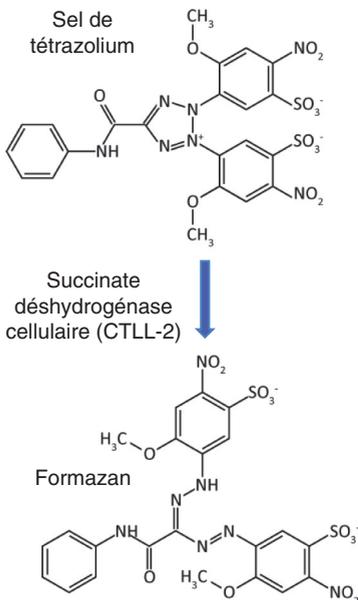
## Recommandations de mise en œuvre

L'utilisation de thymidine tritiée impose le suivi de la réglementation en vigueur en termes de radioprotection. La prolifération par incorporation de thymidine tritiée est exprimée en coups par minute (cpm) ou par un index de prolifération. Ce dernier utilise la formule :

$$\frac{\text{cpm avec stimulation} - \text{cpm sans stimulation}}{\text{cpm sans stimulation}}$$

Les tests sont généralement réalisés en triplicats et il est nécessaire de disposer d'un témoin négatif permettant de définir le bruit de fond de la manipulation et le seuil de détection des signaux spécifiques.

Lors des tests utilisant la dilution du CFSE, il convient de préserver le colorant de l'exposition à la lumière avant le marquage des cellules et de prendre les précautions nécessaires à la manipulation de ce réactif potentiellement toxique. Il faut vérifier l'adéquation entre le laser du cytomètre en flux et le colorant choisi, ainsi que la compatibilité avec les autres fluorochromes éventuellement utilisés. Les pics doivent être bien visibles et le contrôle non stimulé ne doit pas avoir proliféré.



**Fig. 6.5** Mesure de la prolifération par l'activité de la succinate déshydrogénase.

La réaction d'oxydation des sels de tétrazolium par la succinate déshydrogénase produit du formazan détectable par mesure de l'absorbance à 492 nm. Le suivi de A<sub>492</sub> de la suspension de cellules CTLL-2 en fonction de doses croissantes d'interleukine-2 (IL-2) mesure la réponse proliférative.

## Avantages/inconvénients

Méthode de détection de la prolifération		Avantages	Inconvénients
Réplication de l'ADN	incorporation de thymidine tritiée	Sensibilité	Usage de matériel radioactif Ne permet pas d'identifier la population qui prolifère
	incorporation d'analogues de BrdU	Sensibilité Facilement utilisable <i>in vivo</i>	Étape supplémentaire de détection du BrdU Potentiellement mutagène
Dilution d'un colorant fluorescent (CFSE, eFluor670, PKH26)		Facilement utilisable <i>in vivo</i> Identification et analyse phénotypique des cellules en prolifération	Marquage des lymphocytes avant activation Indétectable après sept divisions

## Exemples d'applications

- En recherche : la prolifération a de nombreuses applications pour l'exploration des réponses immunitaires dans des modèles animaux ou de culture cellulaire.
- En clinique : les tests de prolifération aux mitogènes ou aux antigènes sont utilisés pour l'exploration des déficits immunitaires ou des hypersensibilités.

## Cytotoxicité, fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

Les lymphocytes T cytotoxiques (*Cytotoxic T Lymphocytes* ou CTL) sont des effecteurs majeurs de l'immunité adaptative dont le rôle est d'éliminer toute cellule modifiée par un virus intracellulaire ou par transformation tumorale. Ces lymphocytes, par le biais de leur récepteur pour l'antigène (TCR), reconnaissent spécifiquement un complexe peptide-CMH de classe I exprimé à la surface des cellules cibles. Toutes les cellules

nucléées de l'organisme des mammifères expriment à leur surface un CMH de classe I, ce qui permet aux lymphocytes cytotoxiques d'être potentiellement actifs sur n'importe quelle cellule infectée ou transformée. Les mécanismes aboutissant à l'expression de courts peptides linéaires, au sein des molécules du CMH de classe I à la surface des cellules nucléées, sont regroupés sous le terme d'apprêtement. Ce phénomène permet aux protéines intracellulaires cytosoliques, après couplage à l'ubiquitine (ubiquitynilation), d'entrer dans le protéasome qui est un complexe multi-enzymatique cytoplasmique où elles sont clivées en courts peptides d'une longueur de huit à dix acides aminés. Ces peptides sont transportés dans le réticulum endoplasmique par un transporteur spécifique (TAP) et associés à la poche de la molécule du CMH de classe I. Ces complexes sont ensuite exprimés à la surface de la cellule malade pour pouvoir être reconnus par le TCR des lymphocytes T qui leur sont spécifiques. Les peptides liés aux molécules du CMH de classe I peuvent être caractérisés par élution de molécules CMH purifiées, à partir d'extraits cellulaires. Au sein de leur séquence, certains acides aminés situés en position 2, 3 ou 9 correspondent à des points d'ancrage à la molécule du CMH. L'identification de ces acides aminés critiques pour l'ancrage aux molécules du CMH de classe I les plus fréquemment répandues a permis d'établir des algorithmes prédictifs d'épitopes T d'après séquençage.

Une fois reconnue la cellule cible, le CTL, au cours de liens cellulaires étroits, libère le contenu de granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes A et B. Ces cytotoxines conduisent à la lyse des cellules cibles par apoptose. Par ailleurs, l'activation de la cellule T CD8<sup>+</sup> conduit à l'expression membranaire du ligand de FAS (Fas-L). Fas-L, en se liant à son récepteur Fas (CD95), exprimé constitutivement à la surface de la plupart des types cellulaires, induit la mort par apoptose de la cellule cible. Parallèlement à leur activité cytolytique, les CTL produisent, lors de la reconnaissance de la cellule infectée, des cytokines telles que l'IFN- $\gamma$ .

## Méthodologie

Pendant de nombreuses années, le test de relargage du  $^{51}\text{Cr}$  a été le test de référence permettant l'évaluation d'une réponse CTL cytolytique spécifique d'antigène. Pour réaliser ces tests, les cellules cibles, exprimant de façon endogène (infection par le virus étudié, transfection ou infection à l'aide de gènes de la vaccine recombinées avec les gènes d'intérêts) ou exogène (adsorption de peptides) les antigènes d'intérêt, sont marquées avec du  $^{51}\text{Cr}$ . Pour que les CTL soient actifs, la cellule cible utilisée doit être histocompatible avec les cellules effectrices, c'est-à-dire qu'elle doit exprimer les mêmes molécules du CMH. Chez l'homme, cette condition nécessite l'obtention d'une lignée autologue pour chaque sujet étudié. Une solution alternative est d'utiliser des lignées partiellement histocompatibles, ce qui demande soit le typage des molécules du CMH, soit des cellules transfectées avec des molécules du CMH. Une fois incorporé dans les cibles, le  $^{51}\text{Cr}$  change de valence et ne peut plus sortir spontanément des cellules cibles. Après lavage, les cellules cibles ainsi marquées sont déposées en quantité fixe dans les puits d'une plaque de culture à 96 puits et incubées, pendant 4 heures à 37 °C, avec les cellules effectrices supposées spécifiques d'antigène à différents rapports effecteurs/cibles. Un triplicat de chaque rapport effecteurs/cibles est réalisé. Des puits de culture positifs (cibles et détergent) et négatifs (cibles sans effecteurs) sont réalisés en parallèle. La lyse des cellules cibles induit une perte de l'intégrité membranaire et le relargage du  $^{51}\text{Cr}$  dans le milieu de culture. La quantité de radioactivité relarguée dans les surnageants de culture recueillis à l'aide de tampons collecteurs est lue sur un compteur gamma ou bêta et est proportionnelle à l'activité cytotoxique de la population CTL effectrice. Elle est exprimée en coups par minute (cpm). Pour chaque condition, le pourcentage de lyse spécifique est calculé par la formule :

$$\frac{\text{cpm expérimental} - \text{cpm témoin négatif}}{\text{cpm témoin positif} - \text{cpm spontané}}$$

Pour améliorer la sensibilité du test de relargage du  $^{51}\text{Cr}$ , il est souvent nécessaire d'amplifier, *in vitro*, la population des CTL effecteurs par des restimulations successives pendant 15 à 21 jours

avant de réaliser le test. Schématiquement, les cellules mononucléées sont activées une nuit avec de la phytohémagglutinine, lavées, irradiées et remises en suspension pour être co-cultivées avec un autre aliquot de cellules du même sujet en présence de facteurs de croissance des lymphocytes T comme l'IL-2 ou le TGF- $\beta$ . Les cellules sont testées pour leur activité cytotoxique entre le 15<sup>e</sup> et le 28<sup>e</sup> jour. Cette méthode ne permet qu'une évaluation qualitative de la réponse cytotoxique.

Ce désavantage peut être corrigé par l'utilisation de tests en dilution limite (LDA). En effet pendant ce test, des cellules effectrices, préstimulées ou non avec l'antigène d'intérêt, sont mises en culture, à différentes concentrations pouvant aller de 100 000 à 0,1 cellules par puits, pendant 15 jours avant de faire un test de relargage du  $^{51}\text{Cr}$ . Une analyse mathématique permet de donner la fréquence de lymphocytes T effecteurs cytotoxiques spécifiques d'antigène. Cette méthode fastidieuse peut donner des fréquences variables d'une expérience à l'autre, mais elle permet une évaluation du compartiment des CTL.

Ces deux méthodes mesurent la fonctionnalité des CTL effecteurs définie par la lyse des cellules cibles.

Il est également possible de détecter les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigène en utilisant des tétramères de molécules de CMH de classe I couplées à des peptides et conjuguées à un fluorochrome.

Une dernière alternative, qui ne teste pas la cytotoxicité, mais la spécificité des cellules, est la méthode ELISpot décrite par ailleurs.

## Recommandations de mise en œuvre

L'utilisation des méthodes reposant sur le relargage du  $^{51}\text{Cr}$  implique un élément radioactif et donc des contraintes technologiques importantes pour l'acquisition des réactifs et l'élimination des déchets. Par ailleurs, la nécessité d'amplifier la population cytotoxique *in vitro* conduit nécessairement à un biais dans l'évaluation de la fréquence des CTL effecteurs cytotoxiques. Il faut par ailleurs noter que seuls les CTL pouvant survivre, se diviser et maintenir leur fonction cytotoxique en culture pendant 15 à 21 jours sont évalués. Les vrais CTL effecteurs prêts à lyser les cellules cibles,

en phase finale de différenciation après plusieurs cycles de division cellulaire *in vivo*, ne peuvent plus proliférer *in vitro*, mais sont plutôt apoptotiques. Sans restimulation *ex vivo* et lorsque leur fréquence est suffisante, ces méthodes permettent d'analyser la population des CTL effecteurs cytotoxiques, alors qu'après restimulation *in vitro* c'est la population des CTL mémoire qui est évaluée.

Le désavantage majeur de l'utilisation des tétramères est la faible sensibilité de la méthode (1/5000) comparée à la méthode ELISpot (1/50 000) ou à la méthode LDA (1/10 0000). Comme il a pu être montré dans l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV), les fréquences de CTL détectées en test ELISpot sont 5,3 fois plus faibles que les fréquences mesurées en test LDA, et 4,4 fois plus fortes que les fréquences mesurées en utilisant la méthodologie tétramère. L'ELISpot corréle relativement bien avec les fréquences de CTL mesurées en LDA et davantage encore avec l'utilisation des tétramères, alors que la corrélation entre les méthodes tétramères et LDA n'est pas satisfaisante. Comme le montrent de nombreuses études, la méthode LDA sous-estime de 10 à 50 fois la population des CTL effecteurs.

### Avantages/inconvénients

	Avantages	Inconvénients
<b>Relargage du <sup>51</sup>Chrome</b>	Mise en évidence directe de la cytotoxicité Sensibilité Mesure du potentiel mémoire	Charge préalable des cellules cibles en <sup>51</sup> Cr Utilisation d'un isotope Nécessité de restimulations
<b>Dilutions limites</b>	Mise en évidence directe de la cytotoxicité Sensibilité accrue Évaluation du <i>pool</i> effecteur	Longueur du test Stimulation prolongée et en conditions multiples
<b>Tétramères</b>	Moindre sensibilité	Détection de la fixation du tétramère, pas de la fonction cytotoxique Nécessité de connaître le typage HLA du patient
<b>ELISpot</b>	Forte sensibilité	Mesure de la production d'une cytokine Pas de réelle évaluation de la cytotoxicité

### Exemples d'applications

- En recherche : des fonctions cytotoxiques spécifiques sont recherchées en expérimentation animale après infection virale ou administration de cellules tumorales.
- En clinique : ces tests sont utilisés pour évaluer la capacité cytotoxique spécifique vis-à-vis de cellules infectées par *Mycobacterium tuberculosis*, le virus de l'immunodéficience humaine, le cytomégalovirus ou le virus d'Epstein-Barr.

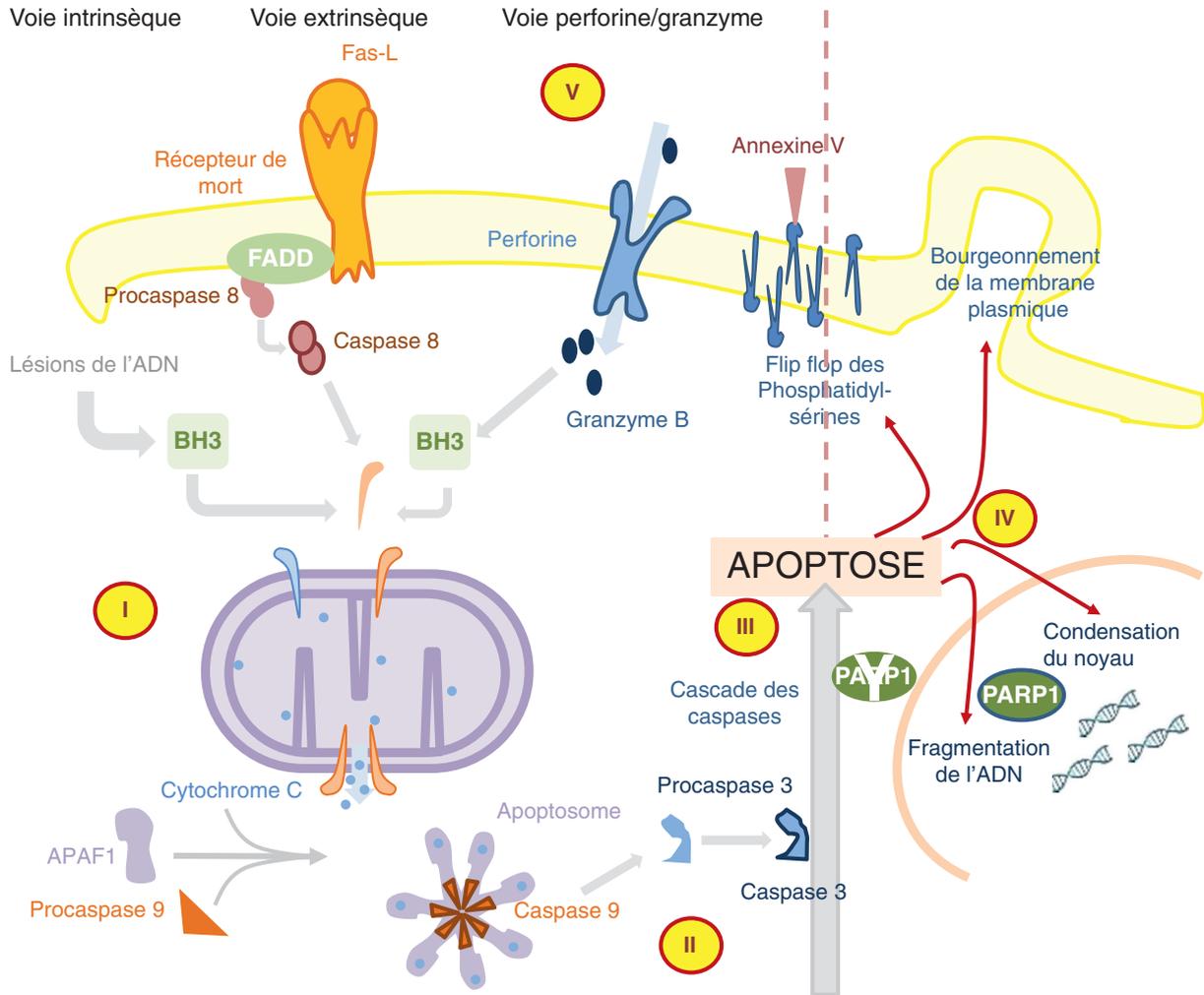
### Apoptose

La mort cellulaire existe sous deux formes principales : la nécrose ou l'apoptose.

La nécrose est une mort cellulaire qui survient lors d'un dommage tissulaire, elle entraîne la rupture des cellules qui déversent leur contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquent une inflammation.

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire programmée déclenché par des événements moléculaires intracellulaires. La cellule apoptotique est en général phagocytée et digérée par les phagocytes sans libération du contenu de son cytoplasme, ne provoquant pas d'inflammation. Les cellules peuvent s'autodétruire lorsqu'elles sont devenues inutiles, endommagées ou dysfonctionnelles.

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie mitochondriale (intrinsèque) et la voie des récepteurs à domaine de mort (extrinsèque) (fig. 6.6). Ces deux voies aboutissent à l'activation d'une famille de protéines, les caspases, qui agissent sur des molécules associées à l'apoptose. Le déroulement de l'apoptose débute par une translocation des phosphatidylsérines du feuillet interne au feuillet externe de la membrane cellulaire, et se poursuit par la condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine, une fragmentation de l'ADN, un bourgeonnement de la membrane plasmique ainsi qu'une perte de l'asymétrie membranaire. Il y a ensuite formation de corps apoptotiques qui sont digérés par les macrophages environnants. Plusieurs techniques, s'adressant à des phases différentes de



**Fig. 6.6** Représentation schématique des mécanismes de l'apoptose.

l'apoptose, sont disponibles. Leur combinaison permet une approche complète du phénomène.

## Mesure des modifications mitochondriales liées à l'apoptose

Les modifications mitochondriales au cours de l'apoptose sont caractérisées par une perméabilisation de la membrane externe via l'action de protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2 induisant le relargage du cytochrome c et d'autres protéines toxiques dans le cytosol. On observe par ailleurs une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire qui peut être mesuré par des sondes potentiométriques en cytométrie en flux.

### Méthodologie

Le 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide, ou DiOC<sub>6</sub>(3), est un colorant qui s'accumule dans les membranes des mitochondries mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique.

Les cellules en suspension à étudier sont traitées ou non par des inducteurs d'apoptose. Les cellules sont comptées et incubées 20 minutes à température ambiante en présence d'une concentration connue de DiOC<sub>6</sub>(3) dans du tampon salin phosphate (PBS). Le marquage mitochondrial est associé à l'utilisation d'un marqueur d'exclusion pour vérifier l'intégrité de la membrane plasmique et les cellules sont donc incubées également 10 minutes avec de l'iodure de propidium (IP), ou du 7-aminoactinomycine D (7-AAD). Les cellules peuvent être immunophénotypées simultanément en les marquant par des anticorps monoclonaux. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux (fig. 6.7). Les cellules vivantes ont une fluorescence mitochondriale forte qui diminue dans les cellules apoptotiques.

### Recommandations de mise en œuvre

Pour avoir des résultats reproductibles, il est indispensable d'utiliser une concentration déterminée

de DiOC<sub>6</sub>(3) pour une quantité de cellules donnée. Il est impératif d'incuber les cellules le temps indiqué pour éviter les marquages non spécifiques.

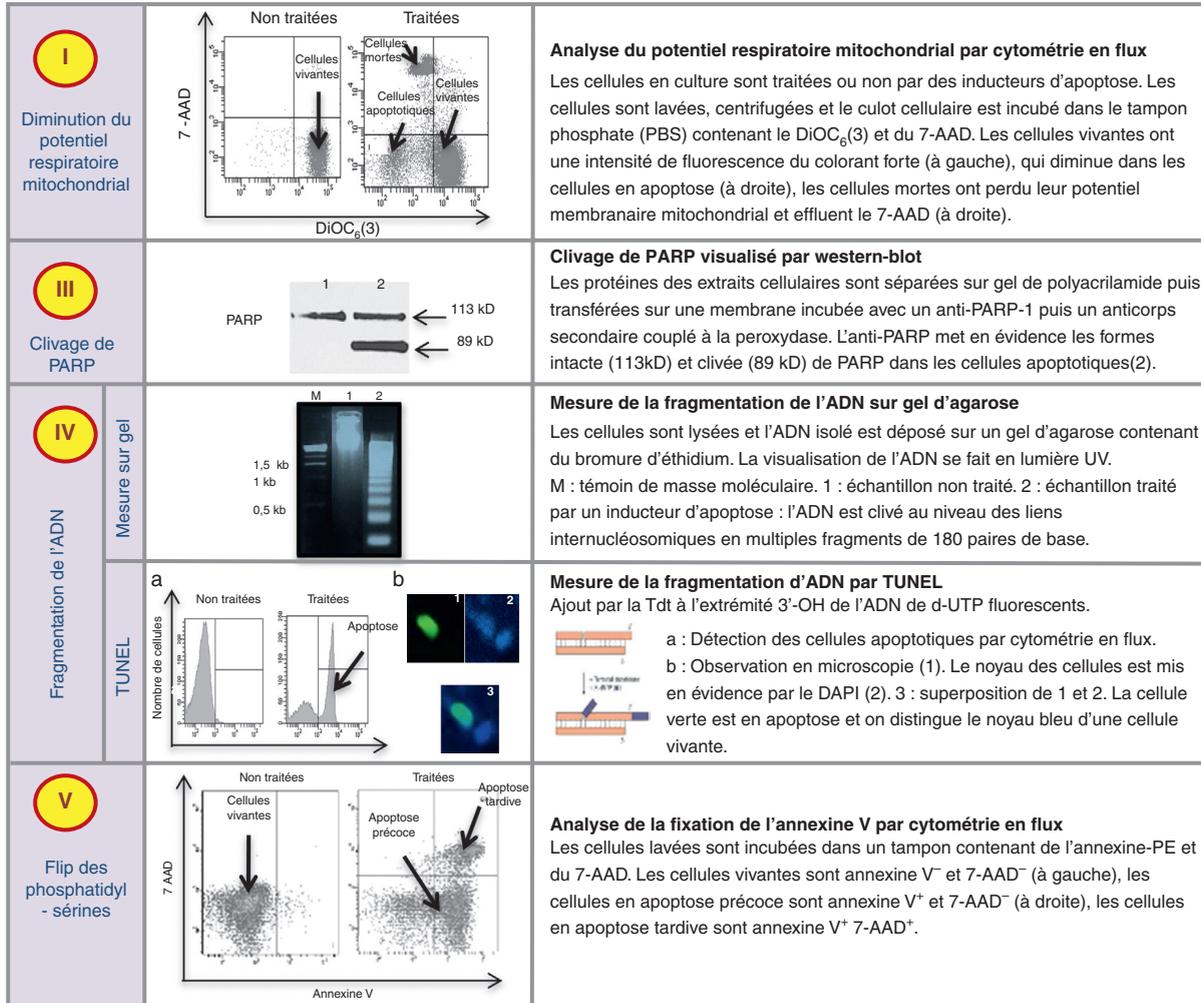
L'utilisation de découplants respiratoires comme le FCCP (carbonyl cyanide p-trifluorométhoxyphenylhydrazone) est indispensable pour évaluer l'existence d'une chute de potentiel mitochondrial (contrôle positif de dépolérisation).

## Évaluation de l'altération des membranes plasmiques liée à l'apoptose

Après un signal pro-apoptotique, les phospholipides et en particulier la phosphatidylsérine (PS) basculent de la face interne à la face externe de la membrane cellulaire et peuvent se lier à l'annexine V. *In vivo*, l'exposition des phosphatidylsérines représente un signal «*eat me*» qui facilite la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages.

### Méthodologie

Les cellules (adhérentes ou en suspension) sont incubées ou non en présence d'inducteurs d'apoptose, lavées et centrifugées. Le culot est remis en suspension dans un tampon contenant de l'annexine V pendant 30 minutes à température ambiante, puis avec de l'IP ou du 7-AAD, 10 minutes avant l'analyse. Les cellules peuvent être immunophénotypées simultanément en les marquant par des anticorps monoclonaux. L'annexine V se comporte comme une sonde fluorescente qui marque uniquement les cellules en apoptose, elle ne se lie pas aux cellules vivantes et ne traverse pas la membrane plasmique. Les molécules d'annexine V peuvent être couplées à différents fluorochromes pour être détectées en cytométrie en flux ou en microscopie à fluorescence. Les cellules vivantes sont double négatives pour l'annexine V et l'IP ou le 7-AAD ; les cellules en apoptose précoce sont annexine V<sup>+</sup> et IP/7AAD<sup>-</sup> et les cellules en apoptose tardive sont annexine V<sup>+</sup> IP/7-AAD<sup>+</sup> (voir fig. 6.7).



**Fig. 6.7** Méthodes d'étude de l'apoptose.

## Recommandations de mise en œuvre

Le marquage par des intercalants de l'ADN comme l'IP ou le 7-AAD est indispensable pour faire la différence entre les cellules apoptotiques et les cellules nécrotiques. L'analyse doit être réalisée dans l'heure qui suit le marquage, sinon toutes les cellules deviennent perméables et sont IP ou 7-AAD positives.

## Activation des caspases et apoptose

Les caspases 3 et 7 peuvent cliver la poly-ADP-ribose polymérase (PARP-1; 113 kD) en fragments de 89 kD qui sont des marqueurs d'apoptose précoce et en fragments de 24 kD qui peuvent être détectés par western-blot.

## Méthodologie

Les extraits cellulaires sont préparés par lyse des cellules dans un tampon de lyse puis par sonication. Les protéines sont ensuite dénaturées dans un tampon contenant du 2-mercaptoéthanol et du sodium dodécyl sulfaté (SDS) en chauffant à 95 °C 5 minutes. Les protéines sont séparées selon leur masse par migration sur gel SDS-polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose. Celle-ci est incubée avec un anticorps (IgG) polyclonal de lapin anti-PARP-1 qui détecte des formes intactes et clivées de PARP-1. Après plusieurs lavages, la membrane est alors incubée avec un anti-lapin conjugué à une enzyme et enfin avec un substrat chromogénique ou chimioluminescent. Cette technique permet la détection de l'apoptose précoce. Contrairement aux deux précédentes, elle étudie l'apoptose globale d'une population et non cellule par cellule. Il est également possible de quantifier la caspase 3 dans des lysats cellulaires par des techniques ELISA.

## Recommandations de mise en œuvre

La membrane doit être incubée avec de la BSA (*bovine serum albumine*) ou du lait pour saturer les sites de fixation non occupés par les protéines

transférées afin d'éviter le bruit de fond avant le transfert. Les lavages de 5 minutes de la membrane sont importants pour éviter le bruit de fond causé par l'anticorps secondaire. Il faut vérifier le temps et le voltage ou l'ampérage lors de la migration électrophorétique en fonction de la masse des protéines afin qu'elles ne sortent pas du gel.

## Étude de la fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose par électrophorèse sur gel de l'ADN génomique

La fragmentation de l'ADN génomique au cours de l'apoptose est un événement irréversible qui induit la mort cellulaire. L'endonucléase clive l'ADN entre les nucléosomes, générant des fragments d'ADN qui forment sur un gel d'agarose une image caractéristique en barreaux d'échelle composés de fragments de multiples de 180 paires de bases.

## Méthodologie

Il s'agit de détecter de l'ADN de faible poids moléculaire (LMW-DNA), augmenté dans les cellules apoptotiques, et de l'ADN de haut poids moléculaire (HMW-DNA), réduit dans les cellules apoptotiques. Le LMW-DNA qui a subi une fragmentation peut être facilement séparé du HMW-DNA. Cette technique est utilisable sur le sang total, les cellules en culture ou sur des tissus après digestion par la protéinase K. Les lysats cellulaires sont placés dans des tubes à filtre en présence d'hydrochlorure de guanidine (agent chaotropique) qui dénature les acides nucléiques. Le support est lavé pour éliminer les impuretés et l'ADN est recueilli par élution dans du tampon salin faible, préalablement chauffé. L'ADN purifié est mélangé avec le tampon de dépôt et déposé sur un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. La migration se fait dans du tampon Tris, Borate, EDTA (TBE) et l'ADN est visualisé sous une lampe à ultraviolets (UV). Là encore, c'est l'apoptose globale de l'échantillon qui est examinée.

## Recommandations de mise en œuvre

Il faut manipuler avec des gants le bromure d'éthidium qui est un intercalant de l'ADN très toxique. Des lunettes de protection et/ou un masque sont nécessaires pour visualiser les gels avec les UV.

## Étude de la fragmentation de l'ADN associée à l'apoptose par méthode TUNEL

Les brins d'ADN cassés générés au cours de l'apoptose peuvent être marqués à leur extrémité 3'-OH par des d-UTP couplés à des fluorochromes (fluorescéine ou TMR pour tétraméthylrhodamine) en présence de terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT).

La méthode TUNEL (*Tdt-mediated X dUTP nick end-labeling*) est la technique la plus sensible pour détecter l'apoptose précoce dans les cellules en suspension ou adhérentes, les frottis ou les tissus congelés ou inclus en paraffine.

## Méthodologie

Les cellules sont perméabilisées pour permettre aux enzymes de traverser la membrane plasmique, puis elles sont incubées avec un mélange contenant des nucléotides modifiés (d-UTP couplé au fluorochrome) et la TdT qui permet la fixation du d-UTP sur l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN. La fluorescence incorporée est analysée par cytométrie en flux ou en microscopie à fluorescence ou optique.

## Recommandations de mise en œuvre

Les cellules sont fixées avec du formaldéhyde et du glutaraldéhyde avant la perméabilisation pour éviter de perdre les petits fragments d'ADN.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
<b>Modifications mitochondriales</b>	
Détection spécifique de l'apoptose par voie mitochondriale Immunophénotypage concomitant	Conditions strictes pour garantir la reproductibilité

<b>Altération des membranes plasmiques</b>	
Distinction apoptose/nécrose Immunophénotypage concomitant	Risque de mort cellulaire si délais trop longs
<b>Activation des caspases</b>	
Détection de l'apoptose précoce	Identification globale de l'apoptose au sein d'une population
<b>Fragmentation de l'ADN</b>	
Immunophénotypage concomitant avec la méthode TUNEL Application possible sur coupes tissulaires	Identification globale de l'apoptose au sein d'une population en western-blot Bromure d'éthidium toxique

## Exemples d'applications

- En recherche : toutes les conditions expérimentales *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* susceptibles d'entraîner une apoptose cellulaire bénéficient des techniques décrites ici pour mettre en évidence cette réaction ou tester des substances capables de l'inhiber.
- En clinique : les techniques de détection d'apoptose sont utilisées pour analyser la réponse des cellules à un stress, à un agent toxique ou à d'autres agressions. Par exemple, l'apoptose permet de mesurer la réponse *in vitro* d'une cellule tumorale à un traitement anticancéreux. Les techniques de mesure de l'apoptose peuvent aussi permettre d'analyser la fonctionnalité des lymphocytes T cytotoxiques vis-à-vis des cellules cibles infectées par un virus. Elles peuvent également être utilisées dans le diagnostic de certaines pathologies. Par exemple, le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X est un déficit immunitaire dans lequel les lymphocytes T cytotoxiques ne meurent pas quand l'infection est contrôlée par le système immunitaire; on retrouve alors une prolifération de ces lymphocytes T liée à un défaut d'apoptose.

## Suppression

Les tests de suppression cellulaire peuvent être réalisés *in vitro* ou *in vivo* et consistent à mesurer la capacité de cellules à inhiber des réponses

immunitaires. Les cellules suppressives peuvent être de différentes origines comme des lymphocytes régulateurs (*e.g.* Treg, Breg), des cellules présentatrices d'antigènes ou des cellules mésenchymateuses. Ces cellules agissent par contact direct et/ou par l'intermédiaire de médiateurs solubles (*e.g.* cytokines) pour inhiber, spécifiquement ou non, l'activité de cellules cibles. L'effet de la suppression peut se traduire par une diminution de la capacité effectrice des cellules ciblées, une inhibition de leur prolifération, leur élimination et éventuellement la disparition de symptômes cliniques *in vivo*.

## Méthodologie

À la suite des travaux de Shimon Sakaguchi ayant décrit les cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en 1995, Angela Thornton et Ethan Shevach ont été les premiers à décrire le test de suppression *in vitro* qui sert toujours de référence. Le principe de ce test consiste à mettre en co-culture les cellules dont on recherche la fonction suppressive, comme des cellules Tregs (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), avec les lymphocytes T conventionnels (*e.g.* CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD127<sup>+</sup>) dont on cherche à inhiber la prolifération et les fonctions effectrices (fig. 6.8). Cette co-culture peut aussi contenir des cellules présentatrices d'antigène afin de stimuler les lymphocytes spécifiques d'un antigène précis.

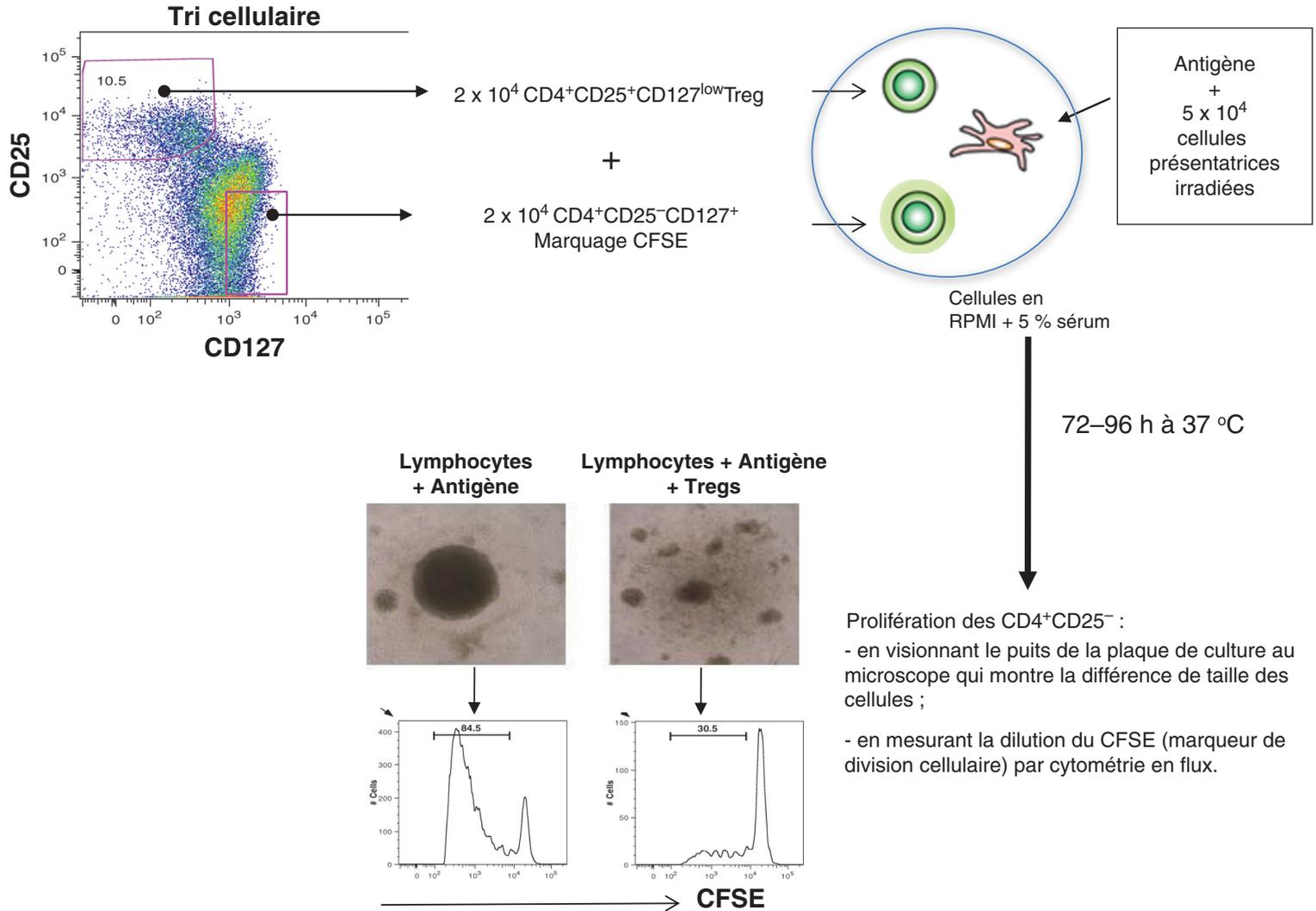
Les cellules mononucléées sanguines totales sont tout d'abord isolées par gradient de densité. Les populations lymphocytaires CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> sont ensuite purifiées séparément sur un cytomètre en flux disposant d'une fonction de trieur (*Fluorescence Activated Cell Sorter* ou FACS), en se basant sur l'immunophénotype différentiel CD25<sup>high</sup>/CD127<sup>low</sup> des Tregs humains et CD25<sup>low</sup>/CD127<sup>high</sup> des cellules T conventionnelles naïves, révélé à l'aide d'un cocktail d'anticorps monoclonaux. Après ce tri, les cellules sont lavées pour éliminer toute trace de chélateur de calcium (*e.g.* EDTA) et mises en co-culture dans des plaques à 96 puits en proportions équivalentes (1:1) ou non (*e.g.* 1:2; 1:10). Pour apprécier la prolifération des cellules T naïves, ces dernières subissent une étape préalable de marquage avec

un colorant cellulaire, par exemple du CFSE (*CarboxyFluorescein Diacetate Succinimidyl Ester*) dont la quantité initiale est répartie également dans les cellules filles à chaque division, ce qui permet de suivre la prolifération cellulaire par cytométrie en flux. À cette co-culture sont ajoutées des cellules présentatrices d'antigènes préalablement irradiées ou dont la prolifération est bloquée chimiquement (*e.g.* actinomycine D), ainsi que l'antigène d'intérêt destiné à stimuler les lymphocytes T conventionnels et/ou régulateurs. Ces cellules présentatrices d'antigènes sont idéalement purifiées à partir du même échantillon biologique, voire lors du même tri cellulaire si l'appareillage disponible le permet, en recueillant les cellules mononucléées n'exprimant pas le marqueur CD3 (*e.g.* lymphocytes B, monocytes et cellules dendritiques, qui sont toutes les trois susceptibles de présenter des antigènes).

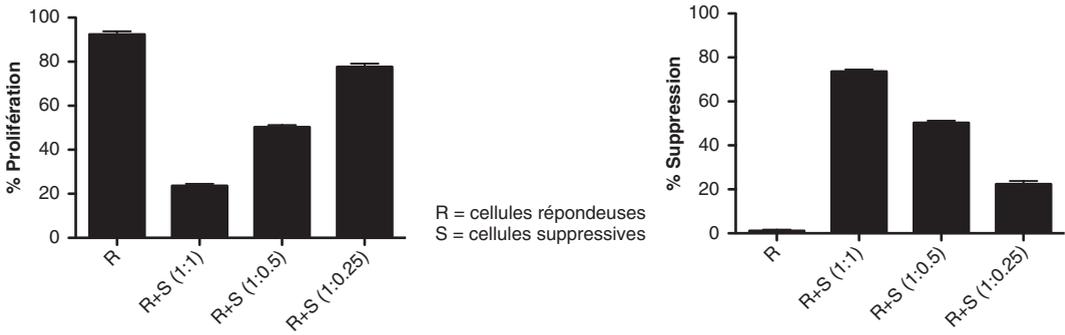
Après culture à 37 °C pendant 72 à 96 heures de ce mélange cellulaire test et des témoins adéquats (en particulier sans Treg), la suspension cellulaire est lavée et marquée de nouveau par un anticorps anti-CD4 afin de repérer par cytométrie en flux la prolifération des cellules T répondeuses (en excluant les cellules présentatrices d'antigène de l'analyse). Si les Tregs sont bien suppressifs, cette prolifération est moindre en leur présence (fig. 6.9). L'effet inhibiteur des cellules régulatrices sur les lymphocytes conventionnels peut aussi être visualisé par un test d'incorporation de thymidine tritiée (<sup>3</sup>H-TdR). Le dosage des cytokines (*e.g.* IL-2) dans le surnageant de co-culture ou la recherche des cytokines intracytoplasmiques dans les cellules répondeuses sont des alternatives à la mesure de la prolifération.

Il est également possible de réaliser ces tests *in vivo* en injectant des Tregs purifiés à des animaux immunisés ou greffés. Si ces cellules sont efficaces, elles inhibent les réponses spécifiques humorales et cellulaires ou la réaction du greffon contre l'hôte.

Cette méthode peut aussi être utilisée pour mesurer la capacité des Tregs à supprimer une réaction allogénique au cours d'une culture mixte entre des lymphocytes T du receveur et des lymphocytes T irradiés du donneur, sans utiliser de cellules présentatrices d'antigène ni d'antigène.



**Fig. 6.8** Illustration d'une suppression *in vitro*.



**Fig. 6.9** Résultats d'inhibition de prolifération des lymphocytes CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> par des Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> spécifiques du même antigène cible.

## Recommandations de mise en œuvre

Une alternative au tri par cytométrie est l'utilisation de billes magnétiques anti-CD25 pour purifier les Tregs, mais elle fait courir le risque d'une contamination par des cellules T effectrices activées qui sont transitoirement CD25<sup>+</sup>, ou par des cellules non lymphocytaires T. En effet, les méthodes d'enrichissement ou de purification des cellules utilisées pour la co-culture peuvent générer une contamination par des populations cellulaires et/ou moléculaires (*e.g.* endotoxines) indésirables.

Les cellules présentatrices d'antigène primaires peuvent être remplacées par une lignée cellulaire disponible dans le commerce.

Les cellules répondeuses peuvent être des cellules naïves ou mémoire. Dans ce dernier cas, il est indispensable de s'assurer qu'elles sont dans un état quiescent avant la mise en culture.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Analyse d'une activité suppressive globale ou spécifique d'un antigène ou d'un tissu Préparation de suspensions cellulaires à visée thérapeutique	Nécessité de connaître l'identité phénotypique (CMH) des cellules suppressives d'intérêt Potentielle conversion immunophénotypique et/ou maturation <i>in vivo</i> des cellules suppressives Lourdeur de la production en grade clinique (BPF/GMP, Bonnes Pratiques de Fabrication) de cellules suppressives spécifiques d'un antigène cible

## Exemples d'applications

- En recherche : les tests de suppression *in vitro* permettent l'analyse des propriétés de nombreux types cellulaires suspectés d'agir par ce mécanisme, dans des modèles animaux ou humains. Les modèles animaux de transfert adoptif de cellules suppressives sont des modèles expérimentaux permettant d'analyser finement les mécanismes de régulation immunitaire, en particulier la spécificité sélective des cellules suppressives.
- En clinique : la manipulation des Tregs en thérapie cellulaire humaine fait déjà l'objet d'essais cliniques, dans le domaine des greffes de cellules souches hématopoïétiques ou en auto-immunité.

## Phagocytose/autophagie

Les divers tests de phagocytose permettent d'évaluer la capacité des phagocytes (macrophages ou granulocytes/« polynucléaires » neutrophiles) à internaliser des micro-organismes. Les tests peuvent comparer différents micro-organismes ou divers types de phagocytes issus de cultures cellulaires, d'échantillons cliniques ou de modèles animaux. Pour l'analyse des phagocytes, des particules inertes telles que des micro-organismes morts ou des particules de latex sont utilisées. Les tests de phagocytose sont souvent quantitatifs.

Les tests de bactéricidie et la production des réactifs oxydants qu'elle implique sont traités dans les sous-chapitres ci-après.

## Méthodologie

Les phagocytes peuvent être issus d'une lignée cellulaire (*e.g.* HL60, PLB985, Raw264), d'une culture primaire (macrophages péritonéaux par exemple) ou être fraîchement isolés (neutrophiles du sang). La phagocytose demande un effort important à la cellule et tout phagocyte affaibli par un temps de préparation trop long, de mauvaises conditions de culture ou une transfection est moins efficace. Les phagocytes doivent se trouver dans un tampon physiologique, ayant un pH neutre, contenant des cations divalents, du glucose et un peu de protéines (0,1 % BSA ou de sérum).

La phagocytose de micro-organismes vivants requiert une culture et une opsonisation immédiatement avant l'expérience. Les particules inertes, bactéries ou levures mortes, ou encore billes de latex, peuvent être préparées ou achetées. On trouve notamment dans le commerce des *E. coli*, *S. aureus* et levures ou des parois de levures (zymosan) marqués à la fluorescéine ou au *Texas Red*. Une opsonisation avec un sérum immun contenant des anticorps contre la particule augmente considérablement l'efficacité de la phagocytose. Les particules sont incubées avec le sérum immun pendant 1 heure à 37 °C sous agitation lente et lavées en PBS. Les particules ainsi opsonisées peuvent être conservées à -80 °C pendant plusieurs mois.

La mise en contact des micro-organismes avec les phagocytes se fait à 37 °C dans un tampon physiologique avec des phagocytes en suspension ou adhérant à un support en verre ou en plastique. Si les phagocytes sont adhérents, leur capacité de phagocytose dépend aussi de leur mobilité pour trouver des particules à internaliser. La phagocytose peut être stoppée en refroidissant la préparation à 4 °C. La détection se fait soit par comptage au microscope soit par cytométrie en flux. La microscopie est simple, donne un aperçu visuel du résultat et permet de réaliser une documentation photographique. Cependant, le comptage est laborieux, surtout si de multiples échantillons sont à tester. La vidéomicroscopie permet de suivre la dynamique de la phagocytose du premier contact entre la particule et le phago-

cyte jusqu'à l'internalisation de multiples phagosomes et sa maturation. La cytométrie en flux requiert un marquage fluorescent des particules et un choix prudent des fenêtres d'analyse (fig. 6.10). Les particules seules et les phagocytes seuls sont les principaux contrôles négatifs. Normalement, ils ont une taille différente qui se distingue en *forward scatter* (FSC).

Dans tous les cas, il faut veiller à la distinction entre les particules adhérant aux phagocytes et les particules internalisées. Même au microscope, cette distinction n'est pas toujours évidente. L'utilisation de particules fluorescentes permet de réaliser un *quenching* de la fluorescence extracellulaire avec un réactif éteignant la fluorescence mais n'entrant pas dans les cellules, laissant intacte la fluorescence des particules internalisées. Le bleu trypan est un bon *quencher* de la fluorescéine.

La quantification de la phagocytose fournit deux informations, le nombre de phagocytes ayant internalisé au moins une particule et le nombre de particules internalisées par phagocyte.

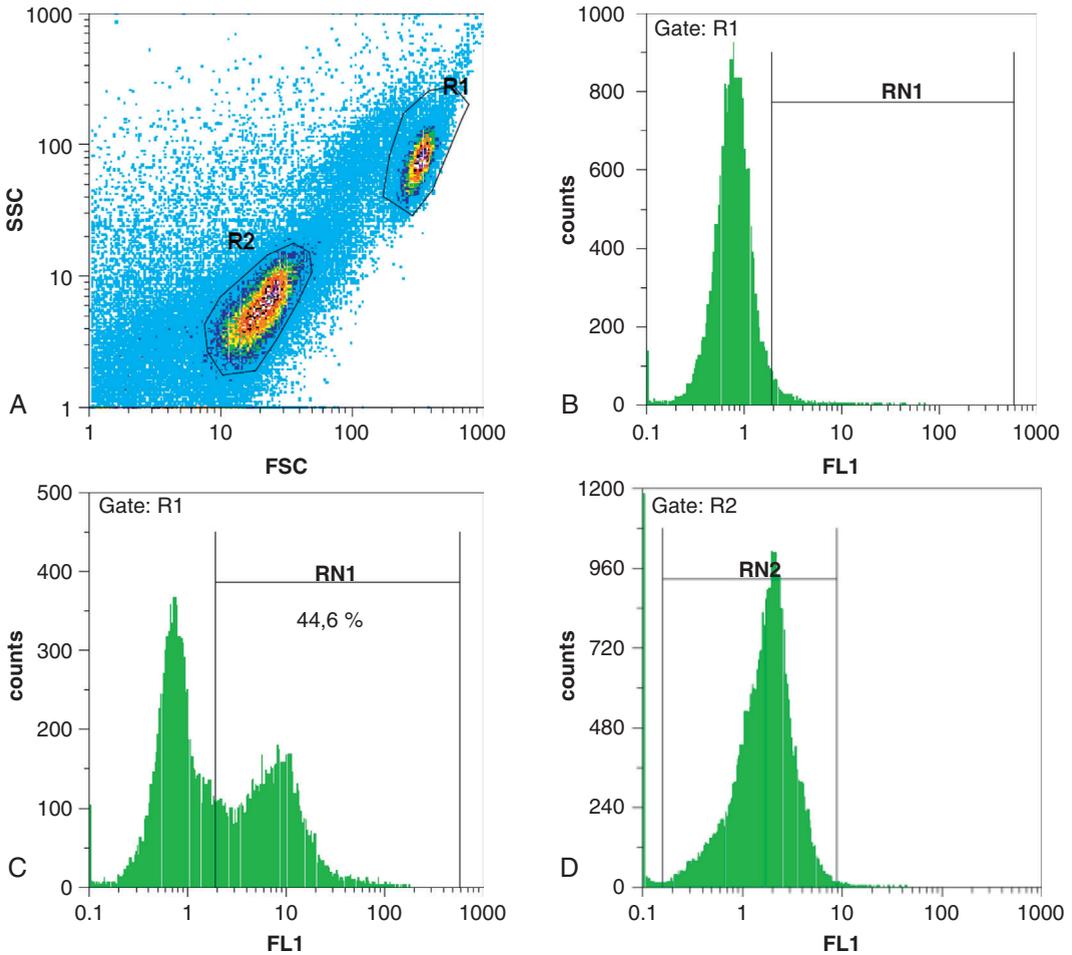
## Recommandations de mise en œuvre

Les résultats sont souvent exprimés en indice de phagocytose (IP) selon la formule :

$$\text{IP} = (\% \text{ de phagocytes contenant au moins une particule}) \times (\text{nombre moyen de particules par cellule})$$

Dans une population de phagocytes, le pourcentage des cellules ayant phagocyté peut dépasser 50 %, mais peut aussi être inférieur à 10 %, par exemple après une transfection transitoire quelques heures avant la phagocytose. Le nombre de particules par cellule dépend fortement du rapport de départ particule/phagocyte (*e.g.* 1:1, 10:1), du temps et de la nature (taille, opsonisation) des particules. Le pourcentage et le nombre moyen de particules phagocytées peuvent varier indépendamment. Pour une analyse fine, l'affichage des deux indicateurs donne plus d'informations que l'indice de phagocytose.

En fonction des conditions du test, le processus de phagocytose implique la migration des



**Fig. 6.10** Des particules de zymosan (préparation de parois de levure *S. cerevisiae*) ont été marquées à la fluorescéine et opsonisées avec un sérum humain.

Les phagocytes (lignée PLB-985 différenciée) ont été incubés avec le zymosan pendant 45 min à 37 °C et ensuite analysés par cytométrie en flux. Phagocytes (R1) et zymosan (R2) se distinguent sur les paramètres morphologiques (FSC et SSC, A). L'autofluorescence (FL1) des phagocytes définit le seuil de détection de cellules ayant phagocyté au moins une particule (RN1, B). L'analyse de la fluorescence (FL1) des particules se fait sur la fenêtre des phagocytes (R1, C). On observe que 44,6 % des phagocytes ont une fluorescence au-dessus du seuil d'autofluorescence et ont donc internalisé au moins une particule de zymosan. La fluorescence du zymosan est analysée sur la fenêtre R2. La fluorescence moyenne des phagocytes est de 10,2 (en RN1, C) et la fluorescence moyenne du zymosan est de 2 (RN2, D). Donc les 44,6 % de phagocytes au-dessus du seuil ont en moyenne internalisé cinq particules chacun.

phagocytes, l'adhérence aux particules (opsonisation, récepteurs du phagocyte), l'internalisation et la digestion des particules. Une différence d'indice de phagocytose entre deux échantillons peut être liée à un ou plusieurs de ces paramètres.

Les conditions drastiques à l'intérieur du phagosome (*e.g.* pH, enzymes, radicaux oxygénés)

peuvent altérer les fluorophores et ainsi modifier le résultat indépendamment du niveau de phagocytose. Ceci est particulièrement important pour les granulocytes (ou « polynucléaires ») neutrophiles. Des contrôles supplémentaires tels que la neutralisation du phagosome avec un ionophore à la fin de la phagocytose sont parfois nécessaires pour interpréter les résultats.

## Avantages/inconvénients

Test	Avantages	Inconvénients
Microscopie	Facile à réaliser Aperçu direct Peu coûteux	Comptage laborieux Variabilité interindividuelle des lecteurs
Vidéomicroscopie	Cinétique de chaque phagocytose Aperçu de la dynamique Documentation en analyse d'image	Appareillage coûteux Optimisation longue des conditions Nombre d'événements analysables limité
Cytométrie en flux	Mesure quantitative sur de grands nombres de cellules Corrélation avec d'autres paramètres comme les marqueurs de surface	Appareillage coûteux Protocoles d'analyse spécifiques

## Exemples d'applications

- En recherche : de nombreux travaux fondamentaux s'attachent à explorer les fonctions des phagocytes.
- En clinique : les tests de phagocytose sont nécessaires pour l'exploration des déficits de l'immunité innée.

## Cas particulier de l'autophagie

L'autophagie est un processus physiologique qui assure l'élimination et le renouvellement des molécules à longue durée de vie et des organites de la cellule. Il contribue ainsi à l'homéostasie cellulaire permettant notamment le recyclage d'éléments nutritifs.

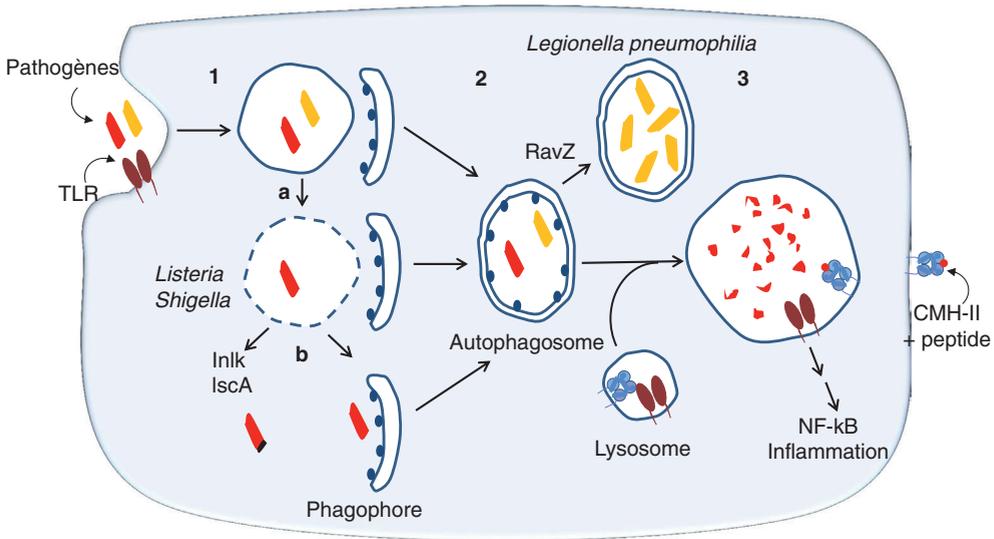
Au cours de ce processus, présent chez tous les organismes eucaryotes, le matériel cytoplasmique est acheminé vers un lysosome dans lequel il est dégradé. Lorsque des micro-organismes intracellulaires sont impliqués, l'autophagie constitue une réponse immunitaire de la cellule.

Trois types majeurs de processus autophagiques ont été décrits :

- la **macro-autophagie** est caractérisée par la formation d'un autophagosome, structure constituée d'une double membrane entourant le matériel à dégrader. Cette forme d'autophagie est impliquée dans l'élimination des micro-organismes intracellulaires. Chez l'homme, l'initiation du processus nécessite la participation des kinases ULK1, ULK2, VPS34, de la Bécline 1 et des protéines LC3. Ces molécules, désignées par le terme ATG (*autophagy related genes*), constituent de bons marqueurs d'autophagie au cours d'une infection cellulaire ;
- la **micro-autophagie** consiste en l'internalisation directe de matériel cytoplasmique au niveau de la membrane du lysosome ;
- l'**autophagie dépendante des chaperonines** concerne des protéines solubles prises en charge par des chaperonines qui les amènent jusqu'au lysosome pour y être dégradées.

Dans le cas d'une invasion microbienne, la macro-autophagie est déclenchée par différents signaux liés à la présence du micro-organisme (fig. 6.11). Il peut s'agir de la reconnaissance directe du pathogène, par l'intermédiaire de récepteurs impliqués dans l'adhésion (*e.g.* CD46 pour HHV6 ou les adénovirus B et D), ou de la reconnaissance des PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns* : *e.g.* LPS, MDP) par différents récepteurs de type PRRs (*Pattern Recognition Receptors* : *e.g.* TLR4, NOD2). Les altérations cellulaires dues au développement microbien induisent également le processus d'autophagie. Ainsi, la destruction de la membrane du phagosome par *Listeria* expose des  $\beta$ -galactosides internes perçus par des galectines. Ces lectines induisent l'activation d'une chaîne d'adaptateurs moléculaires en relation avec des protéines ATG, ce qui initie un processus d'autophagie. Les carences nutritionnelles, notamment en acides aminés, consécutives au développement microbien, représentent le signal originel du processus d'autophagie. Enfin, certaines cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF, IFN- $\beta$ ) stimulent le processus d'autophagie.

En plus de son rôle dans l'élimination des pathogènes lors de la fusion de l'autophagosome avec un lysosome, l'autophagie interagit avec d'autres mécanismes de l'immunité.



**Fig. 6.11** Schématisation de la contribution de la macro-autophagie à l'immunité antibactérienne de la cellule.

1. Au cours de l'entrée des bactéries, la reconnaissance des PAMPs par les TLRs induit la mise en route des mécanismes de l'autophagie. Des structures membranaires, issues principalement du réticulum endoplasmique, s'organisent en phagophores (doubles membranes) sous l'action des protéines ATG dont LC3 (●). Certaines bactéries, comme *Listeria* et *Shigella*, dégradent la membrane endoplasmique; cette altération induit également les mécanismes d'autophagie (1a). En ce qui concerne les bactéries ayant pu atteindre le cytosol (1b), une compétition s'établit alors entre l'activation des mécanismes d'autophagie due à la reconnaissance du micro-organisme (partie droite) et les mécanismes bactériens d'échappement résultant de l'action de protéines de masquage (InlK, IscA) et de la formation d'une queue d'actine (partie gauche).

2. L'élongation du phagophore aboutit à la constitution de l'autophagosome.

3. L'autophagosome fusionne avec un lysosome, ce qui se traduit par la destruction des bactéries. Certains fragments peptidiques et nucléiques se lient respectivement aux molécules HLA-II et aux TLRs (ex. : TLR9); il en résulte une capacité accrue de la présentation antigénique et de l'activation du facteur NF-κB. Dans le cas de *Legionella pneumophila*, la bactérie inhibe la fusion avec le lysosome (RavZ) et se réplique dans l'autophagosome.

L'autophagosome délivre des PAMPs et des épitopes antigéniques lors de sa fusion avec le lysosome, permettant aux TLR des endosomes et aux molécules CMH de classe II d'interagir avec leur ligand. Le chargement des peptides dans ces molécules de classe II concerne également des exopeptides, ce qui augmente et diversifie l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Dans le cas du virus Coxsackie B, l'activation de TLR3, qui engendre la production d'interféron de type I, est dépendante du processus d'autophagie. En effet, l'ARN viral est peu accessible dans les endosomes, car il est protégé par la capsid virale.

Du fait de sa propriété d'éliminer les altérations cellulaires et les pathogènes, l'autophagie contribue à réduire l'inflammation.

La plupart des pathogènes ont développé des mécanismes d'échappement, voire de subversion

de l'autophagie. Ainsi, la protéine IcsB de *Shigella* masque les déterminants VirG reconnus par la protéine ATG-5, tandis que la protéine InlK de *Listeria* décore la bactérie de protéines cellulaires. Les virus VIH, HHV-1 et *Influenza* codent des protéines se complexant à la Bécline 1, empêchant son activation. Enfin, la polymérisation de l'actine par *Shigella* et *Listeria* éloigne les bactéries du site d'autophagie. Dans le cas de *Legionella pneumophila*, l'autophagosome constitue même la niche répliquative de la bactérie qui est capable de bloquer la fusion avec le lysosome en décomplexant les protéines LC3 des membranes de l'autophagosome. Les *Picornavirus* utilisent les autophagosomes comme plate-forme répliquative et comme système de libération de nouveaux virions et le virus de la dengue induit l'autophagie des gouttelettes lipidiques afin de produire l'énergie nécessaire à sa

réplication. Enfin, le virus de l'hépatite C (VHC) utilise l'autophagie pour inhiber la réponse inflammatoire et la production d'interférons de type I.

L'autophagie est vraisemblablement un des premiers mécanismes d'immunité apparu chez les eucaryotes. Sa pérennité au cours de l'évolution témoigne de son efficacité pour combattre les pathogènes intracellulaires qui ont développé de nombreux mécanismes d'échappement à l'autophagie, tandis que les cellules ont multiplié et diversifié les modalités d'initiation de ce processus, notamment en ciblant les différentes étapes du développement du pathogène (*e.g.* adhésion, endocytose, libération cytosolique, multiplication).

## Bactéricidie

L'activité bactéricide permet aux phagocytes d'éliminer les micro-organismes après les avoir internalisés dans les vacuoles de phagocytose. Cette activité comprend deux mécanismes principaux, la production de formes réactives de l'oxygène et la libération de peptides antimicrobiens et protéolytiques dans la vacuole de phagocytose. L'activité bactéricide peut être quantifiée en mesurant la perte de viabilité de bactéries après leur mise en culture avec des phagocytes. Si les bactéries non phagocytées ne sont pas séparées des phagocytes, on obtient à la fois une quantification de la phagocytose et de la bactéricidie. Pour quantifier uniquement la bactéricidie, il est nécessaire d'éliminer par centrifugation les bactéries non phagocytées. Afin de faciliter la lecture de la viabilité bactérienne, des techniques utilisant de la thymidine radiomarquée ou de l'acridine orange ont été proposées, mais sont peu utilisées.

## Méthodologie

Les phagocytes peuvent être issus de lignées cellulaires, de cultures primaires ou être isolés à partir de sang frais. Dans ce cas, ils doivent être maintenus à température ambiante et utilisés dans l'heure.

De nombreuses bactéries sont utilisables, dont *Staphylococcus aureus*. Il est indispensable d'opsoniser les bactéries avant le test de bactéricidie en les mettant en contact avec du PBS contenant 10 % de sérum autologue, pendant 30 à 60 min à

37 °C dans un tube en verre, sous agitation douce. Les bactéries opsonisées doivent être utilisées immédiatement ou congelées à -80 °C.

Pour la co-culture, il est nécessaire de respecter un ratio bactéries : phagocytes de 10:1 et de prévoir un contrôle avec des bactéries seules afin de connaître leur taux de croissance durant la manipulation, ainsi que l'effet négatif des tampons utilisés. Les tubes sont incubés à 37 °C sous agitation douce et des échantillons sont prélevés à différents temps pour établir une courbe de perte de viabilité bactérienne.

Une centrifugation différentielle permet de séparer les bactéries non phagocytées, qui restent dans le surnageant des phagocytes ayant internalisé des bactéries.

L'étape de quantification des bactéries est réalisée par un comptage des *Colony Forming Units* (CFU). Après lyse hypotonique, les culots cellulaires sont étalés sur un gel d'agarose et incubés à 37 °C pendant une nuit. Les colonies sont comptées afin d'établir la perte de viabilité des bactéries en fonction du temps d'incubation avec les phagocytes.

## Recommandations de mise en œuvre

Afin d'éviter une trop grande variabilité dans les résultats, il est nécessaire de travailler en milieu stérile avec des tubes en verre. L'agitation pendant la co-culture est importante afin d'éviter la formation d'agrégats de phagocytes et d'assurer un bon contact entre phagocytes et bactéries.

Les résultats sont présentés sous forme d'une courbe de viabilité des bactéries en fonction du temps d'incubation avec les phagocytes. Il est possible aussi d'établir des constantes de phagocytose et de bactéricidie. Il existe différentes formules de calcul spécifiques.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Différenciation entre phagocytose et bactéricidie Techniques de microbiologie simples et peu onéreuses	L'étalement des bactéries et le comptage des CFU exigent un travail manuel long et délicat La réalisation des courbes nécessite des manipulations multiples (dilutions et cinétique) Les calculs sont longs et complexes

## Exemples d'applications

- En recherche : nombreux travaux fondamentaux sur les fonctions des phagocytes.
- En clinique : exploration des déficits de l'immunité innée.

## Métabolisme oxydatif

En dehors du métabolisme mitochondrial, les sources cellulaires majeures de formes réactives de l'oxygène (FRO), appelées également espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) sont les NADPH oxydases (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydases) et en particulier la NADPH oxydase phagocytaire. En effet, un des mécanismes majeurs conduisant à l'élimination des agents pathogènes par les phagocytes (granulocytes/« polynucléaires » neutrophiles, monocytes, macrophages) est la production rapide et massive d'anions superoxyde, source des autres FRO. L'oxygène consommé par les phagocytes est converti enzymatiquement en anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) par une réduction monovalente utilisant la NADPH cellulaire provenant de la voie des hexoses monophosphates qui sert de donneur d'électrons. Cette réaction est catalysée par la NADPH oxydase. L' $O_2^{\bullet-}$  est la source des autres FRO, hautement toxiques, qui sont le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyl  $OH^{\bullet}$ . Par ailleurs, la myéloperoxydase libérée dans la vacuole de phagocytose catalyse la transformation de  $H_2O_2$  en présence d'un halogène tel que le chlore ( $Cl^-$ ) en acide hypochloreux, hautement bactéricide. D'autres réactions entre ces différentes FRO et leur environnement donnent naissance à d'autres composés également hautement toxiques tels que le radical hydroxyle.

La production des FRO se fait sur la face interne de la membrane du phagosome, au contact de l'agent pathogène phagocyté, atteignant ainsi de hautes concentrations dans le milieu clos qu'est le phagosome. Les FRO jouent un rôle majeur dans la bactéricidie, comme le montre la survenue d'infections bactériennes ou fongiques sévères et/ou répétées lors de dysfonctionnements de la

NADPH oxydase dans la granulomatose septique chronique (*Chronic Granulomatous Disease* ou CGD).

Les FRO produites par la face externe de la membrane plasmique sont physiologiquement peu concentrées dans le milieu extracellulaire. Cependant, produites de façon excessive ou inappropriée et mal compensées par les systèmes anti-oxydants, les FRO peuvent induire un stress oxydant et participer à la survenue de lésions tissulaires observées par exemple dans la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn ou le syndrome de détresse respiratoire aiguë. Les FRO induisent différentes lésions biochimiques. La peroxydation lipidique aboutit à une désorganisation membranaire. Les protéines sont fragmentées, s'agrègent et sont oxydées sur leurs groupements sulfhydryles. Des cassures et des mutations de l'ADN se produisent sous l'effet des FRO.

La NADPH oxydase phagocytaire est un complexe enzymatique multiprotéique, initialement découvert dans les phagocytes. Lorsque les cellules sont au repos, la NADPH oxydase est inactive et ses composants sont dispersés entre différents compartiments cellulaires, membranaires et cytosoliques. La NADPH oxydase phagocytaire est formée de deux protéines membranaires, la gp91phox et la p22phox constituant le cytochrome b558, et de quatre protéines cytosoliques, p67phox, p47phox, p40phox et Rac. Après stimulation, le regroupement de ces différents composants forme une enzyme active produisant les FRO. À la fin du xx<sup>e</sup> siècle, l'amélioration de la sensibilité des techniques de mesure des FRO a permis la détection de faibles quantités dans différents types cellulaires autres que les cellules phagocytaires (*e.g.* épithéliales, musculaires lisses vasculaires, endothéliales, neuronales). Leur production a d'abord été attribuée à la respiration mitochondriale mais l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire et des flavoenzymes a prouvé qu'une flavoprotéine homologue à la gp91phox en était responsable. Elle a été appelée NOX1 et la gp91phox renommée NOX2. Actuellement, six enzymes définies par leur pourcentage d'identité avec NOX2 sont répertoriées dans deux sous-familles : NOX1-5 (pour NADPH oxydase) et DUOX1-2 (pour *dual oxydase*). Le rôle des NOX

et des DUOX fait l'objet de multiples études, notamment dans le domaine des maladies inflammatoires.

## Méthodologie

Le principe général des tests utilisés repose sur la réduction ou l'oxydation d'une molécule par les FRO produites par les NADPH oxydases activées. Certaines techniques mesurent la quantité totale de FRO produite par les cellules, d'autres évaluent le pourcentage de cellules les produisant. Ceci est particulièrement intéressant dans la recherche d'une mosaïque fonctionnelle caractérisée par une double population de neutrophiles chez les vectrices de la CGD liée au chromosome X. Selon la méthode utilisée, une production extra- et/ou intracellulaire de FRO est mesurée.

Parmi les techniques évaluant la quantité totale produite, la technique de référence spécifique de la production de l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) repose sur la réduction du cytochrome c mesurée par spectrophotométrie à 550 nm et inhibée par la superoxyde dismutase, reflétant l' $O_2^{\bullet-}$  libéré dans le milieu extracellulaire par la cellule stimulée. Il s'agit d'une technique quantitative dont les résultats sont exprimés en nanomoles d' $O_2^{\bullet-}$ /unité de temps/nombre de cellules.

La chimioluminescence évalue l'oxydation de certaines molécules (luminol, lucigénine...) conduisant à une émission de photons corrélée à la quantité de FRO les ayant oxydées. Les résultats, mesurés par un luminomètre, sont exprimés en unité arbitraire/nombre de cellules. Il existe différentes sondes pénétrant ou non à l'intérieur de la cellule. La production extracellulaire peut être amplifiée par l'addition de peroxydase. Il s'agit d'une technique quantitative très sensible mais peu spécifique des espèces de FRO produites.

Une autre technique utilise une sonde fluorogène, l'*amplex red*, oxydée en présence de peroxydase et d' $H_2O_2$ . La production totale d' $H_2O_2$  dans le milieu extracellulaire est ainsi évaluée.

Parmi les techniques appréciant le pourcentage de cellules produisant des FRO, la technique cytologique classique est la réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT). L'anion superoxyde

produit par les phagocytes stimulés réduit le NBT, jaune à l'état basal, alors transformé en précipité bleu nuit/noir de formazan à l'intérieur de la cellule. Le pourcentage de cellules réduisant le NBT est décompté au microscope. Cette technique peut être transformée en mesure quantitative après extraction du bleu de formazan intracellulaire.

Certaines méthodes permettent de mesurer à la fois la production totale et le pourcentage de cellules productrices de FRO, à l'aide de molécules fluorogènes – dichlorofluorescéine-diacétate (DCFH-DA), dihydrorhodamine 123 (DHR123), hydroéthidine (HE) – qui pénètrent dans la cellule. Elles n'émettent pas de fluorescence à l'état basal mais, après oxydation par les FRO, donnent naissance à un dérivé émettant une fluorescence après excitation à une longueur d'onde appropriée. Ces molécules sont peu spécifiques des différentes espèces de FRO produites.

La transfection de vecteurs codant pour des molécules oxydées spécifiquement par certaines FRO conduisant ainsi à la formation d'un fluorogène a également été développée (sonde HyPer et  $H_2O_2$ ). Grâce à des molécules d'adressage, cette transfection permet également de déterminer le compartiment cellulaire où sont produites les FRO. La fluorescence peut être mesurée globalement dans un fluorimètre ou évaluée par cytométrie en flux. Dans ce cas, on mesure à la fois la quantité de fluorescence, le pourcentage et les caractéristiques des cellules produisant cette fluorescence. Cette technique permet ainsi de détecter l'existence de sous-populations cellulaires produisant plus ou moins de FRO. L'intensité de fluorescence émise est proportionnelle à l'intensité de production de FRO. Ces sondes sont également utilisées en microscopie confocale pour identifier les cellules productrices et éventuellement le compartiment cellulaire impliqué.

Les différents composants des NADPH oxydases peuvent être étudiés par western-blot avec des anticorps spécifiques. En ce qui concerne la NADPH oxydase phagocytaire, l'absence d'un des composants oriente le diagnostic génétique de la granulomatose septique chronique. Des anticorps spécifiques des différentes sous-unités des NOX et de leurs sites phosphorylés après

activation peuvent être utilisés en immunohistochimie pour localiser ces enzymes, au repos ou sous leur forme activée, dans différents tissus.

### Recommandations de mise en œuvre

La mesure de la production cellulaire de FRO est effectuée avec différents stimuli, par exemple lipopolysaccharide (LPS), N-formyl peptides d'origine bactérienne, bactéries opsonisées, phorbol myristate acétate (PMA), permettant d'évaluer la fonctionnalité des différentes voies transductionnelles susceptibles d'activer la NADPH oxydase et d'en détecter un éventuel déficit. Au moins deux tests différents sont utilisés pour conforter les résultats. Le choix de la méthode dépend de l'objectif de la mesure, espèce particulière de FRO ou conséquences de l'ensemble des FRO produites sur la sonde utilisée, détection intra- et/ou extracellulaire, niveau de sensibilité souhaité. Ainsi, la cytométrie en flux est moins sensible que la chimioluminescence ou l'*amplex red* mais permet de déterminer le pourcentage de cellules produisant des FRO et la quantité totale produite. Elle peut être réalisée à partir de sang total évitant des artefacts liés à l'isolement des phagocytes.

L'interprétation doit être critique car les molécules tests peuvent être oxydées ou réduites de façon non spécifique par d'autres molécules que les FRO, imposant la réalisation de contrôles en parallèle. La mise en évidence d'une production de FRO par une NADPH oxydase doit être abrogée par un inhibiteur sélectif des NADPH oxydases.

### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Mesure globale ou spécifique d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire Possibilité de travailler en sang total Technique au NBT simple à mettre en œuvre Dissection fine possible des sites de production des FRO	Oxydation ou réduction par d'autres systèmes enzymatiques Appareillage spécifique pour les tests de fluorescence Interprétation spécialisée

### Exemples d'applications

- En recherche : de nombreux travaux fondamentaux explorent les fonctions des phagocytes.
- En clinique :
  - dans le domaine des déficits immunitaires, l'indication majeure est la recherche d'un déficit de la production des FRO par la NADPH oxydase phagocytaire dans un contexte d'infections bactériennes et fongiques répétées chez le jeune enfant, mais aussi plus tard dans la vie. Une absence de production de FRO suggère l'existence d'une granulomatose septique chronique à confirmer par une étude en génétique moléculaire. Une diminution non franche liée à des interférences (*e.g.* médicaments) peut être observée et doit toujours être contrôlée à distance ;
  - une hyperproduction de FRO peut être observée dans le cadre de maladies inflammatoires aiguës ou chroniques.

### Dégranulation

Les tests de dégranulation, longtemps réalisés avec des techniques de coloration en microscopie, se sont considérablement développés grâce à la cytométrie en flux. Ils permettent de mesurer l'activité fonctionnelle de cellules qui, lors de leur activation, libèrent le contenu de granules cytoplasmiques dans leur micro-environnement. La détection de cette dégranulation repose sur l'identification de molécules caractéristiques des granules. Il peut s'agir de leur contenu déversé dans le milieu extracellulaire, ou de molécules apparaissant à la surface de la membrane plasmique. Ces techniques sont applicables, avec des stimuli adaptés, aux basophiles, aux mastocytes, aux granulocytes (ou « polynucléaires ») neutrophiles et éosinophiles, aux lymphocytes T cytotoxiques et aux cellules *natural killer* (NK). Pour mémoire, plusieurs de ces cellules possèdent deux types majeurs de granules, des granules sécrétoires contenant des médiateurs préformés, qui sont relargués brutalement (dégranulation

des mastocytes, des basophiles, des lymphocytes cytotoxiques), et des vésicules de plus petite taille, contenant des cytokines et des chimiokines, dont l'exocytose est régulée par des voies moléculaires distinctes.

## Méthodologie

Le marqueur de dégranulation des basophiles le plus fréquemment utilisé est CD63 ou LAMP-3 (*Lysosomal-Associated Membrane GlycoProtein 3*), situé sur la membrane des granules sécrétoires, qui apparaît transitoirement sur la membrane plasmique des basophiles lors de leur dégranulation. Cette dernière peut être provoquée par des fractions du complément (C5a), des peptides bactériens (fMLP) ou des allergènes vis-à-vis desquels le patient est sensibilisé (fig. 6.12).

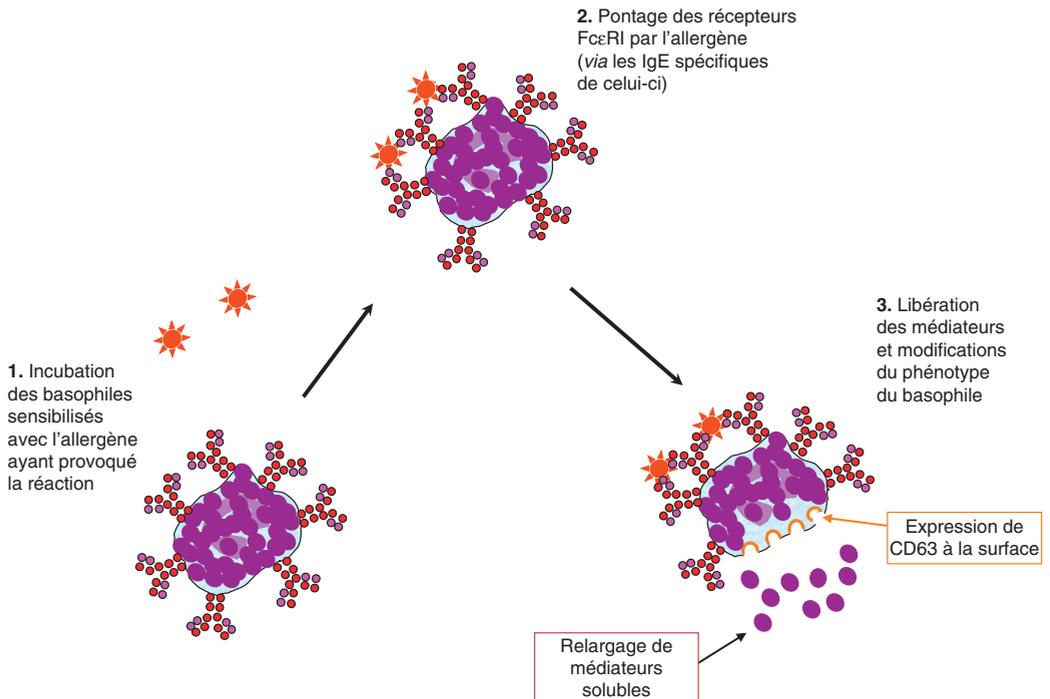
Les tests d'activation des lymphocytes T et NK sont relativement similaires. Dans la majorité des cas, le marqueur de dégranulation utilisé est CD107a et/ou CD107b, deux autres molécules

de la famille LAMP (LAMP-1 et LAMP-2). La dégranulation peut être initiée pour les cellules NK par une co-culture avec la lignée K562, et pour les lymphocytes T par le mélange PMA-ionomycine, par des anticorps dirigés contre CD3, par des cytokines activatrices, ou encore par des antigènes.

## Recommandations de mise en œuvre

La dégranulation étant un phénomène pouvant se déclencher rapidement, des précautions expérimentales sont à respecter. Il faut éviter les chocs thermiques des lignées ou des cultures primaires et tester rapidement les prélèvements frais.

L'expression des résultats rend compte généralement de l'intensité d'expression du ou des marqueurs considérés et de la proportion de cellules activées par un stimulus donné, à une concentration donnée. Dans certains cas, des algorithmes prenant en compte plusieurs marqueurs peuvent être développés.



**Fig. 6.12** Dégranulation des basophiles par contact avec l'allergène dont les IgE fixées sur les récepteurs FcεRI de ces cellules sont spécifiques.

Chaque évaluation est à encadrer par un contrôle négatif correspondant à la dégranulation spontanée et un contrôle positif correspondant à la dégranulation maximale.

## Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Pour les mastocytes et les lymphocytes T, confirmation de sensibilisations spécifiques Tests spécifiques de chaque type cellulaire Réalisation rapide	Nécessité de travailler sur des cellules vivantes Difficultés d'acheminement du prélèvement au laboratoire Dégranulation spontanée possible Variabilité interindividuelle Technologie complexe (gammes de stimuli) et interprétation spécialisée

## Exemples d'applications

- En recherche : les travaux fondamentaux sur l'activation cellulaire sont amenés à explorer les mécanismes de dégranulation.
- En clinique :
  - le test de dégranulation des basophiles est utilisé en pratique courante pour le diagnostic d'hypersensibilité allergique immédiate, en complément des tests cutanés et de la mise en évidence d'IgE spécifiques sériques. Il présente un intérêt majeur dans le diagnostic des hypersensibilités médicamenteuses pour lesquelles peu de tests de détection des IgE spécifiques de médicaments sont disponibles ;
  - les tests de dégranulation des lymphocytes cytotoxiques sont utiles dans le diagnostic des lymphohistiocytoses hémophagocytaires familiales, dans lesquels des déficits de molécules impliquées dans la dégranulation ont été rapportés.

## Migration cellulaire/adhérence

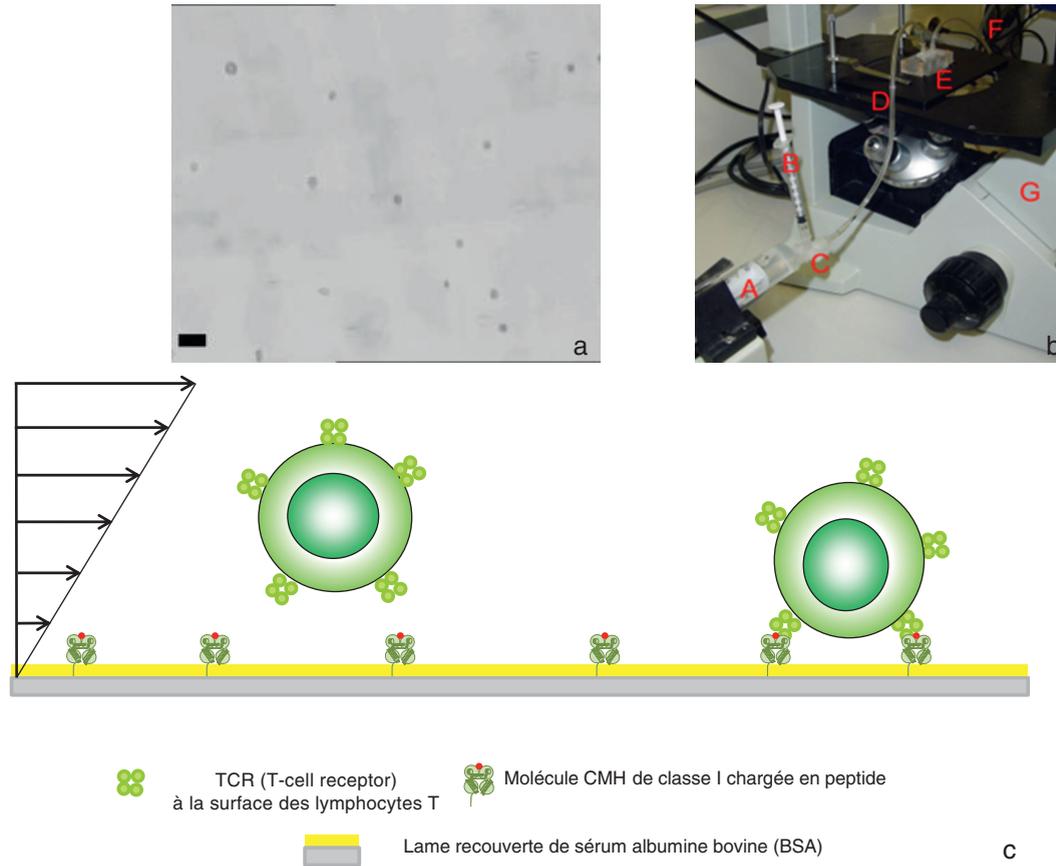
L'adhésion cellulaire est un phénomène ubiquitaire qui présente deux fonctions différentes en immunologie, d'une part le recrutement des

leucocytes dans les ganglions ou les tissus inflammatoires, d'autre part les communications intercellulaires.

## Méthodologie

Le test d'adhésion classique est une technique statique en plaque à puits. Elle consiste à déposer un nombre connu de cellules au fond d'une plaque recouverte d'une culture de cellules endothéliales ou de molécules d'adhésion d'intérêt. Après lavage, le nombre de cellules ayant adhéré est compté en microscopie inversée. Cette technique ne permet pas de quantifier les aspects dynamiques de l'adhésion cellulaire, car ni la durée pendant laquelle la cellule mobile interagit avec le substrat ni la durée pendant laquelle la cellule adhère ne sont mesurées. Enfin, la force appliquée au moment du lavage est mal contrôlée, ce qui ne permet pas de tester la résistance des liaisons.

L'utilisation d'une chambre à flux laminaire permet de mimer un écoulement à proximité d'une surface (fig. 6.13). La chambre elle-même est creusée dans un matériau transparent, dont la face inférieure est une lamelle amovible, sur laquelle on peut cultiver un endothélium ou fixer des molécules d'adhésion. La chambre est perfusée grâce à un canal d'entrée et un canal de sortie (en général à l'aide d'un pousse-seringue), ce qui induit un cisaillement près de la surface. Les cellules circulantes d'intérêt sont injectées dans la chambre et se déplacent dans le flux. Elles sédimentent et peuvent interagir avec la paroi inférieure et s'arrêter. La chambre est placée sur un microscope inversé, une caméra CCD filme les déplacements des cellules. L'utilisation classique consiste à mimer un écoulement vasculaire en utilisant des cellules endothéliales sur la surface inférieure de la chambre. Les cellules endothéliales et circulantes peuvent être stimulées à volonté. Une seconde application de cette chambre consiste à utiliser une surface recouverte de molécules d'adhésion, pour quantifier spécifiquement les interactions entre des molécules particulières et leurs récepteurs sur la cellule circulante. Si la densité de molécules sur la surface est suffisamment faible, il est possible



**Fig. 6.13** Fonctionnement d'une chambre à flux laminaire appliquée à la mesure dynamique d'une migration cellulaire.

a. Capture d'écran d'un film de chambre à flux laminaire (monocytes sur verre recouvert d'ICAM-1). La barre noire mesure 50  $\mu\text{m}$ .

b. Montage en pratique (en rouge) : pousse-seringue (A) ; seringue pour injecter les cellules (B) ; vanne 3 voies (C) ; tuyau d'amont (D) ; chambre (E) ; tuyau d'aval (F) ; microscope inversé (G).

c. Schéma de principe montrant le gradient de vitesse dû au cisaillement, un lymphocyte T sédimentant vers une surface de verre recouverte de BSA (jaune) et de molécules du CMH (vert foncé) présentant un peptide (rouge). Les lymphocytes T sont arrêtés du fait d'une liaison entre leur TCR et le CMH/peptide.

d'observer des liaisons individuelles, dans lesquelles une seule liaison entre une molécule de la cellule circulante et une molécule de la surface arrête la cellule. La durée de l'arrêt est alors une mesure directe de la durée de vie de cette liaison. Deux types de débits peuvent être envisagés, soit mimant les cisaillements physiologiques des écoulements artériels, veineux ou capillaires, soit réalisant des cisaillements très faibles permettant de gagner en sensibilité. Ces débits faibles sont quasi indispensables pour détecter des liaisons individuelles. Le cisaillement exerce une force calculable sur une liaison et l'utilisation de différents taux de cisaillement permet de tester l'effet de forces différentes sur les liaisons. Des logiciels dédiés détectent les trajectoires des cellules à partir des enregistrements vidéo et mesurent le nombre et la durée des arrêts.

La migration cellulaire en vidéomicroscopie peut être utilisée avec un dispositif proche des flux laminaires mais sans flux liquidien. Une application est l'étude du chimiotactisme, en ajoutant une source de molécules chémo-attractantes. Cette source peut être une micropipette injectant le chémo-attractant dans la chambre. Les cellules se dirigent alors vers la pointe de la micropipette. Par comparaison avec les chambres de Boyden, la migration se fait ici sur un substrat contrôlé cellulaire ou moléculaire. Il est également possible de mesurer la migration chimiotactique en ajoutant un flux, le système expérimental étant alors identique à une chambre à flux laminaire, afin de mimer l'étape de migration sur l'endothélium suivant l'étape d'arrêt des leucocytes.

Le contraste interférentiel en réflexion permet de quantifier l'aire d'une cellule sur la surface d'adhésion. La cellule est filmée alors qu'elle sédimente sur une lamelle de verre recouverte des molécules d'adhésion étudiées. À l'aide d'un objectif spécial, la cellule est illuminée, et les rayons lumineux réfléchis à l'interface verre-milieu et milieu-cellule entrent en

interférence (fig. 6.14). Ces interférences dépendent de la différence de marche des deux rayons réfléchis, liée à la distance entre la membrane et la lamelle (modulo  $\frac{1}{2}$  longueur d'onde, soit environ 200 nm). L'interférence est destructrice lorsque la membrane est très proche de la surface (environ 20 nm). Cette technique permet donc de quantifier l'aire de contact étroit entre la cellule et la surface sous-jacente, qui apparaît sombre (voir fig. 6.14). Cette aire de contact semble être un bon témoin de l'activation cellulaire en réponse à un substrat, en particulier lors de la réponse d'un lymphocyte T à la présence de ligands du TCR.

### Recommandations de mise en œuvre

Ces techniques très spécialisées nécessitent un équipement et un environnement spécifiques. Les conditions de maintien de la viabilité des cellules pendant l'observation sont cruciales.

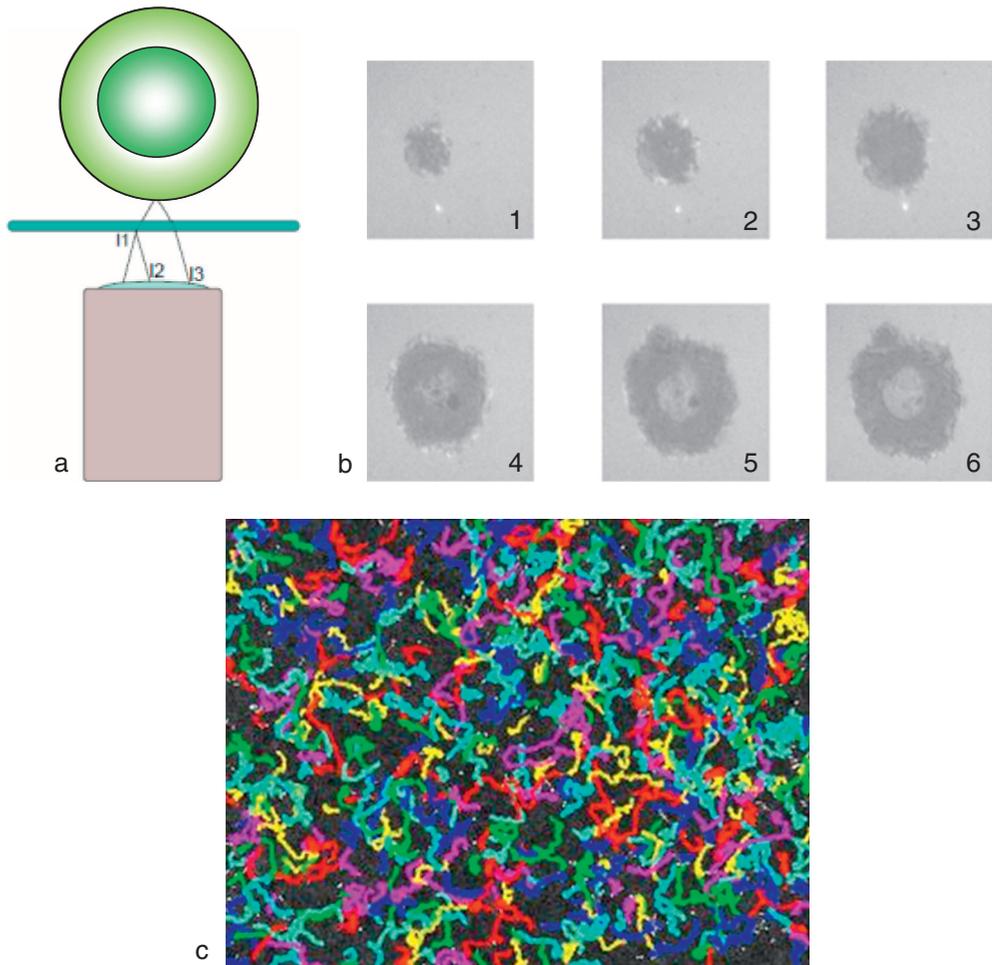
### Avantages/inconvénients

Avantages	Inconvénients
Mesures très fines et très spécifiques d'interactions moléculaires à l'échelon cellulaire	Appareillage sophistiqué et dédié

### Exemples d'applications

Ces tests n'ont pas d'applications en routine clinique. Ils offrent par contre beaucoup d'applications potentielles en recherche fondamentale.

Par exemple, il a été montré que la stimulation d'un endothélium par le TNF- $\alpha$  provoque l'apparition d'arrêts nombreux et de longue durée, voire définitifs, de leucocytes, du fait de l'expression de molécules d'adhésion. La figure 6.14 montre les étapes de l'étalement d'un lymphocyte T sur une surface recouverte d'anticorps anti-CD3.



**Fig. 6.14** Illustration des étapes et de la mesure de l'adhésion d'un lymphocyte T par microscopie de contraste interférentiel en réflexion.

a. Schéma de principe de la microscopie de contraste interférentiel en réflexion : un rayon incident I1 illumine la cellule; un rayon I2 est réfléchi à l'interface verre-milieu; un rayon I3 est réfléchi à l'interface milieu-cellule. Les rayons I2 et I3 entrent en interférence lorsqu'ils forment l'image. Cette interférence dépend de la différence de marche des deux rayons, donc de la distance membrane-verre H.

b. Séquence d'images d'un lymphocyte T s'étalant sur une surface de verre couverte de CD3. L'aire de contact correspond aux zones les plus sombres; le diamètre réel de la cellule est sensiblement égal au diamètre de l'aire de contact visible à l'image 6 (d'après A. Pierres).

c. Représentation de trajectoires détectées automatiquement de lymphocytes T activés migrant sur une surface de verre couvert d'ICAM-1 migrant spontanément (le fond de l'image est une image en microscopie en transmission).

Chaque serpent coloré est la trajectoire d'une cellule (d'après M.P. Valignat et O. Theodoly).

# Chapitre 7

## Tests *in vivo*

### Pertinence des modèles animaux

---

La plupart de nos connaissances en immunologie sont issues d'études initiales dans des modèles animaux, essentiellement murins. Beaucoup de ces études n'auraient pas pu être menées chez l'homme pour des raisons d'éthique évidentes. Les différences entre les systèmes immunitaires de l'homme et de la souris sont cependant importantes et toutes les observations murines ne sont pas transposables à l'espèce humaine. Toutefois, la présence chez la souris de gènes équivalents à ceux de l'homme et la possibilité de manipuler facilement le génome ont conduit à une multiplication des modèles murins qui ont permis le développement de nouvelles approches fondamentales et thérapeutiques. L'*American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging* propose la définition suivante : « En recherche biomédicale, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales. »

Le recours à un modèle doit être décidé selon trois critères. Le modèle doit présenter des mécanismes et des causes identiques à ceux observés chez l'homme, on parle d'homologie. L'isomorphisme qualifie la similitude entre les symptômes survenant chez l'animal et ceux observés chez

l'homme. Enfin, le modèle doit répondre de la même manière que l'homme aux différents traitements pour pouvoir être qualifié de prédictif. Dans un modèle parfait, ces trois critères seraient remplis. Toutefois, du fait des différences entre les espèces, un compromis doit le plus souvent être trouvé et la priorité est mise sur l'un ou l'autre des critères en fonction de la problématique envisagée.

On distingue plusieurs catégories de modèles animaux. Dans les modèles spontanés, l'affection d'origine naturelle est identique à celle que l'on observe chez l'homme. Dans les modèles induits, l'affection ou la maladie est reproduite expérimentalement. Les modèles génétiquement modifiés utilisent des animaux dont le code génétique a été manipulé pour provoquer la maladie à étudier. Les modèles négatifs sont résistants à une affection où une maladie donnée et l'étude des causes de cet état peut donner des indices sur les fondements physiopathologiques de la maladie. Les modèles orphelins caractérisent des affections apparaissant naturellement chez les animaux pour lesquelles il n'existe pas d'équivalent chez l'homme. Enfin, l'animal peut être utilisé pour produire des anticorps, à visée scientifique, diagnostique ou thérapeutique, selon des protocoles très maîtrisés.

### Les différentes espèces utilisées

La souris est le modèle de choix dans la plupart des études en immunologie. Sa petite taille autorise des coûts d'élevage raisonnables et la rend facile à manipuler. De plus le taux de reproduction

**Tableau 7.1** Quelques chiffres clés sur la biologie de la souris (*Mus musculus*)

Durée de vie	1–3 ans
Durée de gestation	19–21 jours
Sevrage	3 semaines
Maturité sexuelle	4 (F) ou 6 (M) semaines
Durée cycle œstral	4–5 jours
Poids adulte	18–35 g (F), 20–30 g (M)
Poids naissance	1–2 g
Poids sevrage	10–12 g
Rythme cardiaque	310–840 par minute
Rythme respiratoire	80–230 par minute
Température	36,8–38 °C
Volume sanguin	1,5–2,5 mL, 7–8 % poids

est rapide et élevé (tableau 7.1). À partir des souris sauvages, des centaines de souches différentes ont été développées et entretenues. De nouveaux animaux ont de plus été créés avec la mise en place de lignées transgéniques.

Le recours à d'autres animaux se fait soit pour la production d'anticorps (*e.g.* lapins, chevaux, chèvres, ânes), soit pour des études sur l'évolution du système immunitaire dans les espèces.

## Points clés des modèles souris

### Avantages

Le recours à la souris permet d'étudier un système immunitaire complet, ce qui n'est pas possible *in vitro*. La variabilité génétique entre individus peut être maîtrisée, elle est quasiment nulle dans les lignées consanguines et reste faible dans les autres lignées. Elle peut être mise à profit entre différentes lignées.

Par ailleurs, les conditions d'élevage permettent de contrôler de nombreux paramètres environnementaux tels que la température, l'hygrométrie, l'éclairage et le cycle nyctéméral, l'approvisionnement en eau et en nourriture. De plus, le microbiome ambiant peut être maîtrisé, ce qui constitue un élément clé pour les études immunologiques. En appliquant des contrôles réguliers et des mesures de confinement précises, il est possible de réaliser des zones exemptes d'organismes patho-

gènes spécifiques (EOPS). Il est également possible d'élever des animaux axéniques (dépourvus de micro-organismes) ou gnotoxéniques (dont l'inventaire de la flore est connu).

L'histoire individuelle et les modifications acquises au cours de la vie de chaque individu sont identiques, ou presque, et peuvent même être comparées entre laboratoires. Cette reproductibilité ainsi que la possibilité de contrôler les paramètres environnementaux et individuels ont fait le succès de la souris comme modèle animal. Indépendamment des considérations éthiques à prendre en compte en expérimentation humaine, de telles conditions de reproductibilité seraient impossibles à obtenir, chaque être humain restant unique par son patrimoine génétique, son environnement et son vécu.

### Inconvénients

La souris reste un animal et donc un organisme complexe. Beaucoup de questions scientifiques peuvent être abordées dans des modèles plus simples *in vitro* (*e.g.* lignées cellulaires, prélèvements biopsiques, organes isolés), qui peuvent être plus pertinents. Le recours à l'animal, même à la souris, est coûteux et chronophage, et, sans préjuger des contraintes législatives et des questions éthiques, reste réservé aux questions qui ne peuvent être résolues par d'autres moyens.

## Différents types de lignées de souris

La diversité génétique de la souris d'expérimentation constitue la variable biologique majeure qui justifie l'utilisation de cette espèce dans le domaine de la recherche. Les lignées de souris choisies le sont en fonction de leurs caractéristiques immunitaires ou génétiques.

### Souris non consanguines

Une colonie non consanguine (*outbred*) est une population dans laquelle on cherche à maintenir une hétérogénéité constante et maîtrisée. Cette hétérogénéité génétique implique l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et de nombreux contrôles. Les colonies *outbred* sont généralement

produites par des entreprises internationales dont le savoir-faire est centré sur l'élevage d'animaux de laboratoire. Maintenir sur plusieurs générations ces animaux dans un laboratoire, avec un faible effectif et sans programme de croisement, entraînerait une dérive de cette variabilité génétique et du phénotype à étudier.

### Lignées consanguines

Une souche consanguine (*inbred*) est une population de souris qui montre des variations génétiques minimales à la suite d'accouplements frère-sœur pendant au moins vingt générations successives. La consanguinité est contrôlée par sélection afin d'éliminer les mutations délétères et empêcher les aberrations génétiques. Un certain nombre de marqueurs sérologiques et génétiques sont utilisés dans les établissements de référence détenteurs de ces lignées, pour contrôler les souches consanguines afin de prévenir la dérive au cours des générations suivantes. Du fait de la consanguinité, les individus d'une telle lignée sont homozygotes pour tous leurs gènes. En théorie, ils ont moins de 1 % d'hétérozygotie et sont histocompatibles comme de vrais jumeaux humains. Ainsi, pour citer deux des lignées les plus utilisées en immunologie, toutes les souris C57BL/6 ont un haplotype MHC de type H2<sup>b</sup>, alors que celles de la lignée BALB/c sont H2<sup>d</sup>.

### Souches fermées ou isogéniques

Les techniques de transgénèse imposent d'utiliser des souris dont le fonds génétique est mixte (utilisation d'hybrides issus du croisement de deux lignées consanguines), pour des raisons empiriques et techniques. Pour étudier l'effet de la mutation créée, il peut être nécessaire de procéder à une série d'accouplements en retour (*backcross*) avec une lignée consanguine, afin d'obtenir des animaux porteurs de la mutation sur un fonds génétique défini. Afin de raccourcir le délai théorique de dix croisements pour obtenir un fonds génétique homogène, l'usage de marqueurs génétiques polymorphes (*speed congenic*) entre les souches d'origine permet d'obtenir ce résultat après environ six générations.

### Souris immunodéficientes

La découverte de lignées de souris athymiques (souris *nude*) présentant un déficit en lymphocytes T a permis de réaliser les premières études d'hétérotransplantation de tissus ou xéno greffes. Ces modèles reposent sur l'établissement et la croissance continue d'hétérotransplants de tissu humain, néoplasique par exemple, chez des souris immunodéficientes. La croissance progressive de tumeurs xénogénétiques chez les souris athymiques dépend des propriétés tumorales, comme l'origine et le type de la tumeur transplantée, et du site d'implantation de la tumeur chez la souris hôte (tableau 7.2).

**Tableau 7.2** Exemples de souris immunodéficientes fréquemment utilisées

Souche	Mutation et/ou phénotype	Phénotype de l'immunodéficiência
Souris athymique nude	Gène <i>FOXN1</i> , absence de thymus	Absence de lymphocytes T thymo-dépendants
Souris SCID ( <i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i> )	Gène <i>PRKDC</i> , protéine kinase impliquée dans le réarrangement des gènes du TCR et des immunoglobulines	Absence de lymphocytes B et T matures, présence de cellules NK fonctionnelles
Souris NOD ( <i>Non-Obese Diabetic</i> )-SCID	Souris SCID avec en plus des déficits de l'immunité innée	Absence de lymphocytes B et T, activité NK altérée
Souris NOD-SCID $\beta 2 m^{-/-}$	Souris NOD-SCID avec en plus un déficit en $\beta 2$ -microglobuline	Absence de lymphocytes B, T et NK, absence de C5. Pas de restriction de classe I
Souris NOD-SCID IL2R $\gamma^{-/-}$ (NOG)	Souris NOD-SCID avec en plus un déficit pour la chaîne $\gamma$ du récepteur à l'IL2	Absence de lymphocytes B, T et NK, absence de cellules dendritiques
Souris beige ou BNX	Homozygotes pour les régions <i>bg</i> , <i>nu</i> et <i>Xid</i>	Anomalies fonctionnelles des macrophages, des granulocytes (ou « polynucléaires ») neutrophiles, des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques

## Souris humanisées

Une souris humanisée exprime un ou plusieurs gènes humains, ou a été greffée avec des cellules, tissus et/ou organes d'origine humaine. Ces souris sont de plus en plus utilisées comme modèles animaux en recherche biologique et médicale pour la thérapeutique humaine. Les souches de souris immunodéficientes sont souvent utilisées pour obtenir des souris humanisées, car en l'absence d'un système immunitaire pleinement fonctionnel, elles peuvent assez facilement accepter des cellules d'origine hétérologue. La souris à immunodéfiance combinée sévère (SCID) a été le plus souvent utilisée à cette fin, après greffe par des cellules mononuclées périphériques (PBMC) humaines ou par des tissus hémato- ou lymphopoïétiques fœtaux. Les modèles les plus aboutis actuellement sont les Humice. Ce sont des souris NOD-SCID  $\beta 2m^{-/-}$  ou NOD-SCID  $IL2R\gamma c^{-/-}$  (NOG), irradiées et dont le système immunitaire est reconstitué par injection de cellules progénitrices hématopoïétiques (CD34<sup>+</sup>) humaines, provenant le plus souvent de cordons ombilicaux, ce qui permet *in vivo* la reconstitution d'un système immunitaire humain inné et adaptatif.

## Aspects éthiques et législatifs

### Éthique

Les animaux sont capables de souffrir. Utiliser des animaux à des fins scientifiques ou médicales pose des problèmes éthiques qu'il faut examiner au cas par cas. La manipulation des animaux de laboratoire pose des problèmes techniques ou méthodologiques qui peuvent nuire à l'animal et que l'expérimentateur doit chercher à réduire, tant dans l'intérêt de l'animal que dans un but scientifique. C'est ainsi que l'environnement microbien des souris immunodéficientes doit être contrôlé de façon à s'assurer que leur handicap n'en soit plus un.

### Législatif

Selon la directive UE 2010/63 et son décret d'application du 1<sup>er</sup> février 2013 en France, toute personne travaillant sur des animaux doit avoir reçu une formation spécialisée en expérimentation ani-

male dans l'année suivant sa prise de poste. Tout projet de recherche doit avoir été autorisé par un comité d'éthique. Les expérimentations sont réalisées dans des locaux agréés par des représentants départementaux du ministère de l'Agriculture.

## Transgénèse, KO-KI

### Transgénèse additionnelle

La transgénèse additionnelle consiste en l'ajout d'un gène au génome d'une souris. Ce gène comprend un ADNc codant pour la protéine d'intérêt et un promoteur qui pilote l'expression de ce gène dans les tissus ciblés (fig. 7.1). La construction d'ADN est introduite par micro-injection dans des ovocytes fécondés de souris, qui sont ensuite réimplantés sur des mères porteuses. Il faut compter 3 semaines pour avoir la première naissance d'un « fondateur » présent à un taux de 1 à 4 % des naissances, et 3 mois, soit une génération, pour utiliser les premiers animaux.

### Points techniques

L'insertion de l'ADN est aléatoire, donc le phénotype observé peut être dû à la mutation dominante ou récessive d'un gène éventuellement présent au site d'insertion. Le promoteur n'est pas toujours complet, ni autonome au point de gouverner la structure de la chromatine autour du point d'insertion. Par conséquent, le niveau d'expression du transgène est influencé par l'environnement du site d'insertion. Comme le transgène s'insère sous forme de répétition en tandem, le niveau d'expression est aussi partiellement influencé par le nombre de copies (entre 10 et 200). C'est pourquoi il est recommandé, lors des premières études, de comparer au moins trois lignées indépendantes issues de leur propre fondateur afin d'établir l'effet du transgène. Par la suite, les laboratoires poursuivent les études uniquement avec la lignée qui a donné les meilleurs résultats.

Les ovocytes dans lesquels sont injectés les ADN sont le plus souvent issus de croisements C57BL/6 × DBA2 pour la recherche en immunologie. Il existe en effet des anticorps anti-CMH reconnaissant ces fonds génétiques et de nombreuses don-

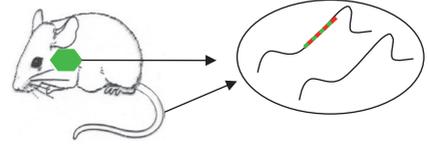
### 1. Transgénèse additionnelle



Ce promoteur permet l'expression de l'ADNc dans un organe et un seul, noté en vert (thymus, lignée de thymocyte, ou autre...)

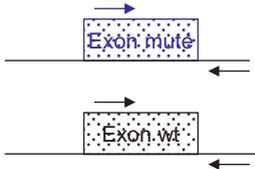
Transgène : allèle transgénique ; noté « tg »

Transgène : allèle sauvage indétectable car locus d'insertion inconnu



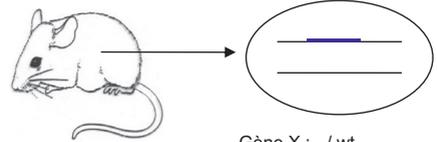
Deux prélèvements, mêmes résultats pour l'analyse de l'ADN  
Transgène : tg / ?

### 2. KO ou KI



Gène X : allèle muté noté « - »

Gène X : allèle sauvage, noté « wt »



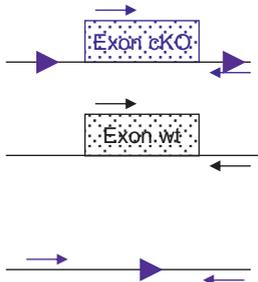
Gène X : - / wt

### 3. cKO



Cre recombinase : présence de l'ADNc, noté « Cre+ »

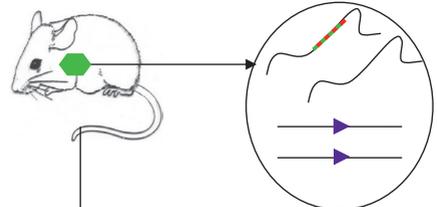
Allèle sauvage du locus correspondant indétectable car locus d'insertion inconnu



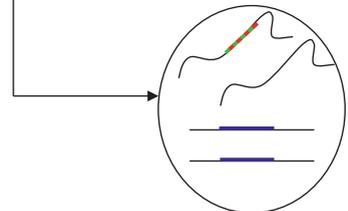
Gène X : allèle cKO ou conditionnel ou « floxé », fonctionnel, noté fl

Gène X : allèle sauvage, noté wt

Gène X : allèle KO ou « - »



Prélèvement dans l'organe ciblé, après induction si la Cre était inducible :  
Recombinase : Cre+ / ? ; Gène X : -/-



Prélèvement dans l'organe non ciblé, ou avant induction si la Cre était inducible :  
Recombinase : Cre+ / ? ; Gène X : fl/fl

Le(s) transgène(s)

Définition des allèles à génotyper

Lieu du prélèvement

Génome de la cellule et résultats de la PCR

Fig. 7.1 Modèles de transgénèse.

nées bibliographiques sur leur comportement. Il peut être nécessaire d'avoir le transgène sur un fonds génétique pur (lignée syngénique), ce qui implique que les fondateurs soient croisés en retour sur six à dix générations avec une des lignées pures parentales.

### Exemples

La lignée de souris DO11.10 qui exprime les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur TCR d'un hybridome reconnaissant l'ovalbumine a été utilisée pour étudier la différenciation des lymphocytes T.

## Le KO ou KI

Les souris KO (*knock-out*) ou KI (*knock-in*) ont un de leurs gènes inactivé (KO) ou remplacé par une version fonctionnelle portant une mutation à étudier, voire la version humaine du gène (KI) (voir [fig. 7.1](#)). La substitution des allèles a été faite dans des cellules en culture dans lesquelles a été électroporée une construction d'ADN comprenant la mutation. Les clones de cellules porteuses de la mutation d'intérêt sont sélectionnés ultérieurement. Si les cellules utilisées sont des cellules ES (*embryonic stem cells*) de souris, elles peuvent ensuite être injectées dans des blastocystes receveurs, pour donner des animaux chimériques permettant d'établir une colonie porteuse de la mutation. Si d'autres cellules sont transfectées, la technique de transfert nucléaire permet d'isoler les noyaux de ces cellules et de les injecter dans un ovocyte receveur permettant de nouveau d'obtenir des animaux porteurs de la mutation voulue. Le délai d'obtention est de l'ordre de 6 mois à 2 ans.

### Points techniques

La mutation est ponctuelle. Certains transcrits issus d'épissage alternatif peuvent ne pas porter la mutation si un exon clé de la fonctionnalité du gène n'a pas été ciblé. L'absence de la protéine d'intérêt, ou son remplacement par la version mutée pour les KI, doit être vérifiée avant la poursuite de l'étude du phénotype. Sur les premières versions des KO, il subsistait dans le génome un minigène de sélection, qui pouvait éventuellement perturber la régulation de la transcription au

niveau du gène ciblé. Ce minigène est maintenant éliminé en utilisant des recombinaisons.

Les cellules ES sont souvent de fonds génétique 129/Sv, non syngéniques, peu utilisées en immunologie. Il est parfois nécessaire d'effectuer des croisements en retour sur une lignée plus utilisée comme les C57BL/6 afin d'avoir des lignées syngéniques.

Il faut comprendre que le phénotype d'une souris mutée pour un gène donné ne se résume pas à la situation sauvage plus ou moins le produit du gène muté. Ces animaux sont des organismes qui se sont adaptés, au cours de leur développement et/ou de leur vie adulte, aux conséquences parfois multiples de la mutation du gène.

### Exemples

Les souris KO pour la chaîne alpha du TCR présentent plus de lymphocytes TCR $\gamma\delta$  que les souris sauvages. Les souris KO pour le gène TCF-1, crucial dans le développement de la lignée T, possèdent néanmoins des lymphocytes T car le facteur LEF-1 est surexprimé et compense dans une certaine mesure le déficit chez les souris mutantes.

## Les cKO

Les souris KO conditionnelles (cKO) sont basées sur l'utilisation de recombinaisons d'ADN, Cre ou FLP, issues respectivement du bactériophage P1 ou de levures, reconnaissant des séquences spécifiques (LoxP ou FRT respectivement), naturellement absentes dans le génome de la souris. En utilisant la même technologie que pour les KO ou les KI, une lignée de souris est créée dont l'allèle fonctionnel (sauvage ou muté) est encadré par deux séquences LoxP. Les séquences FRT sont utilisées pour exciser le minigène de sélection. Ces souris sont ensuite croisées avec des lignées transgéniques (transgénèse additionnelle) qui expriment la Cre recombinase dans le tissu voulu et/ou au moment voulu (voir [fig. 7.1](#)).

### Points techniques

Le point clé est la lignée de souris transgéniques qui expriment la Cre recombinase dans le tissu ou la lignée cellulaire ciblée, avec un taux suffisant

pour recombinaison tous les sites présents dans l'ADN de ces cellules, mais sans « fuite » d'expression dans d'autres lignages cellulaires. Une bonne recherche bibliographique et une discussion avec les auteurs des précédentes études sont requises. Certaines lignées de souris expriment dans un tissu choisi une Cre inducible par le tamoxifène, ce qui permet de contrôler à la fois le lieu et le moment de l'expression de la recombinase.

Pour contrôler l'efficacité de l'excision du cKO, il existe des transgènes rapporteurs, où l'expression de la  $\beta$ -galactosidase (ou d'une protéine fluorescente) nécessite une excision par la Cre. Cela implique une troisième souris transgénique, donc encore plus de temps pour les croisements.

Le point pratique est le temps pour ces croisements : outre le délai pour obtenir les lignées à croiser, il y a le temps de franchir les barrières sanitaires propres à chaque animalerie, et celui des croisements pour obtenir des animaux homozygotes pour le cKO et hétérozygotes pour le transgène d'expression de la Cre.

## Exemple

La lignée Mx1-Cre, où l'expression de la Cre peut être induite par l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$ , ou l'ARN double brin, a été utilisée pour étudier la différenciation T.

## Tests cutanés

Les réponses immunitaires induisent une mémoire qui est aussi désignée sous le terme de sensibilisation. La mise en évidence d'une sensibilisation à un antigène ou à un allergène est le plus souvent recherchée *in vitro*, mais elle peut également être détectée par des tests cutanés réalisés *in vivo*, chez l'animal ou chez l'homme. Selon le type de test réalisé, différents compartiments de l'immunité de l'individu testé sont explorés.

Les tests cutanés les moins invasifs sont les patch-tests (tests épicutanés) qui consistent à déposer une petite quantité d'antigène ou d'allergène sur la peau, sans effraction. Les cellules dendritiques cutanées de l'épiderme (cellules de Langerhans) et du derme captent, appréhendent et présentent les épi-

topes antigéniques aux lymphocytes T. L'activation et la prolifération cellulaire qui en résulte aboutissent à la formation d'une réaction inflammatoire localisée, visible au bout de 48 heures. Ces tests permettent de mettre en évidence une sensibilisation cellulaire, de type hypersensibilité retardée, c'est-à-dire la présence de lymphocytes T spécifiques d'antigène, à activité pro-inflammatoire.

Les prick-tests comportent une petite piqûre de la peau permettant à la substance testée de pénétrer sous l'épiderme. Son contact avec les mastocytes de la peau permet de détecter rapidement une hypersensibilité immédiate dépendante des IgE spécifiques fixées sur ces cellules. La réaction cutanée se développe très rapidement, dans les 20 minutes suivant le test.

Les intradermoréactions consistent à introduire une petite quantité d'antigène directement dans le derme. Elles sont utilisées aussi bien pour la détection des hypersensibilités immédiates, en complément des prick-tests, que pour la détection des hypersensibilités retardées, en complément des patch-tests.

## Méthodologie

Les patch-tests sont généralement effectués à l'aide de cupules en aluminium, de 8 à 12 mm de diamètre, dans lesquelles la substance à tester est déposée, soit directement, soit après imbibition d'un disque de papier. Ces cupules permettent d'isoler les différents antigènes testés. L'ensemble des tests réalisés, en général sur la partie haute du dos, est recouvert d'un adhésif maintenu en place jusqu'à la lecture du test. La position de chaque substance, ainsi que d'un témoin négatif sans antigène, doit être soigneusement notée, le plus souvent directement à même la peau du sujet. Chez l'animal, ce type de test est classiquement réalisé sur l'oreille.

Les prick-tests sont réservés à l'exploration de l'allergie immédiate chez l'homme. Ils sont réalisés en consultation ou en hôpital de jour. La réaction se résout spontanément en quelques heures. Là encore, une identification précise des substances testées est nécessaire. Un témoin positif de la dégranulation des mastocytes est réalisé par un prick-test à la codéine, un témoin positif de vasodilatation et vasoperméation est réalisé par un prick-test à

l'histamine. De l'eau distillée ou du sérum physiologique sont utilisés pour le témoin négatif, qui ne doit montrer aucune réaction et permet de détecter les sujets présentant un dermographisme caractérisé par une dégranulation spontanée des mastocytes. Une réaction observée sur le témoin négatif complique l'interprétation des tests spécifiques.

Les intradermoréactions nécessitent de bien connaître la technique d'injection, qui ne doit pas franchir le derme. Elle s'effectue en plaçant l'aiguille de la seringue à un angle d'environ 15° par rapport à la surface de la peau tendue. L'apparition d'une tuméfaction (en peau d'orange), correspondant à l'accumulation de la substance injectée dans le derme, témoigne d'une intradermoréaction bien conduite. Si aucune tuméfaction n'apparaît, c'est que l'injection a été sous-cutanée et sera ininterprétable. À l'inverse des patch-tests, aucune protection de la zone d'injection n'est nécessaire.

Pour l'ensemble de ces tests, il est classique d'utiliser plusieurs dilutions des substances examinées. La concentration la plus forte possible doit être employée, tout en évitant les réactions purement toxiques, irritantes et non immunologiques.

### Recommandations de mise en œuvre

En dehors de la série de dilutions mentionnée ci-dessus, il convient d'utiliser le bon excipient pour les substances testées. Pour les patch-tests, un vecteur liposoluble comme la vaseline est souvent préférable car la majorité des allergènes testés sont lipophiles. De plus, l'épiderme constitue une barrière efficace empêchant le passage des antigènes hydrosolubles. Des solutions alcooliques peuvent également être employées. Les réactions d'hypersensibilité peuvent dépendre du principe actif d'une drogue ou d'un allergène majeur, mais peuvent également être liées à sa combinaison avec un excipient ou ses conditions de préparation. Il est donc utile de tester les produits suspectés à la fois dans des conditions de pureté optimale et dans leur forme usuelle.

Un des problèmes majeurs de l'utilisation des tests cutanés est le risque de réactivation d'une réponse systémique. C'est en particulier le cas des réponses d'hypersensibilité immédiate, pour lesquelles un choc anaphylactique peut être induit suite à la réintroduction d'une très petite quantité d'allergène.

Les tests cutanés, et en particulier les intradermoréactions, doivent donc être réalisés chez l'homme dans un environnement médical approprié, apte à gérer les situations d'urgence allergologique.

### Avantages/inconvénients

Test	Avantages	Inconvénients
Patch-tests	Hypersensibilité retardée Réponses cellulaires T Multiples antigènes testés simultanément Simple contact cutané	Réponses différentes aux substances pures ou sous leur forme galénique Lipo/hydrosolubilité Délai de lecture : 48 à 72 h Risque de réactivation de l'hypersensibilité
Prick-tests	Hypersensibilité immédiate Multiples allergènes testés simultanément Spécificité extrême, même à des traces d'allergène	Sensibilité modérée à cause des très faibles doses d'antigène administrées
Intradermoréactions (IDR)	Hypersensibilité immédiate et retardée Réponses cellulaires T	Difficultés de réalisation Délai de lecture pour l'hypersensibilité retardée Risque de réactivation de l'hypersensibilité immédiate ou retardée

### Exemples d'applications

- En recherche : les tests cutanés sont très précieux pour étudier les réponses cellulaires d'un animal. L'application de l'antigène sur l'oreille d'une souris ou d'un cobaye est un excellent moyen de mesurer la réponse cellulaire générée ou modulée expérimentalement.
- En clinique :
  - les tests cutanés font partie de l'arsenal diagnostique des allergologues. Leur mise en œuvre est guidée par les éléments cliniques observés par le médecin et rapportés par le patient. L'interrogatoire est un élément majeur pour décider des tests à réaliser, au cours d'une enquête détaillée ;

- les patch-tests sont très utilisés pour le diagnostic des eczémas de contact et des toxidermies (hypersensibilités retardées aux médicaments). Ces affections peuvent cependant concerner toutes sortes de produits comme le nickel des bijoux ou d'objets usuels ou encore les colorants capillaires (paraphénylènediamine) utilisés par les coiffeurs et les conservateurs (méthylisothiazolinone). Dans le cas des toxidermies, l'utilisation de la forme galénique de la drogue est importante car la sensibilisation cellulaire peut être liée à la formation de néo-épitopes entre la substance active et son excipient. Les patch-tests ont également été longtemps utilisés pour vérifier l'efficacité d'une vaccination contre la tuberculose, sous forme de « cuti-réaction » ;
- les prick-tests sont préférentiellement utilisés pour le diagnostic des allergies immédiates.

Ils sont employés pour le diagnostic en allergologie respiratoire (asthme, rhinite, conjonctivite), alimentaire, médicamenteuse et aux venins d'hyménoptères (anaphylaxie). Là encore, le produit natif est privilégié par rapport à des antigènes purifiés ou recombinants. L'existence de réactions croisées (*e.g.* kiwi et latex) doit être prise en considération ;

- les intradermoréactions ont surtout été utilisées pour mettre en évidence l'efficacité d'une vaccination antituberculeuse ou un contact avec *Mycobacterium bovis*. Elles tendent à être remplacées par les IGRA<sup>8</sup>. Leur utilisation pour le diagnostic d'hypersensibilité retardée à un autre antigène, en particulier médicament, est plus dangereuse que la réalisation de patch-tests, qui leur sont préférés.

---

<sup>8</sup> IGRA (*interféron gamma release assay*) testé en mesurant la production plasmatique d'interféron ou en recherchant les cellules productrices d'interféron en ELISpot.

# Chapitre 8

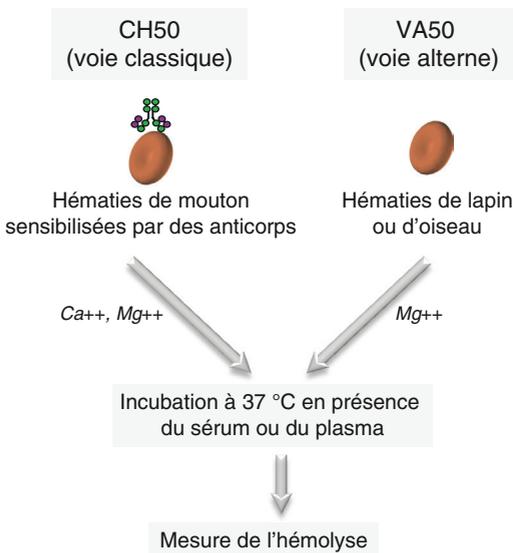
## Exploration du complément

### Complément hémolytique

Le complément représente un élément essentiel de l'immunité innée dont l'activation se déclenche spontanément en réponse à une agression. La fonction générale du complément peut être évaluée par des tests d'hémolyse mettant en jeu des globules rouges non humains.

#### Méthodologie (fig. 8.1)

Les examens fonctionnels évaluent la capacité de développement des activités enzymatiques portées par les convertases et l'assemblage du complexe



**Fig. 8.1** Principe méthodologique des tests hémolytiques du complément.

d'attaque membranaire. Des globules rouges de mouton recouverts d'anticorps anti-globules rouges de mouton sont utilisés comme cible pour le CH50 qui mesure l'activité de la voie classique. Des globules rouges de lapin ou d'oiseau dont la membrane est pauvre en acide sialique et directement activatrice sont utilisés pour la VA50 qui mesure l'activité de la voie alterne. Un tampon de faible force ionique (*e.g.* DGVB<sup>++</sup> pour *Dextrose Gelatin Veronal Buffer* supplémenté en cations divalents) ajusté pour son contenu en calcium (0,15 mM) et en magnésium (0,5 mM) est utilisé. Les tests s'effectuent à une température de 37 °C. L'hémolyse résultant de l'activation du complément de l'échantillon est mesurée par comparaison à un témoin d'hémolyse à 100 % (eau distillée) et à un témoin négatif (tampon seul). Les unités CH50 et VA50 correspondent au volume d'échantillon nécessaire pour lyser 50 % des érythrocytes cibles.

#### Recommandations de mise en œuvre

Pour éviter l'activation *in vitro* du complément, le plasma hépariné est à proscrire et il est préférable d'examiner le plasma citraté ou EDTA. Le prélèvement de sang total doit être acheminé rapidement du fait de la labilité des protéines et des enzymes du complément.

#### Exemples d'applications

L'hypocomplémentémie se définit comme la baisse de la fonction hémolytique du complément

sérique et plasmatique, estimée par les tests CH50 et VA50.

L'hypocomplémentémie par activation est le fait de la mise en jeu intensive d'une convertase. Ce phénomène pathologique est contrôlé et transitoire; la disparition du processus activateur pathologique s'accompagne d'un retour à la normale. Une diminution du CH50 est associée à la baisse fonctionnelle des composants de la convertase classique, par exemple C2 ou C4. Dans la situation particulière des cryoglobulinémies de type II, l'hypocomplémentémie est associée à la baisse de C4 par fixation de C4b à la cryoglobuline, sans engagement associé de la convertase classique. Le plus souvent, l'antigénémie de C3 reste subnormale, exceptionnellement effondrée. L'hypocomplémentémie par activation de la voie classique est retrouvée dans des vascularites, le lupus érythémateux systémique, les cryoglobulinémies mixtes et les glomérulonéphrites post-infectieuses. Une diminution du VA50 est associée à une baisse de C3, rarement du facteur B. L'activation de la seule convertase alterne est un événement rare, observé dans des chocs septiques et les glomérulonéphrites avec présence de facteur néphritique (C3nef).

Une forte mise en jeu de la convertase classique peut être conjointe au ou entraîner le développement de la convertase alterne, avec consommation de facteur B. Cette situation est retrouvée au cours des glomérulonéphrites, des infections sévères, de la vascularite urticarienne hypocomplémentémique de Mac Duffie (inconstant) ou des connectivites en période active, notamment le lupus érythémateux systémique.

Il existe également des hypocomplémentémies par déficit héréditaire. La forte baisse d'un composant évoque une anomalie ou un polymorphisme génétique. Il est estimé que 0,05 % de la population occidentale est affectée par un déficit primaire complet du complément porté par l'hérédité (affectant les deux allèles). Les hypocomplémentémies par déficit s'associent, pour les composants de la convertase classique, à des maladies à complexes immuns et à des connectivites. Les déficits en composants de la convertase alterne, de la voie des lectines et du complexe d'attaque membranaire se traduisent par des infec-

tions récidivantes. Ainsi, chez les patients développant des infections récurrentes à *Neisseria* (sérotypes rares W135 et Y), l'incidence des déficits en complément est estimée à 20 %.

Les stratégies d'exploitation des tests hémolytiques sont illustrées sur la figure 8.2.

## Dosage des fractions, expression des récepteurs

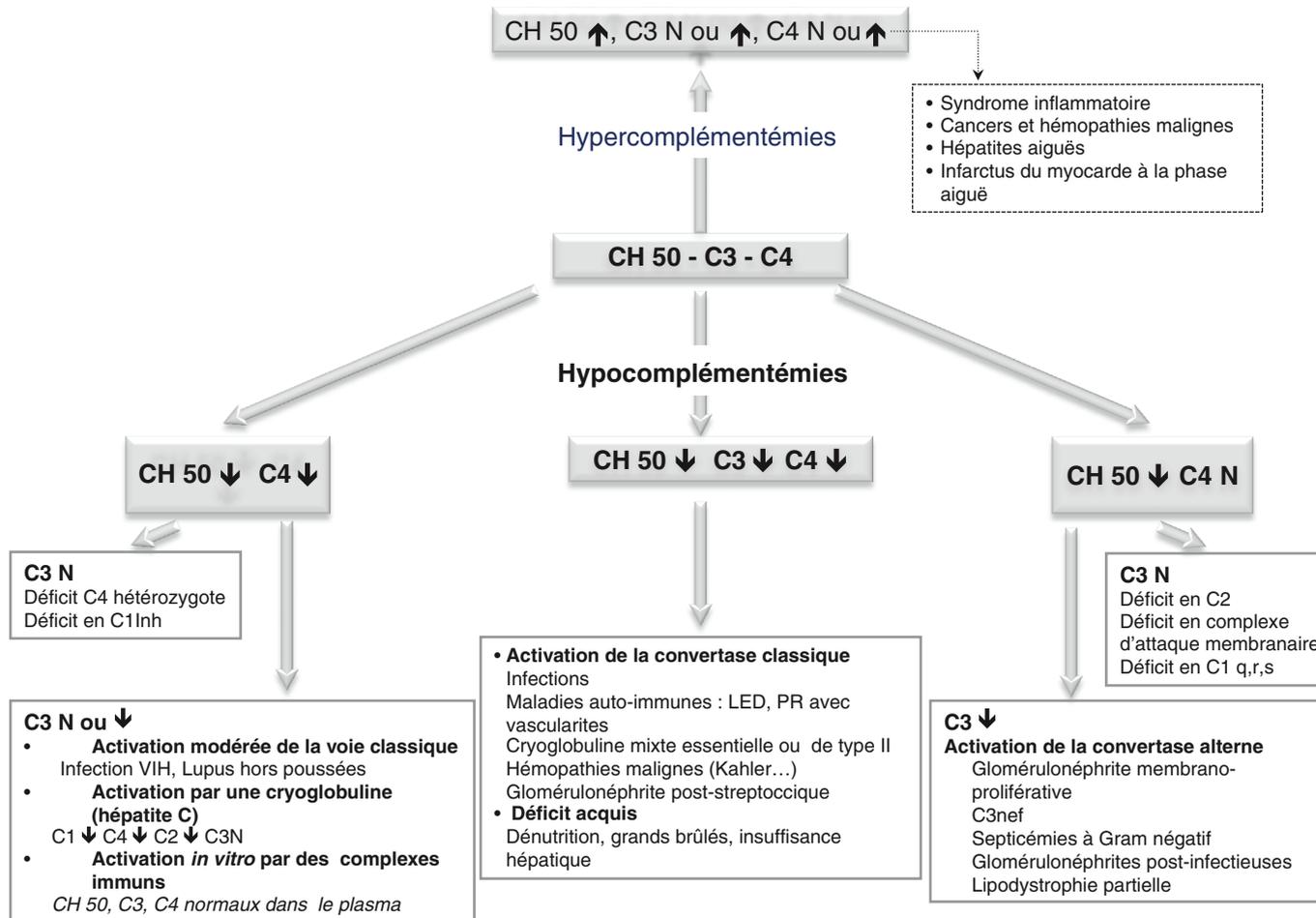
Les évaluations quantitatives des protéines du complément sont basées sur le principe de la réaction antigène-anticorps. Pour que cette réaction soit mesurable, il suffit donc de disposer de la protéine antigène cible en quantité suffisante (*e.g.* sérum à tester contenant la fraction recherchée) et d'un anticorps d'affinité élevée pour sa cible pour former un complexe stable capable de précipiter à l'équivalence.

### Méthodologies

#### Techniques quantitatives

La précipitation en milieu liquide investiguée par néphélométrie mesure la dispersion de la lumière qu'entraîne la formation de complexes immuns. Une gamme permet de tracer et de mémoriser la courbe du signal électrique en fonction de la concentration d'antigène. Le suivi du résultat d'un contrôle journalier permet de valider la stabilité de cet étalonnage. On peut également utiliser la turbidimétrie, toujours en présence d'un standard en plusieurs dilutions pour tracer une courbe d'étalonnage. La précipitation en milieu gélifié par immunodiffusion radiale peut être employée pour les protéines du complément ne pouvant pas être examinées sur un automate. Dans ce cas, la fraction recherchée contenue dans le sérum testé diffuse au sein d'un gel d'agarose contenant un anticorps précipitant polyclonal qui lui est spécifique. La concentration d'antigène est proportionnelle au diamètre au carré de l'anneau de précipitation. Cette technique est longue, de sensibilité moyenne et nécessite des quantités importantes d'antisérum.

Des ELISA sont disponibles pour doser les protéines du complexe d'attaque membranaire, les



**Fig. 8.2** Données issues de l'exploration du complément.

protéines de contrôle et les anaphylatoxines ou les auto-anticorps dirigés contre des fractions du complément, par exemple : anticorps anti-C1q, anti-C1 inhibiteur (C1Inh), anti-facteur H.

### Techniques semi-quantitatives

La détection de fragments de clivage, de chaînes polypeptidiques issues d'une protéine ou d'association de protéines du complément sous forme de complexes peut être réalisée par séparation électrophorétique et révélation immunologique par un anticorps spécifique. Des techniques d'immuno-électrophorèse en agarose permettent de mettre en évidence des fragments de C3, le facteur néphritique C3nef et les polymorphismes de C4. Des espèces moléculaires circulantes (*e.g.* C1Inh, C8) peuvent être détectées par une technique de western-blot.

### Recommandations de mise en œuvre

La néphélométrie nécessite des échantillons rigoureusement limpides. Les sérums troubles ou lipémiques sont centrifugés (12 000 × g) ou filtrés (0,4 µ). La lecture néphélométrique peut aussi être perturbée par des sérums ictériques ou hémolysés et une lecture (blanc) doit être effectuée avant addition des anticorps pour éliminer cette interférence. Les facteurs rhumatoïdes et les

immunoglobulines à haute concentration peuvent précipiter de façon non spécifique. Les automates recueillant des mesures cinétiques pourront pallier les limites d'un excès d'antigènes.

### Exemples d'applications (tableau 8.1)

La néphélométrie est couramment utilisée pour doser les fractions C3, C4, C1q, C1Inh, le facteur B et C5. L'immunodiffusion radiale est réservée aux protéines de concentration supérieure à 20 mg/L avec un anticorps polyclonal d'affinité suffisante. Cette technique n'est pas applicable pour C2 et le facteur D. Des ELISA sont applicables pour toutes les protéines à condition de disposer d'au moins deux types d'anticorps pour mettre en œuvre la technique sandwich.

### Récepteurs du complément (tableau 8.2)

L'expression des récepteurs du complément sur les leucocytes est évaluée par cytométrie en flux. Des tests fonctionnels spécifiques peuvent être mis en œuvre comme la phagocytose de particules opsonisées par le complément. Les anomalies d'expression des récepteurs du complément sont identifiées par examen génétique.

**Tableau 8.1** Synopsis du bilan du complément\*

	CH50	C3 Ag	C4 Ag	C4 fonctionnel	Facteur B	Examens complémentaires	Pathologies associées
<b>Activation de la convertase classique</b>	↓	N ou ↓	↓	↓	N	C1q Ac anti-C1q Exploration de C1Inh	Connectivite (lupus) Infections à répétition Angioedème
<b>Activation de la convertase alterne</b>	N ou ↓↓	↓↓	N	N	↓ Parfois N	VA50** Facteur H Facteur I C3nef	Syndrome hémolytique et urémique (SHU) atypique Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) Infections à pyogènes Glomérulonéphrite membrano-proliférative (GNMP)
<b>Activation des convertases classique et alterne</b>	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓	VA50** C3nef Complexe d'attaque membranaire (C5 à C9)	Glomérulopathie à C3, infections récurrentes à <i>Neisseria meningitidis</i>
<b>Activation (ou polymorphisme génétique) de la voie des lectines</b>	N	N	N ou ↓	N ou ↓	N	<i>Mannan binding lectin</i> (MBL) pondéral et fonctionnel	Infections à pyogènes Pathologies auto-immunes et maladies vasculaires

\* Les valeurs abaissées, normales ou élevées sont identifiées respectivement par les caractères ↓, N ou ↑.

\*\* VA50, test hémolytique évaluant la fonctionnalité de la convertase alterne.

**Tableau 8.2** Les récepteurs du complément

Protéine	Structure et masse	Ligand	Distribution cellulaire	Rôles
CR1 (CD35)	Glycoprotéine, 1 chaîne Type A : 190 kDa Type B : 220 kDa Type C : 160 kDa Type D : 250 kDa	C3b, C4b, iC3b, C3c	Érythrocytes, neutrophiles, éosinophiles, monocytes, lymphocytes B et T, cellules NK, cellules folliculaires dendritiques, cellules épithéliales	Fixation et transport complexes immuns, cofacteur du facteur I, régulation des C3 convertases, opsonisation
CR2 (CD21)	Glycoprotéine, 1 chaîne, 140 kDa	C3d, C3dg, iC3b, C3b Virus d'Epstein-Barr (EBV)	Lymphocytes B, cellules NK, cellules folliculaires dendritiques, cellules épithéliales, plaquettes	Récepteur de l'EBV, régulation des fonctions des lymphocytes B
CR3 (CD11b/18)	Glycoprotéine, 2 chaînes $\alpha$ : 165 kDa, $\beta$ : 95 kDa	iC3b, C3dg, LPS, Fibrinogène	Neutrophiles, éosinophiles, monocytes, lymphocytes T, cellules NK, cellules folliculaires dendritiques	Adhésion cellulaire et phagocytose
CR4 (CD11c/18)	Glycoprotéine, 2 chaînes $\alpha$ : 150 kDa, $\beta$ : 95 kDa	iC3b	Neutrophiles, monocytes, lymphocytes T, cellules NK	Adhésion cellulaire et phagocytose
C5aR (CD88)	Glycoprotéine transmembranaire intégrale, 1 chaîne, 42 kDa	C5a, C5a- <i>desArg</i>	Mastocytes, monocytes, neutrophiles, basophiles, cellules endothéliales	Activation non immune du mastocyte, chimiotaxie, perméabilité vasculaire
C5L2	Glycoprotéine transmembranaire intégrale, 1 chaîne, 36 kDa	C5a, C5a- <i>desArg</i> , C3a, C3a- <i>desArg</i> , C4a, C4a- <i>desArg</i>	Mastocytes, neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques	Modulation de l'activité de C5a
C3aR	Glycoprotéine transmembranaire intégrale, 1 chaîne, 54 kDa	C3a	Mastocytes, monocytes, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, lymphocytes T	Activation non immune du mastocyte, chimiotaxie, contraction des muscles lisses
C1qRp	Glycoprotéine polymérique (monomère 65–70 kDa)	C1q : région collagène <i>Mannan binding lectin</i> (MBL), surfactant (SPA)	Monocytes, fibroblastes, lymphocytes B, neutrophiles, plaquettes, cellules endothéliales	Opsonisation
CRlg	Glycoprotéine, 1 chaîne, 45/55 kDa superfamille des Ig	iC3b, C3b	Macrophages tissulaires	Phagocytose
MCP (CD46)	Glycoprotéine, 1 chaîne, 46 kDa	C3b, C4b	Toutes les cellules nucléées	Immunorégulation, récepteur de plusieurs pathogènes
DAF (CD55)	Glycoprotéine, 1 chaîne, 70 kDa (ancre GPI)	C4b2a, C4b2a3b, C3bBb, C3bBbC3b	Ubiquitaire à la surface des cellules sanguines et tissulaires	Régulateur des convertases, récepteur des virus Coxsackie
Protectine (CD59)	Glycoprotéine, 1 chaîne, 18 kDa (ancre GPI)	C5b678	Ubiquitaire à la surface des cellules sanguines et tissulaires	Contrôle du complexe d'attaque

## Ligands du complément

Au cours de l'activation du complément, les convertases (C4b2a pour les voies classiques ou des lectines et C3bBb pour la voie alterne) assurent la protéolyse limitée de C3. Cette réaction permet à C3, C4 et C5 d'effectuer la transition d'une forme soluble à une forme associée à l'accepteur en libérant un petit ligand diffusible.

Ces petits ligands solubles de faible masse moléculaire sont les anaphylatoxines C3a, C5a et C4a, douées de propriétés chimiotactiques et anaphylatoxiques (perméabilité endothéliale, contraction des bronchioles). Les anaphylatoxines et/ou leurs produits de dégradation (C3a-*desArg*, C5a-*desArg*, C4a-*desArg*) peuvent être quantifiés par des techniques ELISA avec des anticorps spécifiques.

Les gros fragments présentent après clivage un site leur permettant de se fixer à un groupement hydroxyle (ou aminé pour C4) de l'accepteur par liaison ester covalente. Ces ligands bifonctionnels, C3b, C3bi, C3dg/C3d et C4b, interagissent ainsi à la fois avec la cible de l'activation du complément et avec des récepteurs cellulaires spécifiques des cellules effectrices du système immunitaire. La détection de ces ligands dans les liquides biologiques est possible par immunoblot (C3, C3bi et C4b, [fig. 8.3a](#)) ou par ELISA (C3b, C3bi et C3d).

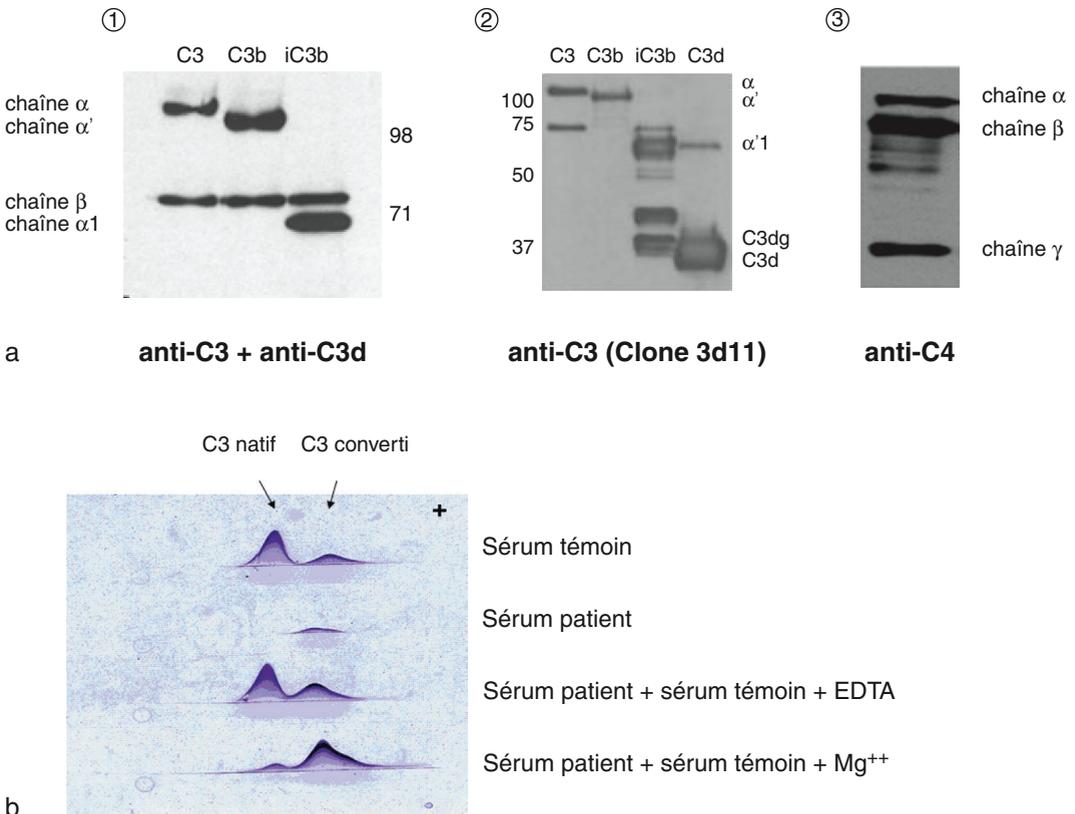
La recherche des fragments de coupure de C3 concerne aussi l'activité du facteur néphritique (C3nef), auto-anticorps stabilisant la C3 convertase, retrouvé chez environ 10 % des patients atteints de glomérulonéphrite membrano-proliférative. C3nef est recherché par immunofixation

après électrophorèse bidimensionnelle ([fig. 8.3b](#)) ou par un test hémolytique.

Le [tableau 8.3](#) récapitule les récepteurs et les fonctions des différentes fractions du complément et de leurs fragments.

## Exploration de l'angioœdème

L'angioœdème à kinines se traduit cliniquement par des œdèmes blancs, généralement non prurigineux et sans urticaire, spontanés et récurrents affectant les tissus sous-muqueux et sous-cutanés. Ils sont la conséquence de l'accumulation des kinines, bradykinine et *desArg*<sup>9</sup>-bradykinine sur les récepteurs endothéliaux. La [figure 8.4](#) décrit le processus de production et de catabolisme de ces deux ligands.



**Fig. 8.3** Fragments de C3 et de C4 sériques.

a. Western-blot : ① et ② protéines humaines purifiées (fragments de C3), ③ fragments de C4 (sérum humain normal).

b. Électrophorèse bidimensionnelle du sérum montrant une activité facteur néphritique C3 (C3nef).

**Tableau 8.3** Ligands du complément, ses récepteurs et ses fonctions

Ligand	Récepteur	Durée de vie du ligand	Fonction induite
<b>Ligands diffusibles</b>			
MBL*	cC1qR C1qRp		Opsonisation
Ficolines	cC1qR		Opsonisation
C1q	cC1qR C1qRp gC1qR		Élimination des complexes immuns Effet antiprolifératif sur les lymphocytes B <i>in vitro</i>
<b>Ligands bifonctionnels à fixation covalente à l'accepteur</b>			
C3b	CR1 (CD35) MCP2 (CD46)	10 minutes	Opsonisation Adhérence immune
C3bi	CR1 (CD35) CR2 (CD21) CR3 (CD11b/CD18) CR4 (CD11c/CD18) MCP** (CD46)	Quelques heures	Opsonisation
C3d (C3d,g)	CR1 (CD35) CR2 (CD21) CR3 (CD11b/CD18) MCP2 (CD46)	> 24 heures	CR2 : modulation de la réponse des cellules B CD46 : orientation des cellules T naïves CR1, CR3 : opsonisation
C4b	CR1 (CD35) MCP** (CD46)	10 minutes	Opsonisation
<b>Anaphylatoxines</b>			
C3a C3a- <i>desArg</i>	C3aR C3aR (faible affinité)	7 minutes 2 heures	Chimiotactisme, immunorégulation des lymphocytes B et T, augmentation de la perméabilité vasculaire
C5a C5a- <i>desArg</i>	C5aR (CD88) C5aR (CD88)	2–3 minutes 2 heures	Chimiotactisme, régulation de la réponse immunitaire des lymphocytes B et T, augmentation de la perméabilité vasculaire
C4a	C3aR	2–3 minutes	Chimiotactisme, augmentation de la perméabilité vasculaire

\* MBL = *Mannan Binding Lectin*.

\*\* MCP = *Membrane Cofactor Protein*.

L'exploration biologique des angioedèmes à kinines repose sur l'examen de plusieurs paramètres décisionnels :

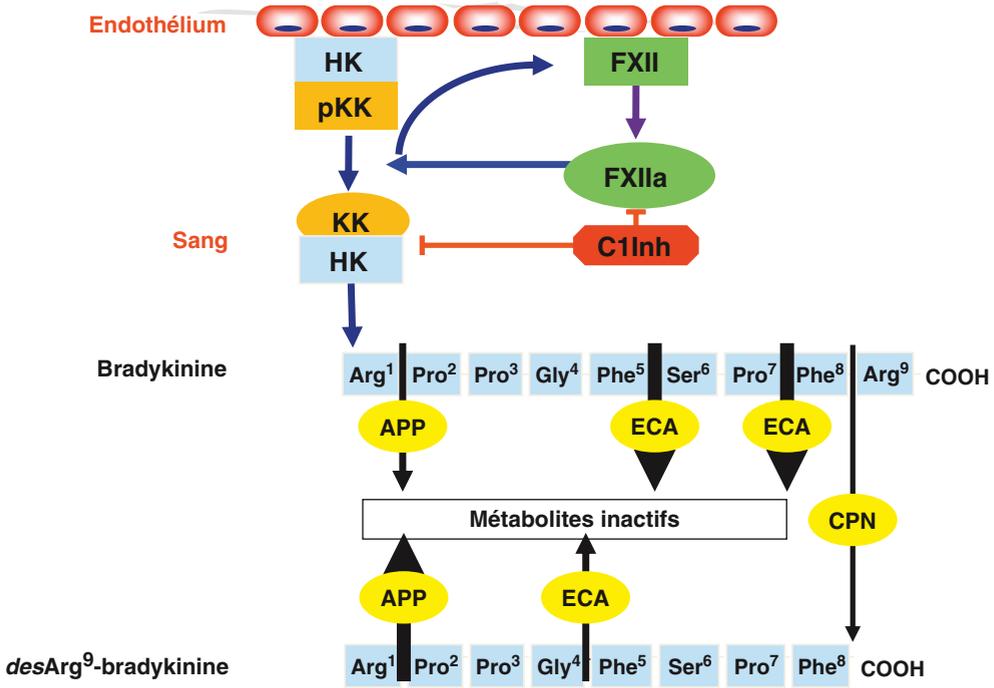
- la kininofomation, ou capacité de production des kinines, par la mesure de l'activité kininogénase spontanée du plasma et de l'activité des pro-enzymes;
- l'efficacité des systèmes de contrôle de la kininofomation par C1Inh, avec les mesures de l'anti-génémie et de l'activité de contrôle de C1Inh vis-à-vis de sa cible analytique, la protéase C1s;
- l'activité des enzymes du catabolisme des kinines : aminopeptidase P, carboxypeptidase N, enzyme de conversion de l'angiotensine-I, dipeptidyl peptidase IV;

- l'exploration génétique des gènes de causalité ou de susceptibilité;

Le [tableau 8.4](#) décrit les analyses enzymatiques de l'exploration des angioedèmes à kinines.

### Méthodologie

La concentration en C1Inh est déterminée par néphélométrie, ce qui discrimine les situations d'angioedème avec défaut quantitatif de C1Inh (angioedème de type I) des situations de défaut qualitatif (type II). La fonction de C1Inh est évaluée par l'activité résiduelle de la protéase C1s après incubation avec le plasma. Les espèces moléculaires de C1Inh et du kininogène de haut poids



**Fig. 8.4** Métabolisme des kinines bradykinine et desArg<sup>9</sup>-bradykinine.

APP : aminopeptidase P; C1Inh : C1 inhibiteur; CPN : carboxypeptidase N ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine-I; FXII : facteur XII ou facteur Hageman; FXIIa : facteur XII activé; HK : kininogène de haut poids moléculaire; KK : kallibréine; pKK : prékallibréine.

**Tableau 8.4** Analyses enzymatiques de l'exploration de l'angioœdème

Paramètre	Échantillon	Activité mesurée	Principe	Signification	Substrat	Type de méthode
<b>C1 inhibiteur</b>						
C1 inhibiteur fonctionnel	Plasma citrate ou EDTA	Protéase C1s	Activité C1s résiduelle après inhibition par C1Inh	Capacité de contrôle par C1Inh	Benzoyl-L-Arg-ethyl ester Ethyl-Lys-Gly-Arg-pNA Meoc-Lys-Gly-Arg-pNA	Cinétique spectrophotométrique
<b>Kininoformation</b>						
Activité kininogénase spontanée	Plasma citrate	Enzymes clivant HK (principalement : kallibréine)	Capacité du plasma à cliver HK	Activité spontanée du plasma	HD-Pro-Phe-Arg-pNA	Cinétique spectrophotométrique
Activité des proenzymes	Plasma citrate		Réserve de pro-enzymes (activation par le dextran sulfate)	Activation chronique		

Tableau 8.4 Suite

Paramètre	Échantillon	Activité mesurée	Principe	Signification	Substrat	Type de méthode
<b>Catabolisme des kinines</b>						
Aminopeptidase P (APP)	Plasma citrate	Activités enzymatiques spécifiques	Catabolisme de BK (2 <sup>e</sup> rang) et <i>desArg</i> <sup>9</sup> -BK (1 <sup>re</sup> rang)	Dégradation de BK et <i>desArg</i> <sup>9</sup> -BK	Lys-(Dnp)-Pro2-Gly-Lys-(Abz)-NH <sub>2</sub>	Cinétique spectrofluorimétrique
Carboxypeptidase N (CPN)	Plasma citrate		Transformation de BK en <i>desArg</i> <sup>9</sup> -BK		Dns-Ala-Arg	Fluorimétrie en point final avec extraction chloroformique du produit
Enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECA)	Plasma citrate		Catabolisme de BK (1 <sup>re</sup> rang) et <i>desArg</i> <sup>9</sup> -BK (2 <sup>e</sup> rang)		Furylacryloyl-Phe-glycyl-Gly	Cinétique spectrophotométrique
Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)	Plasma citrate		Catabolisme de BK, <i>desArg</i> <sup>9</sup> -BK et substance P		L-Gly-Pro-pNA	Cinétique spectrofluorimétrique

BK : bradykinine; C1Inh : C1 inhibiteur; *desArg*<sup>9</sup>-BK : *desArg*<sup>9</sup>-bradykinine; HK : kininogène de haut poids moléculaire.

moléculaire s'examinent par électrophorèse suivie d'une révélation par immunoblot (tableau 8.5).

Les quantités de bradykinine et de *desArg*<sup>9</sup>-bradykinine produites lors d'une crise ne sont pas accessibles directement en raison de leur demi-vie très courte. Par contre, il est possible d'activer *in vitro* le plasma par le sulfate de dextran et de suivre la cinétique de production des kinines produites, proportionnelle à la quantité résiduelle de kininogène natif, accédant par défaut à la part ayant donné lieu à production des kinines. Cette estimation est aussi possible par l'appréciation relative des espèces moléculaires du kininogène par immunoblot.

Dans le cadre des angioedèmes avec déficit en C1Inh, plus de 400 anomalies du gène *SERPING1* ont été inventoriées. La mutation familiale est portée à l'état hétérozygote chez les patients, elle est identifiée par séquençage des exons et des séquences 5' et 3' bordantes, exceptionnellement par MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

Dans les angioedèmes avec fonction de C1Inh normale, seule la mutation faux-sens 983A/G du gène

*F12* a été identifiée comme causale, elle est retrouvée à l'état hétérozygote chez moins de 10 % des patients. La baisse de l'activité aminopeptidase P s'associe fréquemment au polymorphisme -2399A dans le gène *XPNPEP2*, porté par le chromosome X.

### Recommandations de mise en œuvre

La fonction de C1Inh est peu soumise à variabilité dans le temps; on note seulement une discrète consommation par la forte activité protéolytique en cas de crise, cet examen est possible à distance d'un événement clinique, sauf dans les conditions d'angioedème avec fonction de C1Inh normale si la coupure protéolytique de C1Inh est recherchée.

L'activité kininogénase spontanée est augmentée de façon constante dans les angioedèmes associés à un déficit en C1Inh. Elle augmente périodiquement lors des phases actives de la pathologie dans les angioedèmes avec fonction normale de C1Inh. Dans cette seconde situation, le moment du recueil de l'échantillon est critique, au plus proche de la crise, idéalement moins de 24 heures après le début des symptômes et en

**Tableau 8.5** Immunoblot de C1 inhibiteur et du kininogène de haut poids moléculaire

	C1 inhibiteur (C1Inh)	Kininogène de haut poids moléculaire (HK)
Échantillon	Plasma + protéase C1s	Plasma natif
Masse moléculaire	– C1Inh natif : 105 kDa – C1Inh complexé à C1s : 180 kDa – C1Inh clivé : 95 kDa	– HK natif : 110 kDa – HK clivé, chaîne H : 60 kDa – HK clivé, chaîne L : 54 kDa et 45 kDa
Séparation	Électrophorèse en milieu dénaturant (SDS-PAGE)	
Révélation	Antisérum polyclonal anti-C1Inh	Antisérum polyclonal anti-chaîne légère du HK
Interprétation	Qualitative : – capacité de C1Inh à lier la protéase cible – coupure de C1Inh en condition de forte activité protéolytique	Quantitative : évaluation de la consommation du HK, avec estimation de la production de BK
Validité	Indépendante des périodes de crise	– Temps de demi-reconstitution du HK : 60 h – L'échantillon doit être recueilli dans un délai maximum de 2 jours après une crise

l'absence de traitement interférant avec les mesures enzymatiques (*e.g.* acide tranexamique). La conversion proenzymes–enzymes est un paramètre critique et sensible, et les conditions de transport de l'échantillon sanguin doivent également être respectées, avec température contrôlée comprise entre 20 et 25 °C, dans un délai inférieur à 48 h.

Les activités du catabolisme des kinines sont stables au cours du temps, sauf dans les situations d'angioœdèmes iatrogènes déclenchés par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC), ou un inhibiteur de la dipeptidyl peptidase IV (gliptine). Dans ce cas, il est préférable d'investiguer l'échantillon au moins 2 semaines après l'arrêt du traitement.

# Chapitre 9

## Exploration des immunoglobulines

### Immunoglobulines monoclonales : méthodes diagnostiques

Les gammopathies monoclonales correspondent à l'apparition de clones, malins ou non, de lymphocytes B. Elles sont caractérisées par la sécrétion en excès d'immunoglobulines complètes ou de chaînes légères présentant une grande homogénéité liée à leur clonalité. Elles sont détectées chez un peu plus de 3 % des sujets après 50 ans, et jusqu'à 7 % après 70 ans. Ce sont, dans environ la moitié des cas, des gammopathies monoclonales de signification indéterminée (*Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* ou MGUS). Toute hypogammaglobulinémie, chez un sujet de 45 ans ou plus, doit faire rechercher une immunoglobuline monoclonale, qu'il y ait ou non un pic à l'électrophorèse, afin de ne pas méconnaître un myélome à chaîne légère.

La présence d'une immunoglobuline monoclonale se caractérise par l'augmentation sélective d'une seule espèce moléculaire d'immunoglobulines sériques causée par la prolifération incontrôlée d'un clone unique de lymphocytes B. Elle est constituée soit d'une seule classe de chaîne lourde et d'un seul type de chaîne légère, soit de chaînes légères isolées d'un seul type, ou encore, beaucoup plus rarement, de fragments de chaînes lourdes d'une seule classe. Sa mise en évidence et sa caractérisation dans les liquides biologiques consistent à affirmer son homogénéité de charge par sa mobilité à l'électrophorèse et son isotypie (type de chaîne

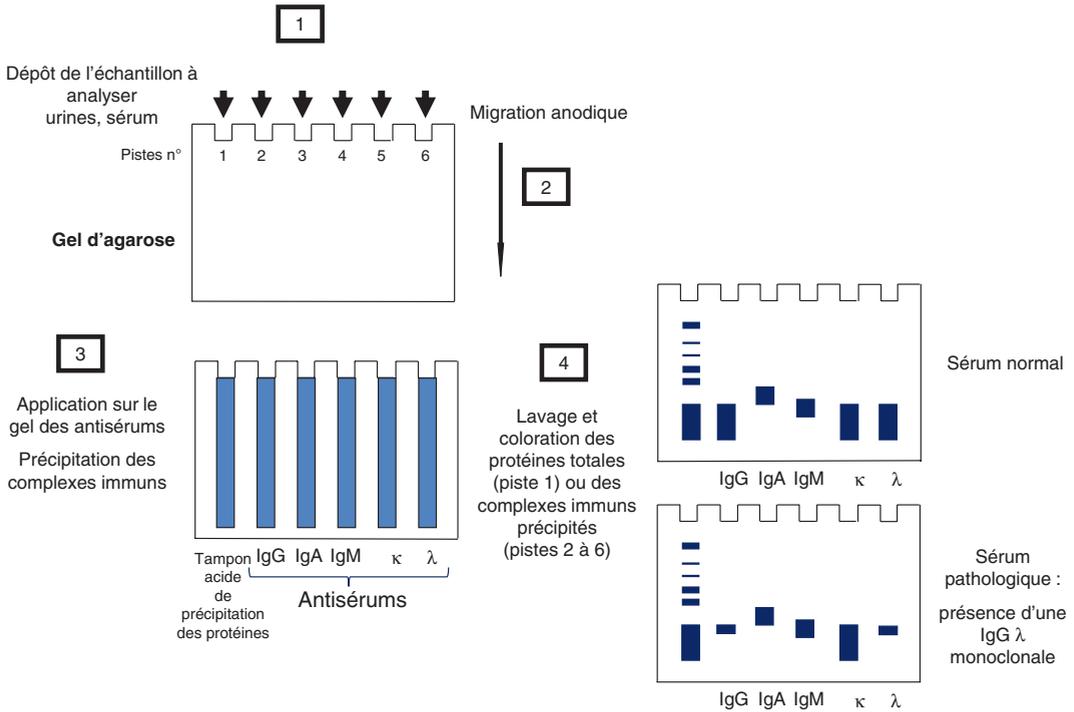
légère, classe, voire sous-classe de chaîne lourde) identifiée par une technique spécifique. Toute suspicion de gammopathie monoclonale impose de plus l'analyse concomitante du sérum et des urines.

Quatre méthodes diagnostiques qualitatives permettent la mise en évidence d'une immunoglobuline monoclonale : l'immuno-électrophorèse, l'immuno-fixation, l'immuno-empreinte et l'immunosoustraction par électrophorèse capillaire. Ces techniques ont peu d'intérêt dans le suivi tant que le pic ne se modifie pas sur le tracé électrophorétique. Le dosage quantitatif des chaînes légères libres sériques se voudrait un marqueur de clonalité, de mise en évidence et de suivi d'une immunoglobuline monoclonale. Il est cependant dangereux de vouloir tirer une conclusion qualitative quant à la nature monoclonale d'une immunoglobuline à partir de données volontairement amplifiées par le calcul du rapport entre les quantités de chaînes légères kappa et lambda.

### Méthodologies qualitatives

L'immuno-électrophorèse (fig. 9.1) reste la technique de référence pour la détection des immunoglobulines monoclonales. Cette technique est un prérequis pour la réalisation de l'immunosélecttion, qui accède au diagnostic positif de maladie des chaînes lourdes. Les techniques d'immuno-électrophorèse et d'immuno-fixation ont été décrites dans le chapitre 3.

En immuno-électrophorèse, l'utilisation d'antisérum globaux, reconnaissant toutes les protéines du sérum humain, permet de démembrer chaque groupe en visualisant les arcs respectifs de



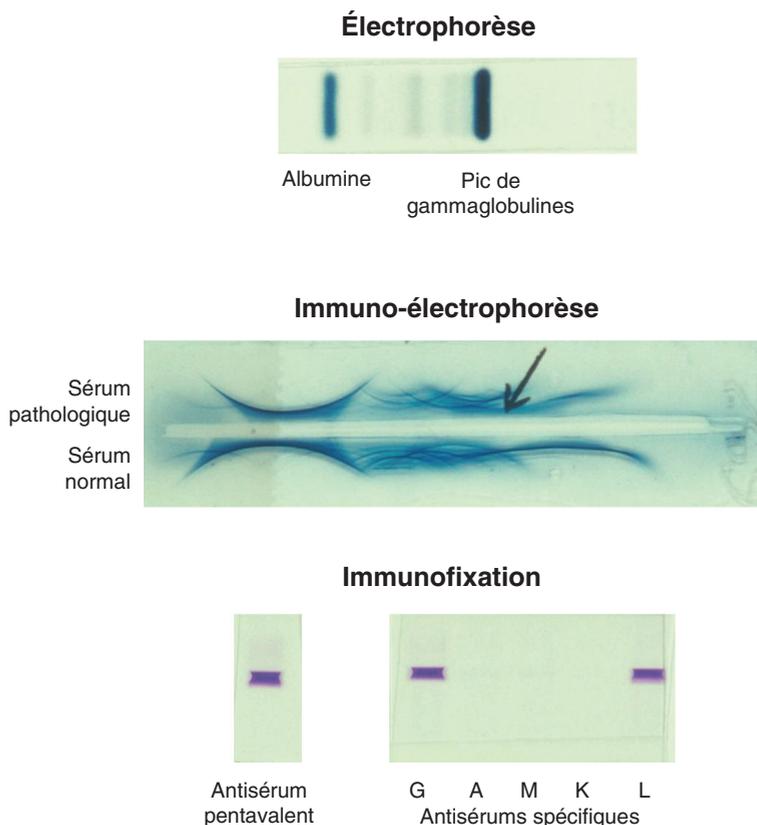
**Fig. 9.1** Principe de l'immunofixation, application à l'identification d'une immunoglobuline monoclonale.

Les échantillons sont chargés sur le gel d'agarose (1), puis soumis à une migration électrophorétique (2). La piste 1 est soumise à une précipitation acide. Les autres pistes du gel sont recouvertes d'antisérums qui précipitent les protéines reconnues (3). Après lavage, les protéines du gel sont colorées (4).

précipitation. L'analyse peut être poursuivie, si un pic a été détecté à l'électrophorèse, en appliquant des antisérums spécifiques des chaînes lourdes (G, A, M) et des chaînes légères des immunoglobulines (kappa et lambda), affirmant ainsi la nature monoclonale de l'immunoglobuline produite en quantité telle qu'elle est responsable du pic. S'il s'agit d'un premier diagnostic, le sérum du patient est comparé à un sérum humain normal. S'il s'agit d'une gammopathie monoclonale connue, le sérum du patient est analysé en comparaison avec sa dernière antériorité.

L'immunofixation est une variante méthodologique de l'immuno-électrophorèse qui a l'avantage d'être plus rapide en permettant une réponse en 3 heures. Elle est également un peu plus sensible avec un seuil de 0,5 à 1 g/L. Surtout, elle est en partie automatisable. La première étape consiste toujours en une migration électrophorétique du sérum dans un gel d'agarose, mais la

deuxième étape, immunologique, est différente. L'anticorps spécifique (anti-chaîne légère ou anti-chaîne lourde) est déposé à la surface du gel, y diffuse et forme un précipité avec son antigène. Les complexes antigène-anticorps sont piégés directement dans le gel. Après lavage, le précipité est coloré par un colorant spécifique des protéines. Il n'y a pas, comme dans l'immuno-électrophorèse, d'effet « parapluie » (masquage des arcs de précipitation par les immunoglobulines polyclonales), ce qui peut faciliter le typage des IgM. Les dilutions de l'échantillon peuvent être adaptées pour atteindre la gamme de 0,5 à 2 g/L d'immunoglobuline monoclonale suspectée. Il est aussi possible de modifier la dilution des antisérums afin d'être dans la zone d'équivalence. Ceci évite les phénomènes de zone en condition d'excès d'antigène, ou au contraire de typer un faible renforcement au sein d'une hypogammaglobulinémie. La pré-incubation de l'échantillon avec un volume adapté



**Fig. 9.2** Analyse combinée immuno-électrophorèse/immunofixation.

L'existence d'un pic à l'électrophorèse se traduit par la déformation sur l'arc des IgG à l'immuno-électrophorèse avec un antisérums polyvalent anti-protéines humaines (flèche). L'immunofixation à l'aide d'un antisérums pentavalent (mélange de cinq antisérums spécifiques dirigés contre les trois isotypes de chaîne lourde [ $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\mu$ ] et les deux isotypes de chaînes légères [ $\kappa$  et  $\lambda$ ]) ou d'antisérums spécifiques séparément affirme l'existence d'une immunoglobuline de classe G et de type  $\lambda$ .

d'antisérums anti-chaîne légère permet, dans certains cas de gammopathies biclonales de migration identique, d'affirmer l'existence de deux immunoglobulines monoclonales de même classe si les isotypes de chaînes légères diffèrent (fig. 9.2).

La technique d'immuno-empreinte nécessite la parfaite maîtrise du western-blot. Elle est plus sensible que l'immuno-électrophorèse et que l'immunofixation grâce à la révélation immuno-enzymatique des immunoglobulines, condition adaptée à l'étude des urines ou du liquide céphalo-rachidien sans concentration préalable. Elle présente également l'avantage d'appliquer l'utilisation d'anticorps non précipitants, tels que les anticorps monoclonaux, d'éviter les phénomènes de zone, d'être réversible et ainsi de permettre plusieurs typages sur une même membrane. Son inconvénient est

d'être peu discriminante sur des sérums totaux où les bandes sont difficiles à distinguer sur le fond polyclonal.

L'électrophorèse capillaire de zone est une microméthode automatisée qui permet d'analyser jusqu'à cinquante échantillons de sérum à l'heure. Il s'agit d'une séparation électrocinétique effectuée dans un tube de diamètre interne inférieur à 100 microns et rempli d'un milieu et d'électrolytes. Elle assure la séparation rapide de très faibles quantités de protéines avec une haute résolution. La lecture de l'absorbance à une longueur d'onde proche de l'ultraviolet (206 ou 214 nm) mesure les liaisons peptidiques et permet d'intégrer directement l'abondance de chaque fraction protéique. En raison de la charge négative des parois du tube capillaire, généralement

à base de silice, et des propriétés des tampons de migration, les protéines se déplacent sous l'effet du courant d'électro-endosmose et non plus sous l'effet de leur charge comme dans les électrophorèses en gel. En conséquence, le déplacement des fractions protéiques se fait dans l'ordre inverse, la fraction des gammaglobulines étant la plus rapide. Le phénotypage d'une immunoglobuline monoclonale est possible par immunosoustraction en développant l'électrophorèse capillaire avant et après incubation du sérum à tester avec des billes de sépharose couplées à des antisérums anti-chaînes lourdes ou anti-chaînes légères d'immunoglobuline. La disparition du pic après incubation affirme la monotypie par comparaison au sérum initial uniquement incubé avec des billes non couplées. Le prérequis est la capacité de l'électrophorèse capillaire à mettre en évidence le pic en cas de gammopathie monoclonale.

### Recommandations de mise en œuvre

Pour l'immuno-électrophorèse et l'immunofixation, il est nécessaire d'utiliser des antisérums polyclonaux précipitants. Il convient de s'assurer de la spécificité des antisérums à chaque changement de lot par typage vis-à-vis d'immunoglobulines monoclonales connues et de déterminer la dilution optimale d'utilisation. Il faut respecter, voire modifier les dilutions standard de l'échantillon et des antisérums pour rester dans la zone d'équivalence.

Dans le cadre d'un myélome à chaînes légères, une chaîne légère libre monoclonale sérique, appelée autrefois protéine de Bence-Jones, peut être indétectable par électrophorèse, voire même par les techniques spécifiques mentionnées ci-dessus, et prendre en défaut les dosages néphélométriques. Dans ce cas, c'est l'analyse des urines qui permet de poser le diagnostic. L'analyse des urines non concentrées par immunofixation est désormais réalisée sur des gels commerciaux, mais il peut être nécessaire d'avoir recours à l'immuno-électrophorèse après concentration. À noter que les chaînes légères peuvent être quantifiables dans le sérum en néphélométrie ou turbidimétrie. Si les méthodes classiques détectent des chaînes légères monoclonales en l'absence de chaînes

lourdes monoclonales, il faut penser à éliminer l'existence d'une IgD ou d'exceptionnelles IgE monoclonales avant d'affirmer qu'il s'agit d'un myélome à chaînes légères.

Le typage de la chaîne légère d'une IgA monoclonale est parfois difficile en raison de l'accès des antisérums aux épitopes de chaîne légère dans la molécule entière d'immunoglobuline. Il peut être nécessaire d'utiliser une méthode plus sensible, comme l'immunofixation adaptée pour les urines.

Les immunoglobulines monoclonales cryoprécipitantes imposent de respecter des conditions pré-analytiques particulières, notamment un maintien à 37 °C tout au long de la manipulation.

L'immunofixation a comme principal inconvénient, par rapport à l'immuno-électrophorèse, d'ignorer totalement l'exploration des autres protéines sériques.

L'immuno-empreinte, du fait de sa plus grande sensibilité, détecte de petits pics chez des sujets sains âgés de plus de 70 ans avec une fréquence proche de 60 %, dont la pertinence clinique reste à établir.

Les limites de l'électrophorèse capillaire sont inscrites dans son principe. La lecture dynamique du passage des protéines devant la fenêtre de détection n'explore plus exhaustivement la migration des protéines anormales et supprime le contrôle visuel de la lecture du gel en générant un électrophorégramme reconstruit. Certaines protéines peuvent ainsi ne pas être détectées, soit parce qu'elles migrent avant le début du signal, soit parce qu'elles restent immobiles dans le tube capillaire. Certaines substances adsorbant dans les ultraviolets proches, comme le fibrinogène et certains produits de contraste, sont par ailleurs susceptibles de générer de faux pics. Il existe un consensus pour admettre la moindre sensibilité de l'électrophorèse capillaire pour identifier certaines gammopathies monoclonales, notamment les petites immunoglobulines monoclonales noyées dans une importante hypergammaglobulinémie. Les gammopathies monoclonales non détectées par l'électrophorèse capillaire sont typiquement de faible quantité, ont souvent un point isoélectrique élevé et migrent en position gamma lente. Le seuil de détection par électrophorèse capillaire

des gammopathies monoclonales a été évalué à 0,5 g/L, avec un succès garanti du phénotypage par immunosoustraction au-dessus de 10 g/L. Son utilisation en première intention nécessite une reprise par immunofixation pour un nombre non négligeable de sérums.

Contrairement aux autres immunoglobulines monoclonales, les molécules retrouvées au cours des maladies des chaînes lourdes ont une structure anormale. Ces chaînes lourdes sont délétées en général au niveau du premier domaine constant, ce qui explique leur expression sans chaînes légères. Leur taux est le plus souvent faible, de l'ordre du g/L ou moins, et leur présence peut passer inaperçue à l'électrophorèse. En raison de leur structure, ces protéines ont une grande hétérogénéité de charge et s'il existe une bande à l'électrophorèse, celle-ci est plus souvent large qu'étroite. De plus leur migration peut être très rapide, notamment pour les chaînes  $\mu$ . Dans le sérum, l'immuno-électrophorèse met en évidence un constituant qui précipite avec un seul antisérum anti-chaîne lourde ( $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\mu$  par ordre de fréquence) sans réagir avec les antisérums anti-chaînes légères. Cette absence de précipitation avec les antisérums anti- $\kappa$  et anti- $\lambda$  n'est cependant pas un critère suffisant pour affirmer une maladie des chaînes lourdes. En effet, comme mentionné ci-dessus, il est parfois difficile de mettre en évidence les chaînes légères  $\lambda$  des IgA monoclonales. Le recours à une technique spéciale d'immunosélecton combinée à l'immuno-électrophorèse permet de poser le diagnostic. Cette méthode consiste à incorporer dans la gélose des antisérums anti-chaînes légères de forte affinité afin de faire précipiter toutes les molécules d'immunoglobulines entières, monoclonales ou polyclonales, ne laissant plus persister que l'arc de la chaîne lourde pathologique (fig. 9.3). Dans ces maladies, les taux sériques des immunoglobulines résiduelles sont le plus souvent abaissés. Dans les urines, la mobilité électrophorétique de la protéine est habituellement la même que dans le sérum. L'excrétion urinaire est exceptionnelle dans la maladie des chaînes lourdes  $\gamma$ , minime dans celle des chaînes lourdes  $\alpha$ . Dans deux tiers des cas de maladie des chaînes lourdes  $\mu$ , il existe une excrétion urinaire de chaînes légères monotypiques.

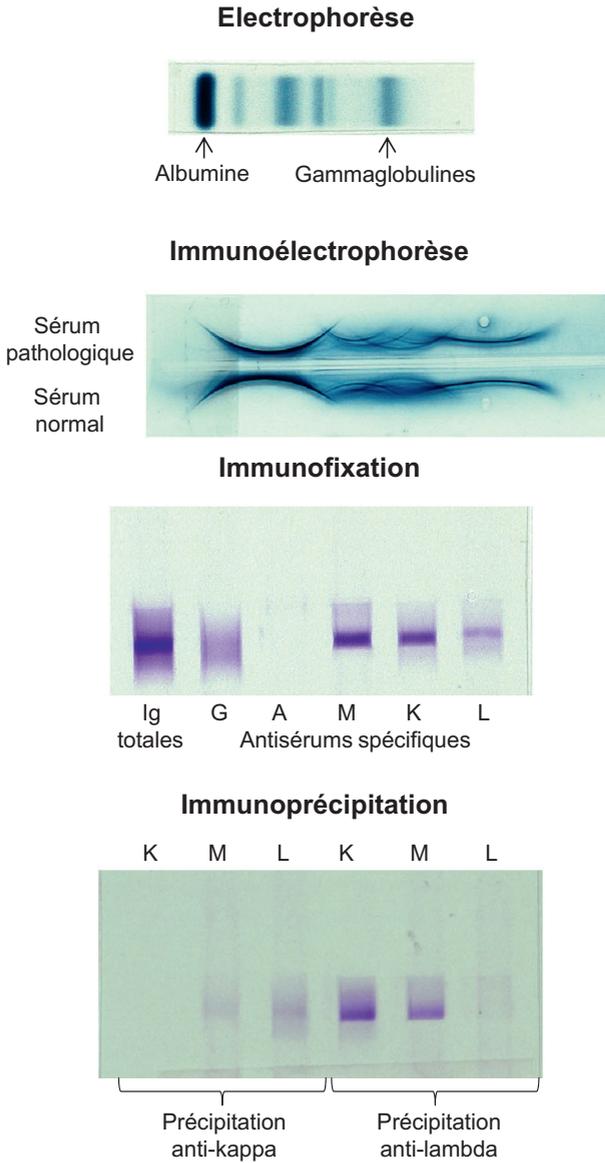
## Particularités des recherches d'immunoglobulines monoclonales

Problèmes rencontrés	Solutions
Bande au niveau du dépôt sur le gel d'électrophorèse	Présence de fibrinogène (plasma, patient sous héparine) IgM monoclonale : traiter l'échantillon au $\beta$ -mercaptoéthanol
Chaîne légère monoclonale en l'absence de chaîne lourde monoclonale	Penser à un myélome à IgD ou IgE Sinon, myélome à chaîne légère
Difficulté du typage de la chaîne légère d'une IgA ou d'une IgG	Utiliser une méthode plus sensible (immunofixation, immunosélecton) Penser à une maladie des chaînes lourdes
Présence de deux IgG avec des chaînes légères différentes	Immunosoustraction pour éliminer une des deux immunoglobulines monoclonales
Immunoglobuline monoclonale précipitant au froid : cryoglobuline de type I	Électrophorèse et immunofixation à 37 °C Analyse spécifique de la cryoglobuline

## Méthodologies quantitatives

Le dosage néphélométrique des immunoglobulines concerne les trois isotypes principaux, à savoir IgG, IgA et IgM et parfois les IgD. Ces dosages représentent un critère du diagnostic différentiel entre gammopathie monoclonale de signification indéterminée ou MGUS (*Monoclonal Gammopathy of Unknown Significance*), la plus fréquente des étiologies, et prolifération lymphoïde B avérée (e.g. myélome, maladie de Waldenström, leucémie lymphoïde chronique, amylose). Ils renseignent également sur les risques infectieux potentiels en quantifiant l'hypogammaglobulinémie résiduelle.

L'interprétation des dosages des immunoglobulines par néphélométrie chez un patient ayant une immunoglobuline monoclonale doit être faite avec prudence. Il peut arriver, en cas de pic important ou en raison du caractère polyclonal des antisérums utilisés, que le dosage de l'isotype correspondant à l'immunoglobuline monoclonale soit exagérément minoré, parce qu'il est réalisé en excès d'antigène ou que les épitopes spécifiques de cette immunoglobuline particulière ne sont pas reconnus par l'antisérum. Ceci s'observe plutôt en cas d'IgM monoclonale. Il est donc préférable d'utiliser les



**Fig. 9.3** Gammopathie biconale de migration unique.

L'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse mettent en évidence un pic de gammaglobulines.

L'observation d'une bande de même migration avec les deux antisérums antichaînes légères conduit à renouveler l'immunofixation après immunoprécipitation du sérum par chaque antisérum. Après précipitation par l'antisérum anti- $\kappa$ , on individualise une immunoglobuline de classe M et de type  $\lambda$ , et après précipitation par l'antisérum anti- $\lambda$ , on individualise une immunoglobuline de classe M et de type  $\kappa$ .

dosages issus de l'intégration de la courbe d'électrophorèse pour suivre l'évolution d'un pic et de réserver les dosages pondéraux à l'évaluation des immunoglobulines résiduelles. À l'inverse, l'existence d'une immunoglobuline monoclonale, le plus souvent de classe IgM, peut perturber le dosage néphélométrique d'autres protéines telles que les IgA, la ferritine ou la protéine C réactive.

Le dosage des chaînes légères libres d'immunoglobulines est une autre manière quantitative

d'apprécier une gammopathie monoclonale. Les chaînes légères libres monoclonales sont produites en très grandes quantités dans les myélomes à chaînes légères. De plus, il y a très souvent un excès, même faible, de chaînes légères libres en présence d'une immunoglobuline monoclonale complète. Deux industriels (Binding Site et Siemens) ont initialement développé des antisérums polyclonaux spécifiques capables de quantifier les chaînes légères libres d'immunoglobulines.

Ces dosages reposent sur des anticorps reconnaissant des épitopes habituellement masqués par l'association des chaînes légères aux chaînes lourdes dans les immunoglobulines entières. Ces dosages restent toutefois imprécis, car les antisérum polyclonaux ont des spécificités variables d'un lot à l'autre pour la distinction entre les chaînes légères libres et liées et mesurent parfois une partie des immunoglobulines entières. De plus, le taux de chaînes légères excédentaires varie d'un clone plasmocytaire à l'autre et la fonction rénale du patient peut influencer le dosage et altérer le rapport kappa/lambda conduisant aussi bien à des faux négatifs qu'à des faux positifs. Le dosage des chaînes légères libres doit être couplé à l'immuno-électrophorèse ou à l'immunofixation des urines. L'apport diagnostique du dosage des chaînes légères libres est patent dans les situations cliniques où l'absence de marqueur monoclonal peut être un handicap (myélomes à chaîne légère, myélomes apparemment non sécrétants, amyloses et maladie de dépôt de chaînes légères d'immunoglobulines). Dans les myélomes à immunoglobulines intactes et les MGUS, l'apport du dosage des chaînes légères libres comme marqueur diagnostique ou comme indicateur de pronostic ou de suivi thérapeutique reste à prouver.

En février 2009, le groupe de consensus international sur le myélome a publié une mise au point reprenant les acquis sur les avantages et les inconvénients de ces nouveaux réactifs ainsi que sur les indications validées et rappelant les biais méthodologiques mentionnés ci-dessus. Suite à l'absence de corrélation entre les dosages sériques et urinaires de chaînes légères libres, ce groupe a recommandé de ne pas pratiquer les dosages de chaînes légères libres dans les urines. Pour le dépistage des syndromes lymphoprolifératifs B, la réalisation concomitante, sur le sérum de l'électrophorèse, de l'immunofixation et des dosages de chaînes légères libres apparaît suffisante. Seule l'amylose nécessite encore l'analyse des urines. Une fois le diagnostic de syndrome lymphoprolifératif établi, le groupe estime que l'analyse des urines par immunofixation est indispensable. Différents algorithmes de stratification pronostique ont été validés, incluant, au diagnostic, le dosage des chaînes légères libres sériques. Pour le

suivi de la réponse au traitement, le groupe n'a validé l'intérêt du dosage des chaînes légères libres que pour les proliférations lymphoïdes paucisécétrantes : amylose, myélome non sécrétant et maladie de dépôt de chaînes légères. Le même groupe a validé plus tard ces algorithmes de stratification pronostique au diagnostic pour les MGUS et les myélomes asymptomatiques (*Smoldering Multiple Myeloma* ou SMM), recommandant de ne pas pratiquer de dosages systématiques de chaînes légères libres dans le suivi des MGUS.

### Cryoglobulines

Le froid entraîne des signes cliniques chez certains sujets du fait de la précipitation de protéines sériques ou plasmatiques dans les vaisseaux de petit et moyen calibre, telles que les cryoglobulines et le cryofibrinogène. Les cryoglobulines sont secondaires à des pathologies immunoprolifératives, auto-immunes ou infectieuses. Les signes cliniques associés sont des vascularites, se traduisant par des signes cutanés (*purpura*, phénomène de Raynaud), des arthralgies, une insuffisance rénale et des neuropathies périphériques. Le cryofibrinogène est impliqué dans des phénomènes thrombotiques liés au froid (*purpura*, *livedo*, ulcération, nécrose).

Les demandes doivent être initiées dans un contexte clinique évocateur, cependant les cryoglobulines sont parfois présentes chez des sujets asymptomatiques. La concentration des cryoglobulines n'est par ailleurs pas toujours proportionnelle à la sévérité des signes cliniques. La quantification des cryoglobulines est importante pour le suivi et les décisions thérapeutiques chez les patients symptomatiques. Les cryoglobulines sont classées en trois types. Les cryoglobulines de type I sont constituées par une immunoglobuline monoclonale, de type IgM ou IgG, plus rarement IgA. Les cryoglobulines de type II associent des immunoglobulines polyclonales à une immunoglobuline monoclonale (sous-type IIa), ou à des immunoglobulines oligoclonales (sous-type IIb). Les cryoglobulines de type III sont constituées d'immunoglobulines polyclonales. Les plus fréquentes, cryoglobulines de type II et III, dites mixtes, contiennent des anticorps monoclonaux ou polyclonaux de spécificité anti-IgG et correspondent en pratique à la présence de complexes immuns. Elles sont observées dans des

atteintes infectieuses, dont l'hépatite C, où elles sont responsables des cryoglobulinémies dites essentielles et dans des maladies auto-immunes dont le lupus érythémateux systémique. Dans cette dernière pathologie, il y a fréquemment un parallèle entre concentration, expression clinique et consommation du complément. Le suivi des cryoglobulines de type I est une façon très satisfaisante d'évaluer l'évolution d'une immunoglobuline monoclonale.

La recherche des cryoglobulines exige des conditions pré-analytiques très strictes, prélèvement, transport et coagulation à 37 °C. Le sérum est décanté et conservé 7 jours à + 4 °C. La détection d'une cryoglobuline peut être réalisée par observation visuelle d'un cryoprécipité dans le sérum. Un aliquote de sérum permet de tester la redissolution de ce précipité à 37 °C. Le cryoprécipité est ensuite isolé et lavé à froid puis remis à 37 °C pour quantification et typage. La quantification historique est la mesure du cryocrité (volume du cryoprécipité dans le sérum après centrifugation) et manque de sensibilité. Il est préférable de doser dans le cryoprécipité redissous à 37 °C les protéines, les immunoglobulines totales ou encore l'isotype préalablement identifié par immunofixation (fig. 9.4).

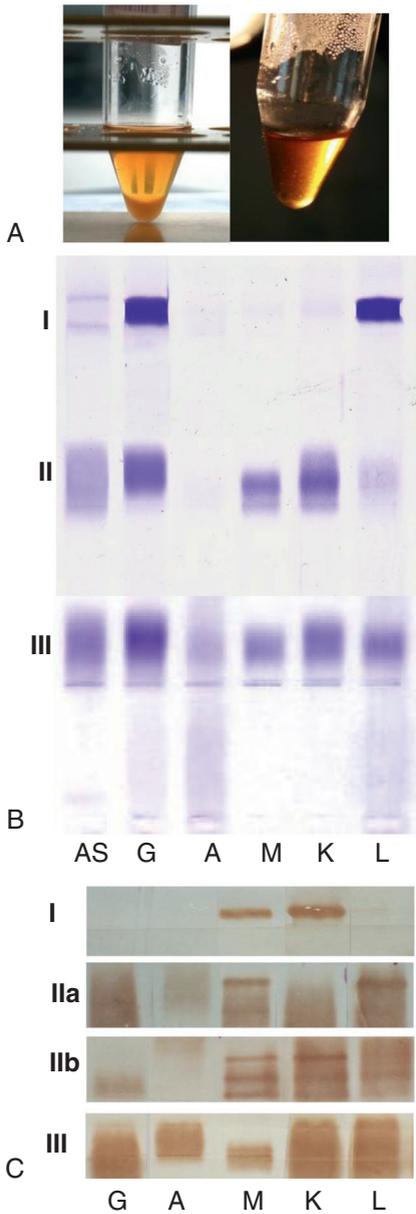
### Gammopathies monoclonales à activité auto-anticorps

Le plus souvent, la cible antigénique des gammopathies monoclonales est inconnue. Ces anticorps peuvent aussi bien reconnaître des exo-antigènes que des endo-antigènes (allogéniques ou auto-logues). Plusieurs types d'activités auto-anticorps sont fréquemment rapportés pour des immunoglobulines monoclonales. Lorsqu'elles sont dirigées contre des antigènes érythrocytaires, elles sont responsables de maladie des agglutinines froides. Elles reconnaissent le fragment Fc des IgG dans les cryoglobulines mixtes de type II. Des neuropathies périphériques sont associées à la présence d'immunoglobulines monoclonales dirigées contre une protéine associée à la myéline (MAG), contre des gangliosides ou contre des sulfatides. Dans la majorité des cas, ces immunoglobulines monoclonales sont des IgM, fréquemment associées à la maladie de Waldenström.

Lors de la recherche des auto-anticorps par immunofluorescence indirecte avec un antisérum dirigé contre les chaînes lourdes G, A et M, un titre élevé, conséquence de l'importance du pic, mais surtout l'aspect restreint de la fluorescence, conséquence de sa nature monoclonale, doit faire suspecter l'existence d'une gammopathie monoclonale à activité auto-anticorps. La confrontation des résultats d'immunofluorescence avec ceux de l'immunoelectrophorèse/immunofixation identifie trois situations possibles qui s'expliquent par le seuil de sensibilité de l'immunofluorescence, inférieur d'un facteur cent à celui de l'immunoprécipitation en milieu gélifié. Un auto-anticorps monoclonal donne une cohérence d'isotype en immunofluorescence et en immunoelectrophorèse/immunofixation. Un auto-anticorps monotypique isolé est seulement détectable en immunofluorescence. Enfin, un auto-anticorps monotypique associé à une gammopathie monoclonale d'isotype différent en immunoelectrophorèse/immunofixation caractérise l'existence de deux clones plasmocytaires. Ces auto-anticorps monotypiques ou monoclonaux sont relativement fréquents, ce qui souligne l'intérêt de l'immunofluorescence indirecte comme technique de première intention pour le dépistage des auto-anticorps, à condition d'utiliser comme conjugué un antisérum polyvalent capable d'identifier les trois classes majeures d'immunoglobulines. Ceci permet de dépister plus précocement des MGUS.

### Recherche d'anticorps spécifiques

La détection d'anticorps spécifiques d'un antigène particulier dans un but diagnostique peut utiliser de nombreuses méthodes immunologiques. La technique ELISA indirecte est la plus couramment employée. Les champs d'application les plus larges sont représentés par l'auto-immunité et les sérologies anti-infectieuses. Ces dosages sont d'abord à visée qualitative pour identifier une spécificité. Ils peuvent être rendus quantitatifs, par titration ou par comparaison à une gamme d'étalement. À noter qu'en pathologie infectieuse, le diagnostic peut également comporter l'identification de l'antigène chez le malade, qui peut égale-



**Fig. 9.4** Étude des cryoglobulines.

A. Cryoprécipités.

B. Typage par immunofixation de cryoprécipités redissous à 37 °C :  
I : cryoglobuline de type I composée d'une immunoglobuline G,  $\lambda$  monoclonale;

II : cryoglobuline de type II associant une immunoglobuline M,  $\kappa$  monoclonale et des immunoglobulines G polyclonales;  
III : cryoglobuline de type III composée d'immunoglobuline G et d'immunoglobuline M polyclonales.

C. Typage par western-blot de cryoprécipités redissous à 37 °C :  
I : cryoglobuline de type I composée d'une immunoglobuline M,  $\kappa$  monoclonale;

IIa : cryoglobuline de type II associant une immunoglobuline M,  $\lambda$  monoclonale et des immunoglobulines G polyclonales;  
IIb : cryoglobuline de type II associant des bandes oligoclonales immunoglobulines M,  $\kappa$  et immunoglobulines M,  $\lambda$  et des immunoglobulines G polyclonales;

III : cryoglobuline de type III composée d'immunoglobulines G, immunoglobulines A et immunoglobulines M polyclonales.

AS : antisérum total; G : anticorps anti- $\gamma$ ; A : anticorps anti- $\alpha$ ; M : anticorps anti- $\mu$ ; K : anticorps anti- $\kappa$ ; L : anticorps anti- $\lambda$ .

ment faire appel à des méthodes immunologiques. L'ELISA est la méthode de référence du dépistage de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), exemple développé ici, mais elle s'inscrit dans une stratégie diagnostique faisant intervenir d'autres tests.

Le sérodiagnostic de l'infection à VIH est fondé sur un dépistage des anticorps anti-VIH produits par l'individu infecté. Il ne détecte donc pas le virus

lui-même, mais la réaction immunitaire qu'il a induite. Ainsi, il existe une fenêtre sérologique d'environ 3 semaines correspondant à la période comprise entre le début de l'infection par le VIH et l'apparition d'anticorps spécifiques détectables (séroconversion). De nombreuses variantes de tests ELISA sont utilisées dans le dépistage de l'infection VIH, comme les tests de capture et les tests compétitifs qui possèdent une meilleure sensibilité. La

méthode la plus courante est un ELISA de capture des anticorps du patient, fixés sur des antigènes des virus VIH-1 et VIH-2 fixés au fond de plaques de microtitration, et révélés par une anti-globuline conjuguée à une enzyme. L'intensité de la coloration développée est mesurée par spectrophotométrie. La densité optique des échantillons testés est proportionnelle à la quantité d'anticorps anti-VIH recherchée et permet d'objectiver la séronégativité ou la séropositivité du patient. La positivité est évaluée relativement à une valeur seuil de densité optique correspondant généralement à la moyenne de valeurs obtenues avec des sérums de sujets sains, plus deux déviations standard. Pour un dosage quantitatif, une courbe d'étalonnage est établie à partir de dilutions d'un sérum standard. Le résultat est exprimé en unités internationales (UI).

Des tests rapides à orientation diagnostique (TROD) permettent d'obtenir un résultat en quelques minutes (inférieur à 1 h). Ils sont généralement basés sur des principes d'immunochromatographie ou d'immunofiltration sur membrane. La sensibilité de ces tests reste cependant inférieure à celle des tests ELISA notamment lors d'une primo-infection. Ils sont réservés aux situations d'urgence et le résultat, négatif ou positif, doit être confirmé sur un échantillon indépendant obtenu lors d'un prélèvement ultérieur.

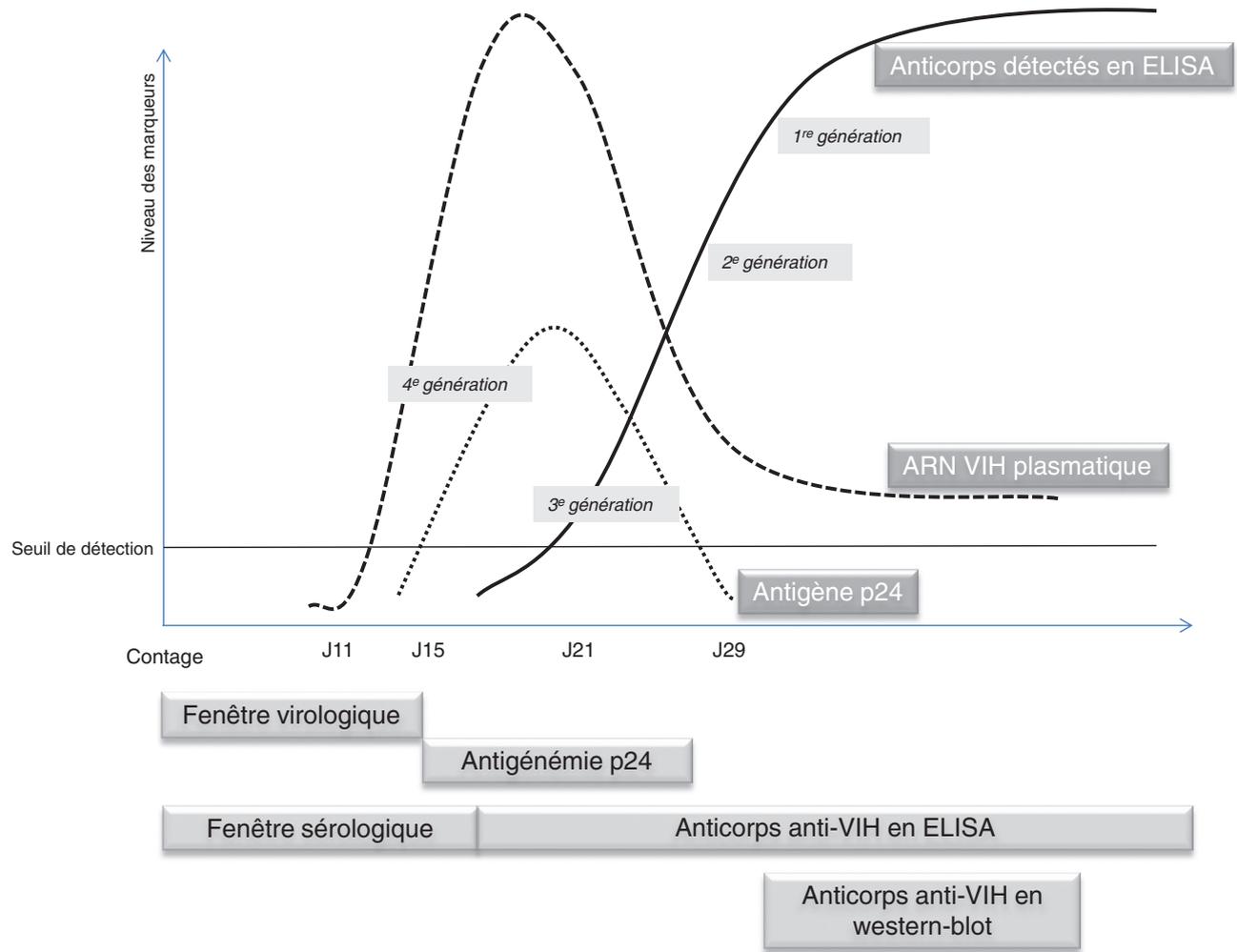
Le dépistage a évolué avec les générations successives des tests ELISA commerciaux. Les tests de 1<sup>re</sup> et de 2<sup>e</sup> génération ne détectent que des anticorps de classe IgG, alors que les tests de 3<sup>e</sup> et de 4<sup>e</sup> génération détectent à la fois des IgG et des IgM. Les antigènes viraux déposés dans les plaques sont issus du VIH-1 et également du VIH-2. La sensibilité de ces techniques est élevée, de l'ordre de 99,2 à 99,8 %.

Jusqu'en 2009, le dépistage de l'infection à VIH en France reposait sur l'utilisation de deux techniques mixtes détectant les anticorps anti-

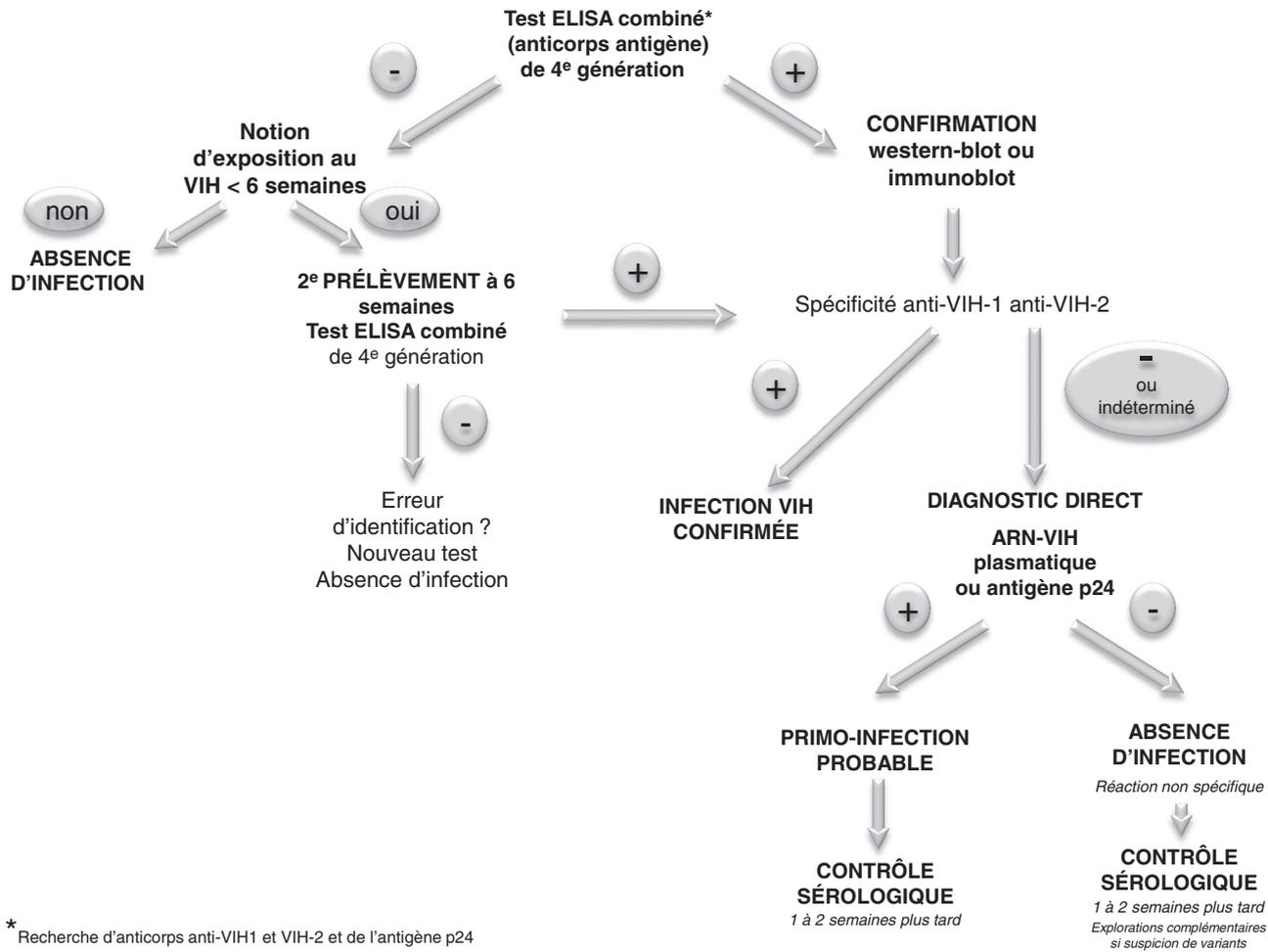
VIH-1 et anti-VIH-2, dont au moins une technique ELISA (arrêté du 28 avril 2003). Depuis 2010 (arrêté du 28 mai 2010), la législation française impose le recours aux tests ELISA combinés détectant les IgG et IgM anti-VIH-1 et anti-VIH-2, ainsi que l'antigène p24 du VIH-1 présent dans le sérum de l'individu testé. Ces tests combinés (anticorps et antigène) réduisent la fenêtre sérologique et permettent de déceler une infection dès le 15<sup>e</sup> jour post-contage (fig. 9.5).

En cas de dépistage négatif, un deuxième test ELISA est réalisé 6 semaines après l'exposition au virus afin d'attester de l'absence de contamination. De même, afin d'éliminer tout risque de résultat faussement positif lié à des interférences possibles avec les facteurs rhumatoïdes ou certains auto-anticorps, tout résultat positif ou indéterminé nécessite une confirmation par une autre technique, western-blot ou un immunoblot. Le western-blot utilise des protéines virales natives purifiées, séparées par électrophorèse puis transférées sur membrane de nitrocellulose, alors que l'immunoblot est composé de protéines recombinantes spécifiques de VIH-1 et VIH-2 et/ou de peptides synthétiques déposés en ligne sur une bandelette. Un test est déclaré positif pour le VIH-1 s'il détecte des anticorps contre au moins deux des trois glycoprotéines virales du VIH-1 (gp160, gp120 ou gp41). La sensibilité de ces deux techniques est comparable mais bien inférieure à celle des tests ELISA. Une discordance entre les résultats obtenus par ELISA et par ces tests peut donc exister lorsque la séroconversion est trop récente. Ces tests permettent néanmoins de valider la positivité du résultat obtenu en ELISA et également de préciser la spécificité des anticorps présents dans l'échantillon.

Des logigrammes illustrent la stratégie du diagnostic biologique et les recommandations émises par la Haute Autorité de santé (fig. 9.6).



**Fig. 9.5** Cinétique des marqueurs de l'infection à VIH et place des différents tests de sérodiagnostic.



**Fig. 9.6** Algorithme de la conduite à tenir en cas de suspicion d'infection à VIH.

# Chapitre 10

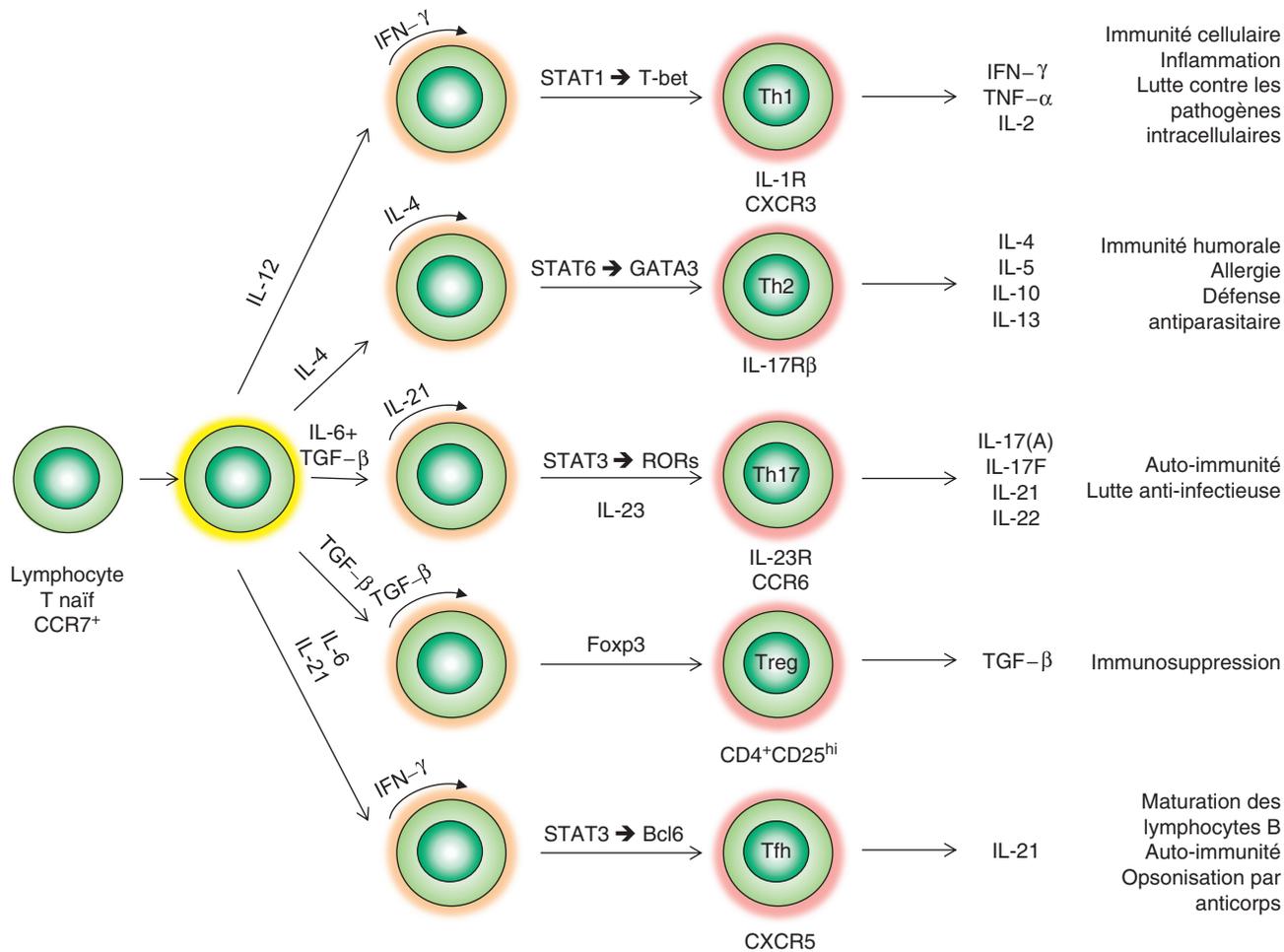
## Détection/dosage des cytokines et de leurs récepteurs

Les cytokines sont impliquées dans la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Il est nécessaire de bien connaître leur physiologie avant d'entreprendre leur exploration. Ce sont des protéines ou des glycoprotéines essentiellement sécrétées, mais parfois membranaires, de faible masse moléculaire. Elles peuvent être monomériques, homodimériques (*e.g.* IL-5, IL-8, IL-10), hétérodimériques (*e.g.* IL-12), voire trimériques (*e.g.* TNF- $\alpha$ ). Elles peuvent présenter des degrés divers de glycosylation conduisant parfois à une grande hétérogénéité moléculaire (*e.g.* IL-6 qui varie de 19 à 26 kDa). La phase d'expression membranaire de certaines d'entre elles (*e.g.* IL-1, TNF- $\alpha$ ) leur permet d'agir par contact direct intercellulaire. Les cytokines sont parfois produites sous forme de précurseurs (*e.g.* IL-1, IL-18) qui ne deviennent actifs biologiquement qu'après action d'une enzyme (*e.g.* caspase 1). D'autres (*e.g.* TGF- $\beta$ ) subissent des étapes de maturation extracellulaire, au cours desquelles leur fixation à des molécules de la matrice extracellulaire module leur état fonctionnel ou leur catabolisme. Enfin, les cytokines sont susceptibles d'être dégradées par des protéases, en particulier lors des processus inflammatoires.

Les cytokines sont capables de stimuler ou d'inhiber la prolifération ou la survie cellulaire, d'orienter la différenciation cellulaire, plus spécialement celle des lymphocytes T (fig. 10.1), ou d'activer les fonctions ou les capacités migratoires

de cellules cibles. Leur périmètre d'action est très variable. La majorité d'entre elles agissent dans le micro-environnement où elles sont produites, selon un mode dit paracrine (environnement direct) ou juxtacrine (cellule adjacente à la cellule productrice). L'action d'une cytokine sur la cellule qui la produit constitue l'autocrinie qui peut même aller jusqu'à l'intracrine, en l'absence de sécrétion de la cytokine et en cas de fixation immédiate à son récepteur. À l'opposé, certaines cytokines ont des effets de type endocrine, c'est-à-dire qu'elles agissent à distance de leur lieu de production. Les concentrations circulantes de cytokines sont dans la majorité des cas extrêmement faibles (< 5 pg/mL) et leur dosage dans le sang périphérique est peu informatif sur les productions locales.

La production des cytokines est en règle générale dépendante de l'activation cellulaire, soit directement en réponse à un facteur déclenchant (*e.g.* activation par le récepteur d'antigène ou un ligand de *Toll-like receptor* ou TLR), soit secondairement en réponse à une autre cytokine. Les interactions entre cytokines modulent ces réponses *via* des effets synergiques ou, au contraire, antagonistes. Les cytokines pro-inflammatoires (*e.g.* IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, chimiokines) se distinguent des cytokines immunorégulatrices parmi lesquelles on retrouve les interleukines, les interférons, le TGF- $\beta$  et les cytokines de l'hématopoïèse ou facteurs de croissance (*e.g.* GM-CSF, IL-3, M-CSF). Les



**Fig. 10.1** Cytokines et lymphocytes T.

cytokines ont, en fait, de multiples cibles et, par conséquent, des effets pléiotropes. Les propriétés biologiques sont, par ailleurs, souvent partagées par plusieurs cytokines et cette redondance limite les risques de défaillance. Enfin, certaines cytokines présentent des homologues se comportant comme des antagonistes spécifiques (*e.g.* IL-1ra, IL-36ra) qui entrent en compétition avec la cytokine correspondante en se liant au même récepteur, mais sans transduire de signal d'activation. Les chimiokines sont impliquées dans les phénomènes d'adressage pour le recrutement cellulaire lors de processus inflammatoires. Elles peuvent aussi intervenir dans la différenciation cellulaire.

L'action des cytokines sur leurs cellules cibles se fait par fixation à des récepteurs constitués de deux ou trois sous-unités. Dans ces complexes multimériques, la chaîne  $\alpha$  assure la spécificité de la fixation, tandis que la chaîne  $\beta$  est responsable de la transmission du signal. Cette dernière est souvent partagée par plusieurs cytokines (*e.g.* gp130 pour les cytokines de la famille de l'IL-6). Pour la famille des récepteurs de l'IL-2, une chaîne  $\gamma$  assure la signalisation. La fixation de la cytokine permet l'assemblage des sous-unités et l'organisation optimale des domaines participant à la transduction du signal. Les chimiokines se fixent sur des récepteurs particuliers, couplés aux protéines G et possédant sept domaines transmembranaires, capables de reconnaître plusieurs chimiokines.

Des récepteurs solubles des cytokines sont générés par l'action de protéases libérant la partie extramembranaire des récepteurs cellulaires ou par épissage alternatif et sécrétion directe. Ces récepteurs solubles conservent la capacité de fixer leur ligand et possèdent ainsi une action inhibitrice sur l'activité biologique des cytokines (*e.g.* IL-1, TNF- $\alpha$ ). Certains récepteurs solubles restent, à l'inverse, capables de déclencher un signal d'activation avec des cytokines membranaires (*e.g.* IL-6). Des protéines de liaison différentes des récepteurs peuvent également se fixer spécifiquement à certaines cytokines et les neutraliser (*e.g.* IL-18). Enfin, il faut tenir compte de multiples homologues tant des cytokines que de leurs récepteurs, exprimés par certains virus, qui concourent à leur patho-

généicité et à leur échappement à la réponse immune (*e.g.* IL-10, TNF- $\alpha$ ).

## Méthodologie

### Dosages de cytokines ou de leurs récepteurs solubles

Les conditions de prélèvement et de conservation des échantillons biologiques sont très importantes pour le dosage des cytokines et doivent prendre en compte ce qui peut se passer après le prélèvement. Ainsi, une surestimation de la concentration *in vivo* peut résulter d'une production cellulaire liée à la présence d'endotoxines ou du relargage de cytokines intracytoplasmiques. À l'inverse, la liaison de cytokines à leurs récepteurs membranaires ou leur dégradation sous l'action de protéases ou de la température peuvent conduire à une sous-estimation.

Le prélèvement de sang sur tube EDTA stérile permet d'éviter la production potentielle de cytokines par les cellules sanguines grâce au pouvoir chélateur de l'EDTA. L'héparine, souvent contaminée par des endotoxines, est à éviter. Des inhibiteurs de protéases (trasylo) ou de l'agrégation plaquettaire (indométacine) peuvent être ajoutés dans les tubes. Le plasma doit être décanté très rapidement pour éviter toute dégradation ou adsorption des cytokines. Pour les méthodes biologiques cellulaires<sup>9</sup>, le sérum est utilisé, mais il doit être recueilli dans des conditions assurant l'absence d'endotoxines. Il est préférable de congeler les échantillons à très basse température (-80 °C) et sous forme d'aliquotes pour éviter les cycles de congélation/décongélation si plusieurs cytokines sont dosées sur un même prélèvement. À noter que pour certaines cytokines (*e.g.* TGF- $\beta$ ), un prétraitement peut être nécessaire.

Les méthodes biologiques testant la fonction d'une cytokine vis-à-vis d'une lignée cellulaire ne gardent qu'une valeur historique (*e.g.* prolifération de thymocytes murins mesurant l'activité IL-1), notamment eu égard à la complexité des interactions et redondances des systèmes cytokiniques.

<sup>9</sup> Des ions divalents sont nécessaires pour ces méthodes et le pouvoir chélateur de l'EDTA peut interférer.

Les méthodes immunologiques ont, en revanche, toute leur valeur, car il est relativement aisé de produire des anticorps de grande spécificité dirigés contre des cytokines recombinantes, permettant de distinguer des cytokines ayant une même activité biologique (*e.g.* IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ). Les anticorps utilisés sont le plus souvent monoclonaux. Les méthodes commerciales les plus répandues pour le dosage des cytokines dans les milieux biologiques sont des ELISA sandwich. Les techniques multiplex utilisant la fluorescence ou la chimiluminescence, en *microarray* ou en cytométrie en flux, sont mieux adaptées aux dosages ponctuels et permettent la mesure simultanée de plusieurs cytokines afin d'obtenir un profil cytokinique (*e.g.* profil pro-inflammatoire, réponse Th1/Th2/Th17), parfois même avec un système automatisé. Ceci peut être particulièrement intéressant pour des dosages réalisés dans le surnageant de cultures cellulaires, reflétant bien les réponses induites par les conditions expérimentales.

La plupart des trousseaux commercialisés sont adaptés au dosage des cytokines dans le plasma ou le sérum et la méthodologie doit être validée, notamment par des tests de surcharge mesurant le rendement du dosage, lors de l'utilisation d'autres liquides biologiques. Pour le liquide synovial, qui peut présenter une forte viscosité, l'ajout de hyaluronidase est parfois nécessaire pour fluidifier l'échantillon. Enfin, du fait des faibles dilutions effectuées sur les échantillons à analyser, il faut être très vigilant sur les interférences classiques des immunodosages : hémolyse, anticorps hétérophiles, facteurs rhumatoïdes. Actuellement, apparaissent sur le marché des techniques (*e.g.* Erenna® ou Simoa®) qui améliorent la limite de détection de manière considérable (gain de deux à trois logs de concentration).

La standardisation des immunodosages de cytokines n'est pas encore acquise et il existe parfois de fortes discordances entre différentes trousseaux commerciales. Des préparations internationales de cytokines sont disponibles auprès du *National Institute for Biological Standards and Control*<sup>10</sup>. Une autre source de discordances entre les résul-

tats est liée aux différents modes d'expression pour une même cytokine (*e.g.* pg/mL, UI/mL, pM).

Une approche quantitative du nombre de molécules de récepteurs de cytokine exprimées par cellule peut être réalisée en utilisant des billes de calibration de fluorescence en cytométrie en flux, mais la méthode de référence reste celle de Scatchard qui utilise des anticorps radiomarqués accédant à la mesure des constantes d'affinité.

### Détection *in situ* ou au niveau cellulaire

Il est possible de mettre en évidence la présence de cytokines ou de leurs récepteurs dans les tissus par des techniques d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence directe ou amplifiée.

L'utilisation de coupes à la congélation pose peu de problèmes, mais pour les tissus fixés la fixation peut altérer les molécules à détecter et nécessite de sélectionner des réactifs capables de reconnaître ces épitopes modifiés. Ces méthodes permettent d'identifier qualitativement une concentration localisée au niveau de la cellule productrice. Les méthodes d'analyse d'image peuvent donner une idée semi-quantitative de l'intensité de la réponse cytokinique. L'utilisation de marquages, voire de microscopie confocale, permet une approche affinée.

La sécrétion des cytokines par les lymphocytes peut être mise en évidence après réactivation des cellules *in vitro*, de façon non spécifique (*e.g.* mitogène) ou spécifique (*e.g.* antigène). La détection intracellulaire en cytométrie en flux implique de bloquer le transport et la sécrétion de la cytokine d'intérêt (*e.g.* brefeldine A), puis de fixer et perméabiliser les cellules pour que l'anticorps ait accès au compartiment intracellulaire. Le développement des marquages multi-couleurs permet d'analyser simultanément de nombreux paramètres immunophénotypiques et/ou la production de plusieurs cytokines par la même cellule. Il est ainsi possible de mettre en évidence des lymphocytes spécifiques de type Th1, Th2 ou Th17, mais aussi de lymphocytes dits polyfonctionnels qui produisent plusieurs cytokines (*e.g.* IFN- $\gamma$ /IL-2 et TNF- $\alpha$ ). Ces derniers sont notamment associés à une meilleure protection dans diverses

<sup>10</sup> [www.nibsc.org](http://www.nibsc.org)

pathologies infectieuses (*e.g.* tuberculose, Sida, hépatites). La détection par ELISpot, particulièrement développée pour l'interféron  $\gamma$ , permet de quantifier la fréquence des cellules répondeuses et peut être plus sensible que la détection intracellulaire.

### Étude des ARNm

Alternativement à la détection des protéines, la production de cytokines peut être étudiée au niveau des ARNm, *in vitro* dans des cultures cellulaires ou *ex vivo* sur des biopsies, en prenant les précautions nécessaires pour assurer la stabilité des ARNm. Dans les tissus, la technique d'hybridation *in situ* par riboprobe détecte les cellules contenant des transcrits de cytokines à l'aide de traceurs enzymatiques ou fluorescents ou dans des suspensions cellulaires en cytométrie en flux. Une analyse plus large du transcriptome par RT-PCR après extraction des ARN peut donner une image plus globale. En tout état de cause, si l'analyse des ARNm permet une détection de différences rapidement induites par un stimulus, elle doit être pondérée par le fait que les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle peuvent ensuite modifier l'expression protéique.

### Étude de l'ADN, polymorphismes

Les gènes des cytokines et de leurs récepteurs sont concernés par des variations au niveau de l'ADN, qui peuvent être limitées à un nucléotide dans les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), ou s'associer à des modifications plus importantes (*e.g.* délétions, insertions, substitutions), voire des variations dans le nombre de copies des gènes (*Copy Number Variation* ou CNV).

### Recommandations de mise en œuvre

La demi-vie des cytokines est très courte (habituellement inférieure à une heure) et leur production pulsatile conduit à des pics fugaces dans la circulation impliquant la réalisation de prélèvements rapprochés et multiples pour suivre ces variations rapides. Ceci est surtout applicable à la recherche expérimentale.

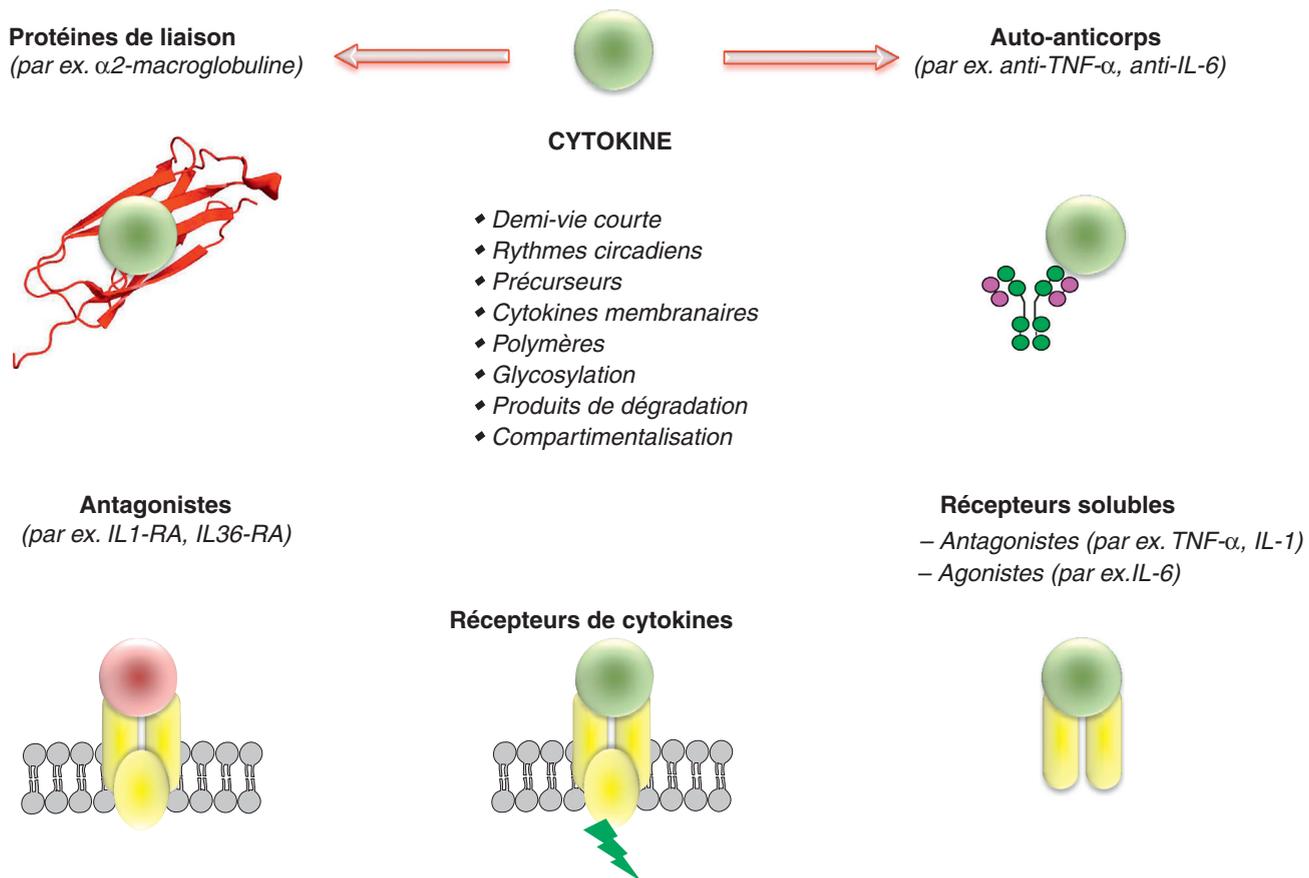
La variabilité de production des cytokines chez des sujets normaux peut être élevée. Pour un individu donné, l'effet principal est celui des rythmes circadiens liés aux variations des corticostéroïdes et de la mélatonine.

Les cytokines étant des substrats pour les protéases générées lors des processus inflammatoires, certains produits de dégradation sans activité biologique peuvent être détectés en immuno-analyse.

Leur action locale paracrine, voire autocrine, est un élément essentiel à considérer dans l'exploration des cytokines. Aussi, le résultat normal du dosage d'une cytokine circulante ne permet pas d'exclure un foyer d'inflammation ou de stimulation immune locale.

Les cytokines se lient fréquemment à des protéines plasmatiques (*e.g.* IL-6 et  $\alpha 2$ -macroglobuline), mais ces liaisons de faible affinité perturbent peu les dosages. À l'inverse, les récepteurs antagonistes interfèrent dans les effets fonctionnels et les dosages biologiques des cytokines. Des anticorps très spécifiques permettent, en revanche, de distinguer les cytokines de leurs homologues. La présence de récepteurs solubles représente une cause d'interférence dans les tests biologiques et certains immunodosages si l'anticorps utilisé reconnaît un épitope de la cytokine impliqué dans sa liaison à son récepteur. Il faut sélectionner des anticorps se fixant sur des sites indépendants des interactions cytokine/récepteur pour doser toutes les formes de la cytokine. De manière générale, l'influence de nombreux inhibiteurs disparaît après dilution d'un échantillon biologique fournissant des résultats paradoxaux (*e.g.* effet matrice). Les principaux facteurs pouvant influencer le dosage des cytokines sont résumés dans la [figure 10.2](#).

Des auto-anticorps dirigés contre des cytokines (*e.g.* contre le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1) apparaissent avec l'âge. Leur affinité peut atteindre des valeurs comparables à celles des anticorps utilisés dans les immunodosages (*e.g.*  $10^{-11}$  M). Ces auto-anticorps peuvent constituer un élément diagnostique (*e.g.* anti-IFN- $\gamma$  dans des syndromes d'immunodéficience acquise non virale) ou expliquant la physiopathologie (*e.g.* anti-IL-17 ou IL-22 et candidoses cutanéomuqueuses dans les polyendocrinopathies auto-immunes).



**Fig. 10.2** Éléments de la physiologie des cytokines et de leurs récepteurs à prendre en compte pour la réalisation de leurs dosages.

## Avantages/inconvénients

	Avantages	Inconvénients
<b>Cytokines ou récepteurs solubles</b>		
Dosage par ELISA	Méthode quantitative Grandes séries possibles	Une cytokine à la fois Mesure globale Attention aux formes dégradées et aux effets de matrice
Dosage multiplex	Dosages ponctuels, petites séries ou grandes séries Mesure simultanée de plusieurs cytokines : profils cytokiniques sur de faibles quantités d'échantillon Automatisation possible	Dosage global Tests de surcharge nécessaires pour certains fluides biologiques Attention à l'effet matrice et aux interférences Difficulté de standardisation
<b>Cytokines ou récepteurs cellulaires</b>		
Immunohistochimie	Identification des cellules productrices dans les tissus Production individuelle	Épitopes altérés par la fixation Appréciation qualitative ou semi-quantitative
Cytométrie intracytoplasmique	Identification concomitante de l'immunophénotype des cellules productrices Caractérisation de signatures fonctionnelles Grande sensibilité Réponses spécifiques en fonction de la stimulation Mesure quantitative	Culture cellulaire et stimulation en présence de molécules bloquant la sécrétion Interprétation des résultats en clinique parfois difficile (stimulation à la PHA, par exemple)
ELISpot	Grande sensibilité Réponses spécifiques en fonction de la stimulation Mesure quantitative	Culture cellulaire en système approprié
<b>Acides nucléiques</b>		
ARN, riboprobes <i>in situ</i> ou intracytoplasmiques	Détection plus rapide de l'activation Analyse large du transcriptome Identification concomitante de l'immunophénotype des cellules productrices	Protection des ARN Pas forcément de correspondance protéique
ADN	Détection des polymorphismes	Pas de relation systématique avec les capacités de réponse

## Exemples d'applications

- En recherche : l'exploration des cytokines et de leurs récepteurs revêt une importance majeure dans l'étude de très nombreux modèles expérimentaux, qu'il s'agisse de lignées cellulaires, de réponses immunitaires humaines *ex vivo* ou de modèles animaux. Comme indiqué dans ce chapitre, l'étude de ces protéines et de leur régulation fait appel à de nombreuses méthodes immunologiques.
- En clinique :
  - en pratique clinique, la recherche d'une infection tuberculeuse latente est une recommandation de la Haute Autorité de Santé chez les

patients chez qui est prescrite une biothérapie anti-TNF. Elle est recherchée par les tests IGRA<sup>11</sup>. De nombreuses approches de biothérapies ciblant les cytokines dans le but de neutraliser leurs effets pathologiques se développent utilisant des anticorps monoclonaux ou protéines de fusion inhibitrices ou des analogues antagonistes. Pour leur mise en œuvre ou leur suivi, aucun dosage n'est nécessaire. Quant à l'étude des polymorphismes (voir chapitre 5), celui de l'IL-28B a son indication

<sup>11</sup> IGRA (*interferon gamma release assay*) par ELISpot (T-Spot TB®) ou dosage ELISA (Quantiféron®).

- actuellement dans la mise en œuvre d'une bithérapie interféron-ribavirine dans le traitement de l'hépatite C;
- en recherche clinique, un orage cytokinique est caractéristique du choc septique, générant une immunosuppression secondaire potentiellement mortelle. L'exploration de l'inflammasome peut contribuer à une meilleure compréhension de maladies auto-inflamma-

toires liées à des mutations de récepteurs de cytokines (*e.g.* *TNFRSF1A*) ou à des déficits (IL-1ra ou IL-36ra), ainsi que de pathologies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou le lupus érythémateux. Cependant, ces explorations restent encore du domaine de la recherche et n'ont pas encore de retombées thérapeutiques.

# Chapitre 11

## Exploration du complexe majeur d'histocompatibilité

Le premier produit du complexe immunogénétique *HLA* (*Human Leucocyte Antigens*), *HLA-A2*, a été individualisé en 1958 par Jean Dausset qui a reçu le prix Nobel en 1980 pour cette découverte. En raison de l'importance de ce complexe dans la greffe d'organe, le système HLA a été initialement perçu comme le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de l'homme. Il s'agit d'un système multigénique, multi-allélique et d'expression codominante. En dehors du contexte de la greffe d'organes ou de tissus entre individus différents, la fonction majeure des produits du CMH, découverte partagée entre deux autres lauréats Nobel, Ralf Zinkernagel et Peter Doherty (1986), est de permettre des interactions cellulaires, en tout premier lieu la reconnaissance des antigènes par les lymphocytes T. En effet, ces cellules reconnaissent, de manière spécifique par leur récepteur T (TCR), l'association d'un peptide et de la molécule CMH qui le présente. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ne reconnaissent que des peptides, en majorité exogènes, présentés par des molécules CMH de classe II exprimées de façon constitutive sur les cellules présentatrices d'antigènes (*e.g.* cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes B). Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ne reconnaissent que les peptides, majoritairement d'origine endogène, présentés par les molécules CMH de classe I

exprimées sur toutes les cellules nucléées de l'organisme. Ces peptides provenant de la dégradation de molécules du soi dans les conditions physiologiques correspondent à des peptides viraux ou tumoraux en pathologie.

Ce système de reconnaissance des vertébrés supérieurs a été progressivement identifié. Chez la souris, le CMH est le système H-2. Les molécules de classe I sont codées par les gènes *H-2K*, *H-2D* et *H-2L* (*e.g.* H2<sup>k</sup>, H2<sup>d</sup>) et les molécules de classe II par les gènes I-E et I-A. Il existe également un CMH chez le chien (DL-A) ou le cheval (EL-A), par exemple. La compatibilité ou l'incompatibilité du CMH doit être prise en compte dans les expérimentations impliquant des animaux de fonds génétiques différents.

Les produits du CMH sont des glycoprotéines membranaires qui peuvent donc être identifiées à la surface des cellules. Elles présentent des épitopes spécifiques reconnaissables par des anticorps qui permettent de les typer de manière générique. Du fait de leur extrême variabilité au sein d'une même espèce, et en particulier chez l'homme, la caractérisation des allèles codant pour ces molécules ne peut être réalisée que par biologie moléculaire.

En raison de leur implication majeure dans la tolérance ou le rejet de greffe, les molécules *HLA* de l'homme sont principalement caractérisées dans le domaine de la transplantation d'organes.

## Typage du HLA en sérologie

Le typage d'un locus en sérologie repose sur la reconnaissance des molécules *HLA* membranaires par des anticorps anti-*HLA* spécifiques de familles d'allèles en présence de complément. La fixation des anticorps sur leur cible entraîne une activation du complément et la lyse de la cellule exprimant le CMH reconnu. Cette réaction, qui utilise du complément de lapin, est mise à profit dans la microlymphocytotoxicité utilisée pour les typages *HLA* de l'homme. Les panels d'anticorps utilisés sont soit des anticorps polyclonaux provenant de femmes multipares ou de sujets polytransfusés, soit des anticorps monoclonaux activateurs du complément. Les cellules testées, issues de l'individu dont on cherche à connaître le typage *HLA* de classe I, sont des lymphocytes totaux isolés sur gradient de Ficoll®, le plus souvent à partir d'un prélèvement sanguin. Cette technique est moins utilisée pour les molécules de classe II, car elle requiert des lymphocytes B purifiés.

Pour typer les cellules issues d'animaux, des anticorps monoclonaux spécifiques permettent de reconnaître des motifs spécifiques des motifs spécifiques d'allèles (*e.g.* H-2<sup>d</sup> ou H-2<sup>b</sup> chez la souris), le plus souvent par cytométrie en flux. Toutefois, les lignées syngéniques ne nécessitent pas de vérifier le CMH des animaux.

## Typage du HLA par biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire identifiant le génotype CMH utilisent actuellement la PCR-SSO (*PCR using Sequence Specific Oligonucleotides*), la PCR-SSP (*PCR using Sequence Specific Primers*) ou le séquençage. Les méthodes basées sur les fragments de restriction enzymatique de l'ADN (*Restriction Fragment Length Polymorphism* ou RFLP) sont de moins en moins utilisées. La PCR-SSO est automatisée pour le typage HLA dans le système multiplex Luminex®. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'amplicons biotinylés

y sont fixées à la surface de microsphères dont la fluorescence intrinsèque est spécifique de la sonde oligonucléotidique qu'elles portent. Après fixation des amplicons, la fluorescence de chaque bille du mélange est mesurée et l'analyse du profil de l'ensemble des billes permet de déterminer l'haplotype HLA d'un individu. La PCR-SSP utilise des amorces spécifiques d'allèle ou d'un groupe d'allèles en fonction du degré de résolution de l'amorce (typage générique). Le séquençage nucléotidique des exons 2 et 3 des gènes de classe I (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*) et de l'exon 2 des gènes de classe II (*HLA-DRB1*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQB1*) permet un typage de haute résolution. Lorsqu'il porte sur la totalité des exons et des introns, ce séquençage parvient à un véritable typage allélique.

### Avantages/inconvénients

	Avantages	Inconvénients
<b>Typage sérologique</b>	Atteste de l'expression membranaire des molécules du CMH et lève ainsi certaines ambiguïtés portant sur des allèles nuls.	Typage générique Allèles rares pour lesquels il n'existe pas d'anticorps spécifiques Le typage <i>HLA</i> sérologique peut être difficile voire impossible en cas de lymphopénie sévère Réaction croisée des anticorps vis-à-vis de certains allèles
<b>Typage en biologie moléculaire</b>	<i>Screening</i> haut débit Spécificité du typage allélique Typage de haute résolution indispensable dans les allogreffes de cellules souches hématopoïétiques avec donneurs non apparentés Typage <i>HLA-DP</i>	Résultat dépendant de la qualité et de la quantité de l'ADN extrait Réaction de séquençage sujette aux contaminations

### Exemples d'applications

- En recherche : il est important de connaître le CMH des animaux d'expérimentation ou de lignées cellulaires lorsque les fonctions de ces

molécules peuvent être impliquées dans le modèle mis en place.

- En clinique, les indications principales du typage *HLA* sont les suivantes :
  - les transplantations d'organes pour lesquelles un typage générique des loci *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DR* et *HLA-DQ* suffit dans la majorité des cas;
  - les greffes de cellules souches hématopoïétiques où en dehors de greffes familiales, où les quatre haplotypes parentaux ont pu être établis, un typage exhaustif et de haute résolution des gènes *HLA* de classe I et de classe II est requis pour s'assurer du maximum de compatibilité *HLA* entre le donneur et le receveur (idéalement 10/10; *i.e.* *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DR*, *HLA-DQ* sur les deux allèles en raison de la codominance qui fait que tous les gènes sont exprimés).
  - certaines pathologies dans lesquelles une liaison ou une association *HLA*–maladie est décrite. Dans ce cas, le typage *HLA* est ciblé sur le locus *HLA* incriminé.

## Épreuves de compatibilité tissulaire

La décision de transplantation met en œuvre des examens d'urgence visant à garantir la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur. La préexistence chez le receveur d'anticorps anti-*HLA* spécifiques des molécules *HLA* du donneur entraîne un risque de rejet hyperaigu (cytotoxicité dépendant du complément). Ces anticorps peuvent résulter d'une grossesse, d'une transfusion sanguine ou d'une première transplantation avec un donneur non *HLA* identique.

Le *cross-match* lymphocytaire est une épreuve de compatibilité ultime. Toute transplantation devient contre-indiquée lorsque n'importe lequel des sérums historiques du receveur produit une réaction positive en présence des lymphocytes ganglionnaires ou spléniques du donneur potentiel. Le *cross-match* en cytométrie en flux (CMF) est plus sensible et très fortement recommandé en prégreffe rénale avec donneur vivant.

## Étude du chimérisme donneur–receveur après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'analyse du chimérisme chez les patients allo-greffés consiste à quantifier la part relative des cellules du donneur et du receveur au sein des populations cellulaires du sang périphérique ou de la moelle osseuse. Le chimérisme est qualifié de : total quand seules les cellules du donneur sont détectées chez le receveur; partiel ou mixte quand des cellules du donneur et du receveur sont présentes de façon concomitante au sein de l'échantillon étudié; absent en cas d'absence totale de cellules du donneur.

Le principe d'analyse du chimérisme hématopoïétique consiste à utiliser des marqueurs génétiques informatifs propres au donneur et au receveur. L'étude du chimérisme est réalisée dans les premiers mois post-greffe pour rechercher la prise du greffon ou le rejet de greffe, puis de façon plus espacée pour détecter la rechute et évaluer la maladie résiduelle en l'absence de marqueurs hématologiques classiques.

L'analyse est fondée sur les marqueurs génétiques du polymorphisme humain de type microsatellites ou STR (courtes séquences répétées, *Short Tandem Repeats*) ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). La première étape est la caractérisation des marqueurs génétiques spécifiques du donneur et du receveur les plus informatifs. L'examen du chimérisme lui-même quantifie les marqueurs donneurs-spécifiques sélectionnés par amplification quantitative qPCR.

## Tétramères CMH–peptides

La reconnaissance des antigènes peptidiques par les lymphocytes T repose sur leur présentation restreinte par des molécules du CMH. Le développement de molécules CMH recombinantes chargées en peptides, constituant des ligands spécifiques de TCR, permet d'identifier la fréquence de lymphocytes T spécifiques de l'antigène peptidique au sein d'une population lymphocytaire

hétérogène. Cette technologie a essentiellement été développée chez l'homme. En pratique, des molécules CMH de classe I recombinantes, correspondant aux allèles les plus fréquemment exprimés, sont biotinyllées et chargées du peptide cible. Ce complexe est marqué par de la streptavidine conjuguée à un fluorochrome. La fixation

des tétramères streptavidine-CMH-peptide aux lymphocytes T spécifiques du peptide antigène est mesurée par la fluorescence cellulaire en cytométrie en flux. Le système se développe aussi pour des peptides restreints par les produits de classe II. Il est applicable à des expérimentations animales.

# Chapitre 12

## Hypermutations somatiques et translocations chromosomiques

La différenciation et la maturation lymphocytaire B se produisant dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires sont des processus qui nécessitent plusieurs cycles de prolifération, ainsi que des modifications portant essentiellement sur les gènes codant pour les immunoglobulines. Des cycles de coupure/ligation de l'ADN permettent ainsi de générer la diversité de spécificité du domaine variable de la chaîne lourde (réarrangements VDJ) et de la chaîne légère (réarrangements VJ). Le même mécanisme permet de remplacer les domaines constants de la chaîne lourde traduite en même temps que ce domaine variable (commutation de classe), modifiant ainsi la fonctionnalité des immunoglobulines produites. Par ailleurs, les gènes codant pour le domaine variable des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines subissent des hypermutations somatiques qui modulent l'affinité pour le déterminant antigénique. Ces remodelages géniques et les cycles de prolifération nécessaires à la mise en place du répertoire B et à une réponse humorale optimale sont des étapes extrêmement sensibles associées à un risque potentiel d'erreurs pouvant mener à un processus lymphomateux. Les remaniements chromosomiques induits par les translocations peuvent avoir le même effet. L'exploration des proliférations B peut ainsi développer un typage à l'aide de techniques de biologie moléculaire.

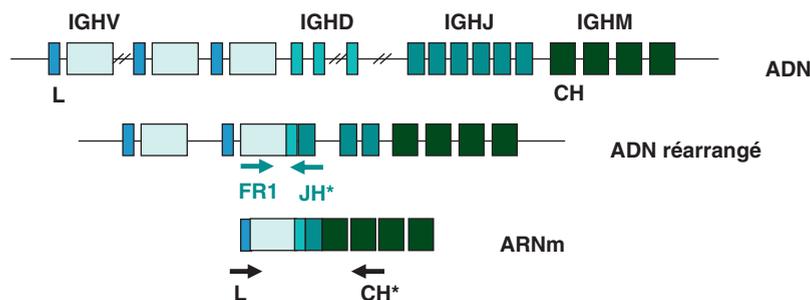
### Hypermutations somatiques

L'analyse du statut mutationnel est surtout réalisée pour les gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines, *IGHV*, dont en principe un seul est transcrit dans un lymphocyte. L'analyse examine quel segment du répertoire VH a été utilisé par chaque cellule. Si une prolifération clonale existe, un signal similaire sera obtenu pour toutes les cellules du clone.

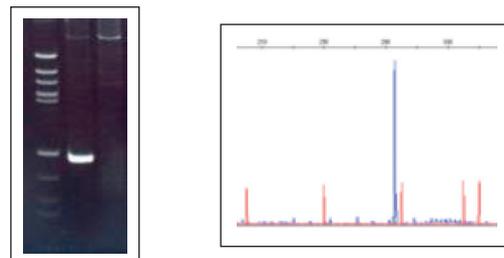
### Méthodologie

Les cellules mononuclées du sang, de la moelle osseuse ou d'un ganglion, sont séparées sur un gradient de Ficoll®. L'ADN génomique ou l'ARN peuvent être utilisés comme support pour l'analyse. Travailler sur l'ARN nécessite une étape supplémentaire de transcription inverse en ADN complémentaire (ADNc) mais présente l'avantage de ne détecter que les réarrangements fonctionnels. L'ADN/ADNc est amplifié par PCR à l'aide d'amorces IGHV leader ou IGHV consensus du *framework 1* (FR1, fig. 12.1). Le produit d'amplification est contrôlé sur gel de polyacrylamide ou, si une amorce marquée est introduite, sur un analyseur de fragments, puis séquencé. La séquence obtenue est comparée avec les séquences VH en configuration germinale issues des bases de données et le pourcentage d'identité est calculé par rapport à la séquence du VH le plus

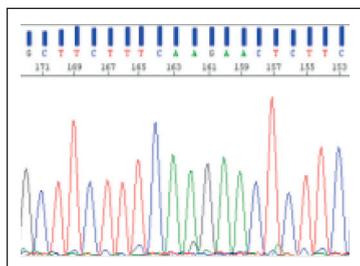
### a. Amplification par PCR du réarrangement VDJ



### b. Migration sur Gel ou sur Analyseur de fragment (amorce couplée à un fluorochrome)



### c. Séquençage du produit de PCR



### d. Détermination du pourcentage d'homologie

THANK YOU  
for using **IMGT/V-QUEST**

THE  
INTERNATIONAL  
IMMUNOGENETICS  
INFORMATION SYSTEM



IMGT/V-QUEST programme version: 3.2.30; IMGT/V-QUEST reference directory release: 201205-1

#### B. Synthesis for the IMGT/V-QUEST analysed sequences

Result summary:	Productive IGH rearranged sequence (no stop codon and in-frame junction)		
V-GENE and allele	<a href="#">Homsap.IGHV1-24*01.F</a>	score = 1435	identity = 100,00% (288/288 nt)
J-GENE and allele	<a href="#">Homsap.IGHJ5*02.F</a>	score = 228	identity = 94,12% (48/51 nt)
D-GENE and allele by IMGT/JunctionAnalysis	<a href="#">Homsap.IGHD5-19*01.F</a>	D-REGION is in reading frame 1	
FR-IMGT lengths, CDR-IMGT lengths and AA JUNCTION	[25 17 38 11]	[8 8 21]	CATAQLTNGWYWRPNRKRWFDPW

**Fig. 12.1** Exploration à visée pronostique du statut mutationnel de la partie variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline d'un clone de lymphocytes B issus d'un patient atteint de leucémie lymphoïde chronique.

a. Le réarrangement VDJ est amplifié par PCR.

b à d. L'amplicon est ensuite contrôlé (b) et séquençé (c) afin de comparer la séquence obtenue à celles issues de bases de données internationales (d) et calculer le pourcentage d'homologie.

\* : amorce couplée à un fluorochrome.

proche. Plusieurs outils accessibles sur des sites Internet permettent cette analyse.

### Recommandations de mise en œuvre

L'utilisation d'ARN pour la production d'ADNc nécessite de prendre les précautions nécessaires pour préserver ces acides nucléiques fragiles : transport rapide des échantillons, utilisation d'inhibiteurs d'ARNases ou de milieux spécifiques, travail en conditions RNase-free.

La mise en évidence des séquences résultant d'hypermutations caractéristiques d'un clone pathologique peut permettre de suivre la maladie résiduelle moléculaire dans les proliférations B. Ceci nécessite pour chaque point de suivi une comparaison avec le matériel de diagnostic et dépend donc de sa quantité et de sa qualité, ainsi que de la production d'amorces spécifiques pour l'amplification du matériel nucléaire des cellules malignes.

### Exemples d'applications

- En recherche : la recherche des hypermutations somatiques après stimulation de cellules *in vitro* permet d'évaluer les réponses des cellules mémoire ou naïves.
- En clinique :
  - la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une pathologie tumorale caractérisée par la prolifération d'un clone de lymphocytes B défini par des caractéristiques phénotypiques et moléculaires propres. Le statut mutationnel VH, défini par une homologie supérieure ou inférieure à 98 % aux séquences germinales, est associé à l'évolution de cette affection, plus favorable pour les patients ayant une LLC mutée (< 98 %);
  - la recherche des spécificités de séquence du clone malin peut être utilisée pour détecter, après traitement, la maladie résiduelle dans la LLC, les leucémies aiguës lymphoblastiques et les lymphomes.

## Translocations chromosomiques

Les translocations chromosomiques sont des échanges de matériel génétique entre chromosomes

homologues ou non, pouvant modifier les conditions d'activation et de survie des cellules et conduire à des pathologies tumorales. Dans les hémopathies malignes B, les translocations retrouvées sont souvent issues d'erreurs lors du processus de recombinaison VDJ des gènes codant pour la partie variable des gènes *IGVH* ou, plus rarement, lors des recombinaisons VJ au niveau des chaînes légères  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Elles entraînent le plus souvent une surexpression des transcrits et de la protéine de fusion si la séquence ne comporte pas de codon stop.

### Méthodologie

L'hybridation *in situ* en fluorescence (*Fluorescence In Situ Hybridization* ou FISH) sur cellules en métaphase ou interphase est la technique de référence permettant de détecter les translocations chromosomiques.

L'amplification de l'ADN par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des gènes impliqués dans la fusion est également possible en utilisant pour chaque gène une région d'hybridation des amorces localisée à proximité du point de cassure. Les stratégies de PCR recherchant des translocations impliquant les gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines utilisent une amorce consensus sur le gène JH.

L'analyse des transcrits peut être réalisée sur du matériel de bonne qualité, frais ou congelé, pour lequel les ARNm ont été bien conservés. Une surexpression des transcrits peut être évaluée par RT-PCR compétitive co-amplifiant différents ARNm.

Les protéines de fusion, quand elles existent, peuvent être détectées par immunohistochimie sur coupes congelées ou fixées et incluses en paraffine, en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques des deux protéines concernées. Les signaux pourront alors colocaliser ou, au contraire, disparaître si l'épitope reconnu est altéré ou éliminé par la translocation. Quelques techniques détectant des protéines de fusion dans des lysats cellulaires par ELISA ou par une technique voisine ont été rapportées dans la littérature.

### Recommandations de mise en œuvre

La ou les techniques à utiliser dépendent du type d'anomalie recherchée et du contexte pathologique.

Les précautions habituelles doivent être prises pour la manipulation des ARN.

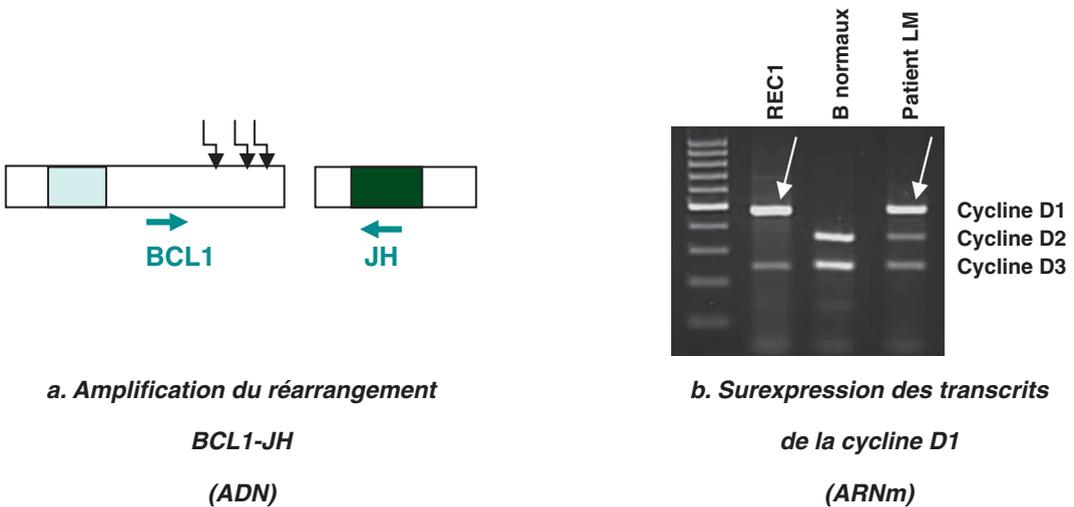
La spécificité des anticorps et l'efficacité des techniques d'immunomarquage doivent être vérifiées en s'entourant des témoins *ad hoc*, notamment de lignées présentant l'anomalie recherchée.

### Exemples d'applications

- En recherche : les recherches de mutations sont appliquées à des modèles particuliers utilisant des agents susceptibles d'induire des cassures de l'ADN et des recombinaisons anormales. Les translocations ainsi générées et leur suivi au cours de processus tumoraux ou d'activation

cellulaire peuvent bénéficier de ces techniques. Ainsi, l'inactivation ou au contraire la dé-répression de certains gènes, résultant de ces modifications chromosomiques, permettent de mieux comprendre leur implication dans la physiologie des réponses immunitaires.

- En clinique : les réarrangements BCL1-IGH et IGH-BCL2, résultant des translocations t(11;14)(q13;q32) et t(14;18)(q32;q21), sont les plus couramment retrouvés respectivement dans les lymphomes du manteau et de Burkitt. La translocation t(11;14)(q13;q32) place le gène de la cycline D1, *CCND1*, sous le contrôle de la région enhancer IGH-E $\mu$  induisant une activation transcriptionnelle de la cycline D1 (fig. 12.2).



**Fig. 12.2** Recherche de l'hyperexpression de la cycline D1 consécutive à la translocation t(11; 14) dans les lymphomes du manteau.

a. Sondes d'amplification BCL1 sur le chromosome 11, JH sur le chromosome 14.

b. Surexpression des transcrits de la cycline D1 dans les lymphocytes B pathologiques : analyse des transcrits ARNm dans une lignée de lymphome du manteau (REC1), lymphocytes B normaux et ARNm d'un patient atteint de lymphome du manteau (LM).

# Chapitre 13

## Immuno-hématologie

En 1900, Karl Landsteiner a introduit la notion de groupes sanguins en montrant que les individus peuvent être classés en trois groupes (A, B et O) sur la base de la survenue d'une agglutination des hématies après mélange de leur sang. Un quatrième groupe (AB) fut découvert par la suite. Un groupe sanguin érythrocytaire est un marqueur allotypique immunogène, génétiquement transmis, reconnu par des anticorps spécifiques. Ces antigènes sont exprimés de façon potentiellement non exclusive à la surface des hématies. Leur caractère immunogène représente un obstacle à la transfusion sanguine, constitue un risque d'incompatibilité pendant la grossesse et conditionne l'exploration de leur polymorphisme par des

méthodes immunologiques actuellement complétées par des techniques de biologie moléculaire.

Les antigènes de groupe sanguin peuvent être de nature protéique (*e.g.* RH) ou glucidique (*e.g.* ABO), présents sous forme isolée, ou exprimés sur des glycoprotéines ou des glycolipides. Leur polymorphisme peut être dû à la présence ou à l'absence d'une molécule entière (*e.g.* RHD positif ou négatif), ou à la variabilité d'une même molécule par le changement d'un simple acide aminé (*e.g.* Fy<sup>a</sup> ou Fy<sup>b</sup>) ou d'une unité monosaccharidique (*e.g.* A ou B).

Les anticorps reconnaissant les antigènes érythrocytaires sont de deux types (tableau 13.1). Les anticorps naturels préexistent à toute stimulation interhumaine par transfusion ou grossesse.

**Tableau 13.1** Différents systèmes de groupes sanguins officiellement reconnus par la Société internationale de transfusion sanguine (SITS), nomenclature et localisation chromosomique

Numérotation du système	Nom du système	Symbole	Nombre d'antigènes	Chromosome	Locus
A001	ABO	ABO	4	9	<i>ABO</i>
A002	MNS	MNS	46	4	<i>GYP A/B/E</i>
A003	P1PK	P1	2	22	<i>P1PK</i>
A004	Rh	RH	52	1	<i>RHD/CE</i>
A005	Lutheran	LU	20	19	<i>LU</i>
A006	Kell	KEL	32	7	<i>KEL</i>
A007	Lewis	LE	6	19	<i>FUT3</i>
A008	Duffy	FY	5	1	<i>FY</i>
A009	Kidd	JK	3	18	<i>SLC14A1</i>
A010	Diego	DI	22	17	<i>SLC4A1</i>
A011	Yt	YT	2	7	<i>ACHE</i>

(Suite)

Tableau 13.1 Suite

Numérotation du système	Nom du système	Symbole	Nombre d'antigènes	Chromosome	Locus
A012	Xg	XG	2	X/Y	<i>XG/MIC2</i>
A013	Scianna	SC	7	1	<i>ERMAP</i>
A014	Dombrock	DO	7	12	<i>DO</i>
A015	Colton	CO	4	7	<i>AQP1</i>
A016	Landsteiner-Wiener	LW	3	19	<i>LW</i>
A017	Chido/Rodgers	CH/RG	9	6	<i>C4A/B</i>
A018	H	H	1	19	<i>FUT1</i>
A019	Kx	KX	1	X/Y	<i>XK</i>
A020	Gerbich	GE	11	2	<i>GYPC</i>
A021	Cromer	CROM	16	1	<i>DAF</i>
A022	Knops	KN	9	1	<i>CR1</i>
A023	Indian	IN	4	11	<i>CD44</i>
A024	Ok	OK	3	19	<i>BSG</i>
A025	Raph	RAPH	1	11	<i>MER2</i>
A026	John Milton-Hagen	JMH	6	15	<i>SEMA7A</i>
A027	Indian	IN	1	6	<i>CGNT2</i>
A028	Globoside	GLOB	1	3	<i>B3GALNT1</i>
A029	Gill	GIL	1	9	<i>AQP3</i>
A030	RHAG	RHAG	3	6	<i>RHAG</i>
A031	Forssman	FORS	1	1	<i>A3GALNT1</i>
A032	Junior	JR	1	4	<i>ABCG2</i>
A033	Langeris	LAN	1	2	<i>ABCB6</i>
A034	Vel	VEL	1	1	<i>SMIM1</i>

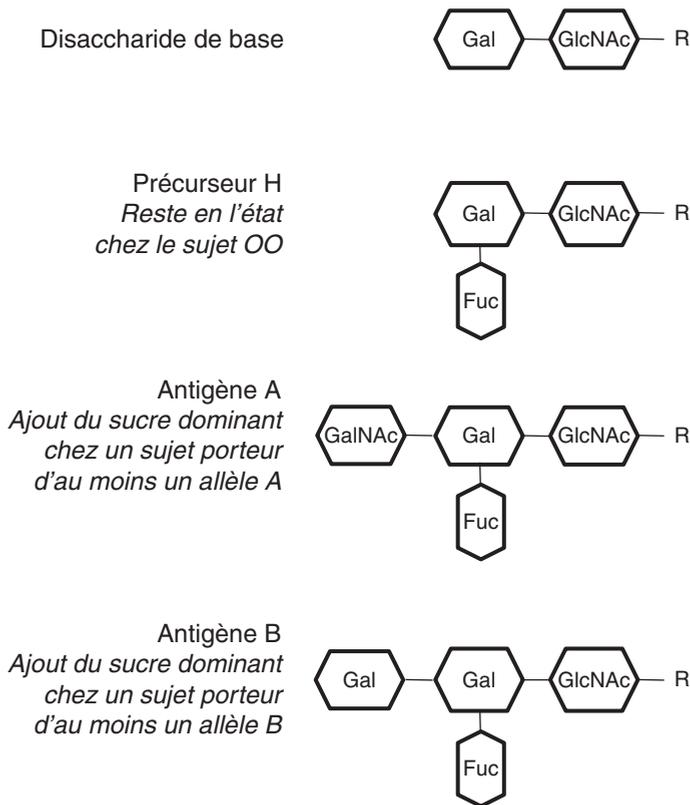
Les anticorps naturels réguliers ou irréguliers sont présents respectivement de façon constante (*e.g.* anticorps du système ABO) ou inconstante (*e.g.* système Lewis). Ils sont de classe IgM et/ou IgG. La présence des anticorps naturels réguliers impose des règles de compatibilité ABO pour les hématies et le plasma dès la première transfusion.

Les anticorps immuns liés à une stimulation interhumaine sont surtout de classe IgG, de survie inconstante et font par conséquent partie des anticorps irréguliers. Ils représentent un risque transfusionnel et obstétrical. Ces anticorps peuvent être des allo-anticorps ou des auto-anticorps<sup>12</sup>.

<sup>12</sup> En fonction de la fréquence dans la population de l'antigène reconnu, on parle d'antigènes privés (< 1 %) ou publics (> 99 %). La majorité des allo-anticorps ont une fréquence distribuée entre ces deux bornes.

Le système ABO est le plus important car tout sujet présente dans son sérum des anticorps naturels réguliers (anti-A et anti-B) dirigés contre les antigènes érythrocytaires qu'il ne possède pas. Les antigènes de ce système sont représentés par les sucres terminaux des chaînes latérales glucidiques des glycolipides ou glycoprotéines de la membrane du globule rouge (*fig. 13.1*). Les phénotypes A et B sont codominants et dominants par rapport à O (*tableau 13.2*). Les anticorps naturels de ce système sont majoritairement des IgM dirigés contre les antigènes absents et seuls les sujets AB n'ont pas d'anticorps dans ce système.

Le système Rhésus (Rh) est un système complexe comportant une cinquantaine d'antigènes importants car très immunogènes. Pour la pratique courante, cinq d'entre eux (D, C, E, c et e



**Fig. 13.1** Structure saccharidique des antigènes du système ABO.

Sur le polysaccharide de base (disaccharide galactose-N-acétylglucosamine), un fucose est accroché par l'activité de la fucosyl transférase codée par le gène *H* produisant ainsi la substance H. Par la suite, tout dépend des allèles portés par le locus ABO. Si le sujet est homozygote pour l'allèle O, l'antigène H reste en l'état. Si le sujet possède au moins un allèle A, le sucre immunodominant A (GalNAc) est ajouté par l'activité d'une GalNAc transférase et produit l'antigène A. Si le sujet possède au moins un allèle B, le sucre immunodominant B (Gal) est ajouté par l'activité d'une Gal transférase et produit l'antigène B. Il est à noter que si H est absent, les antigènes A et B ne peuvent être synthétisés même si leurs allèles sont présents. C'est ce que l'on retrouve dans un phénotype exceptionnel, le phénotype Bombay, lié à la présence en double dose d'un allèle *h* non fonctionnel.

**Tableau 13.2** Système ABO : relations génotype-phénotype et réactions antithétiques

Groupe Sanguin	Gènes présents	Génotypes possibles	Antigène globulaire (épreuve globulaire)	Anticorps plasmatique (épreuve plasmatique)	Fréquence (%) en Europe
A	Gène <i>A</i> , gène <i>H</i>	<i>A/A</i> ou <i>A/O</i>	A	Anti-B	45
B	Gène <i>B</i> , gène <i>H</i>	<i>B/B</i> ou <i>B/O</i>	B	Anti-A	9
AB	Gène <i>A</i> , gène <i>B</i> , gène <i>H</i>	<i>A/B</i>	AB	Aucun	3
O	Gène <i>H</i>	<i>O/O</i>	O	Anti-A et Anti-B	43

respectivement pour RH1, RH2, RH3, RH4, RH5) sont recherchés pour un phénotypage rhésus complet. Ils sont codés par deux loci étroitement liés et transmis en bloc sous forme

d'haplotype. Le locus *RHD* code l'antigène D qui définit le phénotype RH1 positif. Chez les sujets européens, l'absence d'antigène D, caractéristique du phénotype RH1 négatif, correspond à une

**Tableau 13.3** Principaux allo-anticorps de groupe sanguin, nature et pouvoir pathogène

Catégorie de l'anticorps	Cible de l'anticorps	Classe d'Ig	Phénotype de l'immunisé	Risque d'accidents transfusionnels	Risque de maladie hémolytique du nouveau-né
Naturel régulier	Anti-A Anti-B Anti-H	IgM >> IgG IgM >> IgG IgG	O, B O, A Bombay (O <sub>B</sub> )	++++	Rare
	Anti-P Anti-[P <sub>1</sub> , P <sub>1</sub> <sup>k</sup> ] (anti-Tj <sup>a</sup> )	IgM + IgG	P <sub>1</sub> <sup>k</sup> ou P <sub>2</sub> <sup>k</sup> p ou Tj(a-)	++++	Fausse couches
Naturel irrégulier	Anti-Le <sup>a</sup> Anti Le <sup>b</sup>	IgM	Le(a-) Le(b-)	Non	Non
	Anti-P <sub>1</sub>	IgM	P <sub>2</sub>	Non	Non
	Anti-M Anti-N	IgM	M- N-	Non Non	+ Non
Immun irrégulier	Anti-D	IgG	Rh-	++++	++++
	Anti-E Anti-C Anti-c Anti-e	IgG	E- C- c- e-	+++   	++ ++ ++++ ++
	Anti-K	IgG	K-	+++	++++
	Anti-Fy <sup>a</sup> Anti-Fy <sup>b</sup>	IgG	Fy(a-) Fy(b-)	+++ ++	+++ +
	Anti-Jk <sup>a</sup> Anti-Jk <sup>b</sup>	IgG	Jk(a-) Jk(b-)	+++ ++	+++ +
	Anti-S	IgG	S-	++	++

délétion et est désignée par la lettre *d*. Les sujets RH1 négatif sont homozygotes *dd* pour cette délétion. Par définition, le groupe Rh standard correspond à ces deux phénotypes<sup>13</sup>. La détermination de l'antigène D est indissociable du groupe ABO. Il n'y a pas d'anticorps anti-rhésus naturels, ils sont tous des anticorps immuns irréguliers secondaires à une grossesse ou à une transfusion incompatible. La compatibilité pour l'antigène D doit être impérativement respectée lors d'une transfusion d'érythrocytes. Le système

<sup>13</sup> En France, 85 % des sujets sont Rh positifs (RH:+1) et 15 % Rh négatifs (RH:-1). Sur un document de groupe, par convention et selon la nomenclature internationale, les antigènes présents sont représentés par le symbole du système auquel ils appartiennent, suivi du chiffre les désignant, précédé ou non du signe - selon qu'ils sont absents ou présents. Ainsi, le phénotype Rh négatif classique, qui correspond au phénotype D<sup>-</sup>C<sup>+</sup>E<sup>-</sup>C<sup>+</sup>e<sup>+</sup> en nomenclature usuelle, est selon cette convention noté RH: -1,-2,-3,4,5.

Kell (KEL) comporte 32 antigènes dont deux sont recherchés en routine, K (KEL1 très immunogène) et k (KEL2 beaucoup moins immunogène), codés par deux allèles codominants<sup>14</sup>. Les anticorps anti-KEL1 sont des anticorps immuns irréguliers et il faut éviter l'immunisation anti-K en transfusion. Trois autres systèmes importants peuvent être source d'anticorps immuns irréguliers, les systèmes Kidd, Duffy et MNSs dans lequel les antigènes S et s sont les plus immunogènes.

Les anticorps naturels irréguliers anti-P<sub>1</sub> et anti-Lewis ne présentent en général aucun risque transfusionnel ou obstétrical. En revanche, certains anticorps naturels réguliers des systèmes P et P<sup>K</sup>, présents exceptionnellement chez des sujets dépourvus des antigènes correspondants, peuvent être dangereux. Les principaux allo-anticorps anti-érythrocytes sont présentés dans le [tableau 13.3](#).

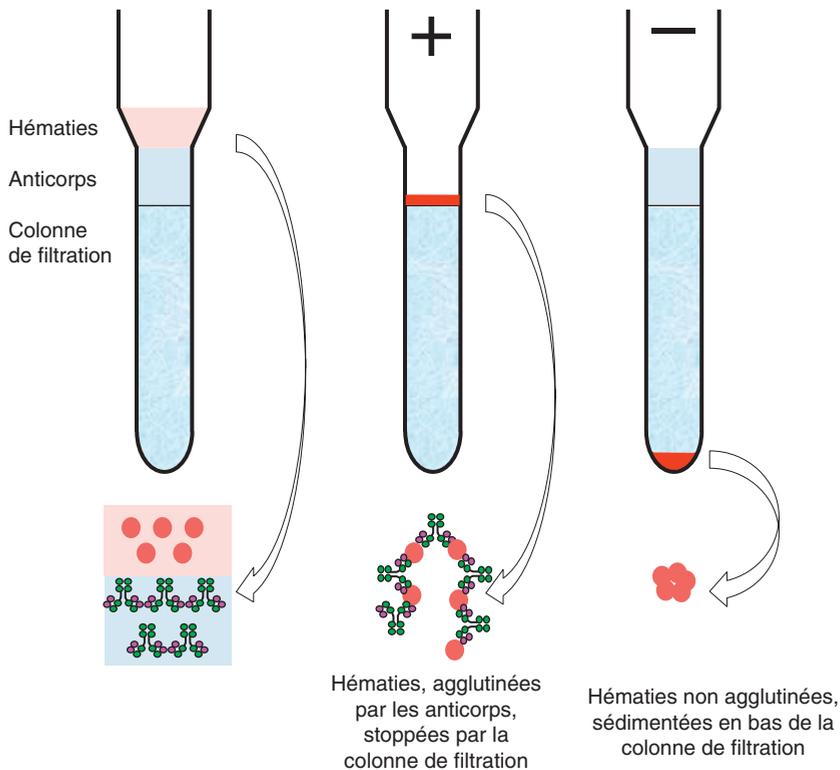
<sup>14</sup> Quatre-vingt-dix pour cent des individus sont Kell- (*kk*), et 10 % sont K (KK ou Kk).

## Techniques sérologiques par hémagglutination

### Méthodologie

La détermination des antigènes de groupes sanguins et des anticorps correspondants repose sur des méthodes immunologiques exploitant la spécificité de la réaction antigène-anticorps. L'hémagglutination est la méthodologie la plus répandue, adaptée à des supports permettant une automatisation et la réduction du risque d'erreurs humaines (microplaques ou colonnes de filtra-

tion). Les techniques en microplaques distinguent les réactions d'agglutination négatives (sédimentation en bouton au fond de la cupule) des réactions positives (sédimentation en tapis). Les techniques par filtration consistent à détecter une agglutination des hématies déposées dans une chambre de réaction au sommet d'une micro-colonne de filtration (gel ou microbilles de verre). La colonne fonctionne comme un filtre qui retient les hématies agglutinées dans la chambre de réaction. Les techniques par filtration sont appliquées pour la majorité des typages érythrocytaires (fig. 13.2).



**Fig. 13.2** Hémagglutination en tube.

Cette technique est utilisée pour réaliser les groupes sanguins et les tests de Coombs recherchant des anticorps anti-hématies fixés sur les globules rouges *in vivo* (Coombs direct ou *Test of Direct Agglutination*, TDA) ou au laboratoire (Coombs indirect ou *Test of Indirect Agglutination*, TIA) par incubation d'hématies de groupe O et du sérum testé. Le tube de gauche représente la situation initiale au cours de laquelle les réactifs sont introduits dans la chambre supérieure. Le gel de filtration est dit actif s'il contient un anticorps de groupage ou une anti-globuline. On peut réaliser le test de Coombs en déposant dans la chambre supérieure seulement les hématies du malade sensibilisées *in vivo* ou un mélange des hématies O et du sérum du sujet à tester. Le gel peut également être passif : l'anticorps de groupage se trouve alors dans la chambre supérieure et les hématies à tester lui sont ajoutées. Le tube du centre représente une réaction positive où les hématies agglutinées ont été bloquées par le gel. Le tube de droite représente une réaction négative où les hématies non agglutinées ont traversé le gel.

## Recommandations de mise en œuvre

L'hémagglutination est dite directe si elle survient dans une suspension d'hématies en solution saline à 0,9 % (0,15 M NaCl), ce qui permet la distinction entre anticorps agglutinants (*e.g.* système ABO, avec anticorps plutôt d'isotype IgM) et anticorps non agglutinants reconnaissant des antigènes protéiques (*e.g.* Duffy, Kidd). Il est à noter que certains anticorps monoclonaux IgM dits salins sont capables de provoquer une agglutination directe de systèmes antigéniques protéiques. Les anticorps agglutinants sont utilisés comme réactifs de groupage par des méthodes d'agglutination directe.

L'hémagglutination indirecte est fondée sur l'utilisation d'artifices permettant une agglutination dans des systèmes non directement agglutinants. Certains facteurs agissent sur la phase de sensibilisation permettant la reconnaissance des hématies par les anticorps : température, temps d'incubation, force ionique, pH, densité et accessibilité antigénique, ratio antigènes/anticorps. D'autres facteurs agissent sur la phase d'agglutination des hématies préalablement sensibilisées. Une réduction de la distance interglobulaire peut être obtenue par des enzymes qui réduisent les charges électro-négatives répulsives portées par les acides sialiques. Une anti-globuline polyclonale ou monoclonale (anticorps animal anti-isotype d'immunoglobuline humaine) et/ou un anti-C3d sont utilisés pour induire l'agglutination des hématies.

## Exemples d'applications

- En recherche : ces techniques sont potentiellement applicables à la recherche des groupes sanguins ou d'anticorps anti-érythrocytaires dans de nombreux modèles expérimentaux. L'immunisation d'animaux de laboratoire contre des hématies est une technique largement utilisée pour explorer la physiologie et la régulation des réponses immunitaires humorales.
- En clinique :
  - le test de Coombs direct appelé aujourd'hui test direct à l'anti-globuline (TDA) permet de révéler une sensibilisation *in vivo* des hématies par un auto-anticorps (*e.g.* anémie hémolytique auto-immune) ou par un allo-

anticorps (*e.g.* maladie hémolytique du nouveau-né, incompatibilité transfusionnelle) ;

- le test de Coombs indirect appelé aujourd'hui test indirect à l'anti-globuline (TIA) recherche la sensibilisation *in vitro* d'hématies test par le sérum étudié. Le TIA est à la base de la recherche des agglutinines irrégulières (RAI) qui sont en règle générale des IgG non directement agglutinantes<sup>15</sup>.

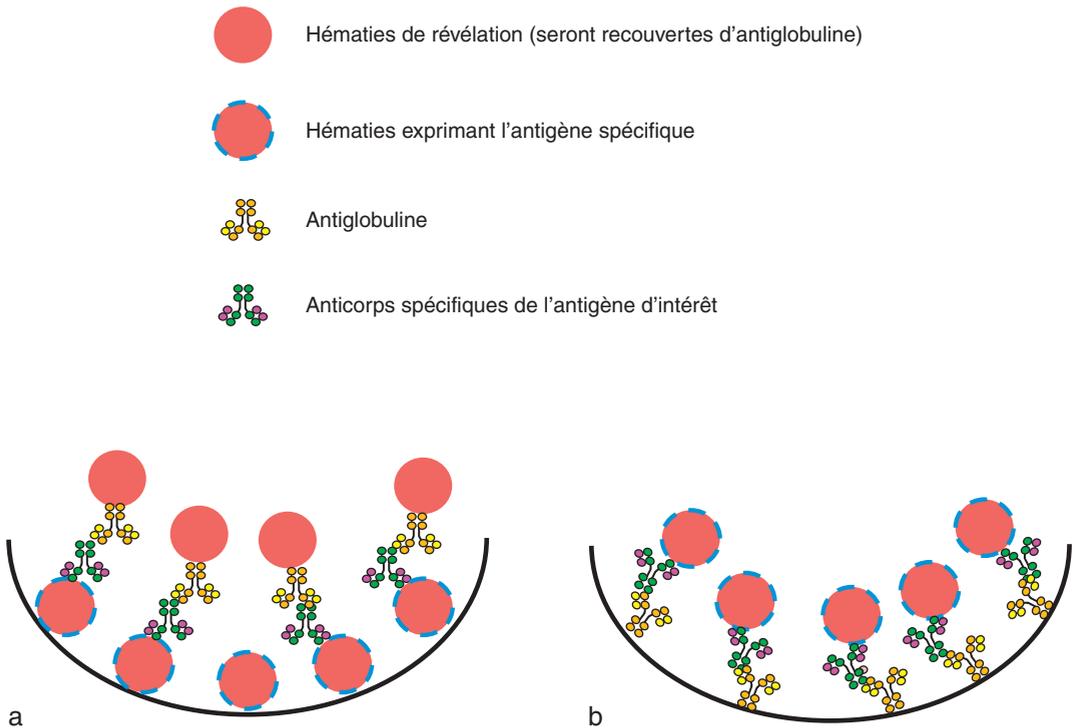
## Alternatives à l'hémagglutination

La révélation des anticorps anti-érythrocytaires peut faire appel à des méthodes en microplaques indépendantes de l'agglutination ou à la biologie moléculaire. L'exploration des groupes sanguins érythrocytaires en biologie moléculaire repose sur la connaissance des formes alléliques d'un gène responsable du polymorphisme moléculaire (*e.g.* protéine, glycosyltransférase).

## Méthodologie

L'immuno-adhérence (fig. 13.3) repose sur l'utilisation de microplaques dont les puits contiennent des hématies fixées, porteuses des antigènes à identifier. Après addition du sérum testé, la microplaque est incubée puis lavée pour éliminer les fixations non spécifiques. Les anticorps ayant reconnu les hématies dans les puits sont ensuite révélés par immuno-adhérence en ajoutant des hématies révélatrices porteuses d'anti-globuline humaine. Ces hématies indicatrices s'étalent sur toute la surface du puits en cas de réaction positive. Une réaction négative est matérialisée, après centrifugation, par un bouton cellulaire au centre du puits. Des techniques similaires reposent sur la fixation préalable d'anti-globuline humaine au fond du puits. Les hématies sensibilisées *in vivo* (TDA) ou *in vitro* (TIA) s'étalent sur toute la surface du puits après centrifugation, alors que les hématies

<sup>15</sup> Le TIA est effectué en mélangeant dans un premier temps le sérum ou le plasma à tester avec des hématies O d'un panel de dépistage et de l'anti-globuline. En cas de positivité, un panel d'identification est réalisé.



**Fig. 13.3** Immuno-adhérence à partir d'une cupule recouverte d'hématies (a) et d'une cupule recouverte d'antiglobuline (b).

non sensibilisées d'un test négatif donnent un bouton cellulaire au centre du puits. Cette deuxième approche de l'immuno-adhérence évite les lavages.

Le génotypage nécessite de disposer d'un échantillon d'ADN représentatif du génome (ADNg). Un fragment de l'ADNg est amplifié par PCR. Les SNP sont recherchés dans les amplicons par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) pour un SNP d'intérêt localisé dans le site de restriction d'une endonucléase, ou par séquençage. Des techniques de PCR-AS (*Allele-Specific*) utilisent trois amorces, l'une commune et deux autres spécifiques de chacun des deux allèles. La PCR en temps réel allèle spécifique peut être appliquée à haut débit. Les micropuces à ADN avec une PCR multiplex permettent un génotypage à moyen débit éventuellement automatisable. D'autres techniques se déve-

loppent comme la spectrométrie de masse identifiant le nucléotide à chaque position polymorphe.

### Exemples d'applications

Les alternatives à l'agglutination se développent pour les typages érythrocytaires. En médecine transfusionnelle et obstétricale, l'outil moléculaire permet d'envisager la détermination du génotype érythrocytaire d'un individu et d'en déduire le phénotype lorsque l'immunohématologie fait défaut ou est confrontée à des situations complexes (*e.g.* transfusions récentes, maladie hémolytique du nouveau-né). En transfusion sanguine, la mise en œuvre de techniques à haut débit permettrait de résoudre le problème de l'identification de génotypes délicats ou rares. Ceci pourrait s'avérer utile pour la sécurité transfusionnelle ou pour la constitution de panels de laboratoire. Les principales applications sont présentées dans le [tableau 13.4](#).

**Tableau 13.4** Applications du génotypage érythrocytaire dans le cadre de la médecine transfusionnelle et obstétricale

Contexte patient	Contexte donneur
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Transfusion récente</li> <li>- Hématies recouvertes d'immunoglobulines (TDA positif)</li> <li>- Réactifs immunologiques non disponibles (anti-Do<sup>a</sup>, Do<sup>b</sup>, -Js<sup>a</sup>, -VVS)</li> <li>- Distinction allo-anticorps/auto-anticorps</li> <li>- Détection d'antigènes faiblement exprimés ou partiels (Fy<sup>a</sup>, RhD faible, DAR)</li> <li>- Aide à la résolution d'enquêtes sérologiques complexes</li> <li>- Identification des bases moléculaires de résultats sérologiques inhabituelles</li> <li>- Patients ayant reçu une greffe hématopoïétique/chimérisme naturel</li> <li>- Identification d'un fœtus à risque pour maladie hémolytique néonatale</li> <li>- Détermination de la zygote, en particulier pour le gène <i>RHD</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Constitution d'une base de données de donneurs génotypés</li> <li>- Identification des donneurs négatifs pour des antigènes publics ou privés</li> <li>- Réactifs immunologiques non disponibles (anti-Do<sup>a</sup>, Do<sup>b</sup>, -Js<sup>a</sup>, -VVS)</li> <li>- Identification des donneurs pour les panels d'identification des anticorps</li> <li>- Résolution des divergences</li> <li>- Identification des donneurs exprimant des antigènes faibles et/ou partiels</li> </ul>

# Chapitre 14

## Immuno-informatique

Les récepteurs d'antigènes, immunoglobulines (IG) et récepteurs T (TR) ainsi que les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (MH), sont les acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative des vertébrés à mâchoires<sup>16</sup>, apparue il y a 450 à 500 millions d'années. Les récepteurs d'antigènes sont caractérisés par une incroyable diversité (plus de  $10^{12}$  IG et TR par individu) obtenue grâce aux mécanismes moléculaires de réarrangements de l'ADN (fig. 14.1), de N-diversité et, pour les immunoglobulines, de mutations somatiques.

Afin de gérer la diversité et la complexité des données en immunogénétique, une nouvelle science, l'immuno-informatique<sup>17</sup>, a vu le jour en 1989, avec la création par Marie-Paule Lefranc à Montpellier d'*international ImMunoGeneTics information system*<sup>®</sup> (IMGT<sup>®</sup>)<sup>18</sup>. L'analyse des données et la standardisation de leurs annotations ont été possibles grâce à la création d'IMGT-ONTOLOGY. À l'heure actuelle, IMGT<sup>®</sup> est la référence mondiale en immunogénétique et immuno-informatique. Il est utilisé en recherche fondamentale, médicale et biotechnologique, en

particulier pour les analyses de répertoires immunitaires et pour l'ingénierie des anticorps.

### IMGT<sup>®</sup>

---

IMGT<sup>®</sup> est le premier système d'information intégré spécialisé dans les séquences, les gènes et les structures tridimensionnelles (3D) des immunoglobulines (IG) et des récepteurs T (TR), des protéines majeures d'histocompatibilité (MH), des protéines de la superfamille des IG (IgSF), des protéines de la superfamille des MH (MhSF) et d'autres protéines apparentées du système immunitaire (*related proteins of the immune system* ou RPI). IMGT<sup>®</sup> est composé de sept bases de données, de dix-sept outils interactifs et de plus de 15 000 pages de ressources Web (fig. 14.2). Les séquences, les gènes et les structures sont analysés et gérés selon trois types d'approches biologiques : génomique (trait pointillé), génétique (trait plein), et structurale (trait discontinu).

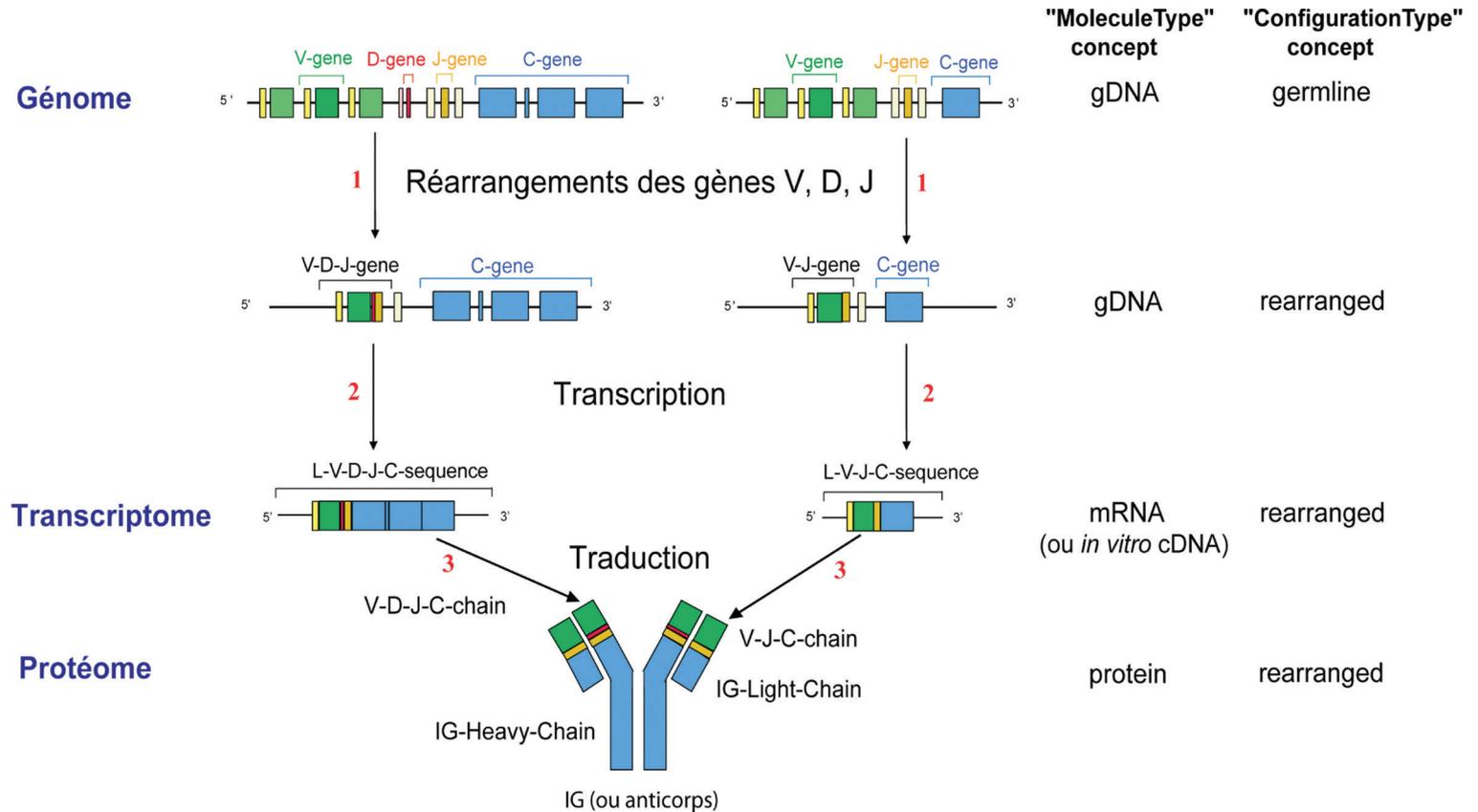
### Approche génomique

L'approche génomique est orientée vers l'étude des gènes dans leur locus et sur le chromosome. Elle utilise IMGT/GENE-DB, la base des gènes d'IMGT<sup>®</sup> qui comprend les gènes et allèles des immunoglobulines (IG) et des récepteurs T (TR), ainsi que des outils d'analyse tels qu'IMGT/GeneFrequency, IMGT/LocusView et IMGT/LIGMotif.

<sup>16</sup> Vertébrés à mâchoires ou gnathostomata, du grec *gnathos* (γνάθος) mâchoire et *stoma* (στόμα) bouche.

<sup>17</sup> Lefranc M.-P., « Immunoglobulin (IG) and T cell receptor genes (TR) : IMGT<sup>®</sup> and the birth and rise of immunoinformatics ». *Front Immunol* 2014; Feb 05; 5 : 22 (<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2014.00022/abstract>).

<sup>18</sup> [www.imgt.org](http://www.imgt.org)



**Fig. 14.1** Représentation de la synthèse d'une immunoglobuline ou anticorps.

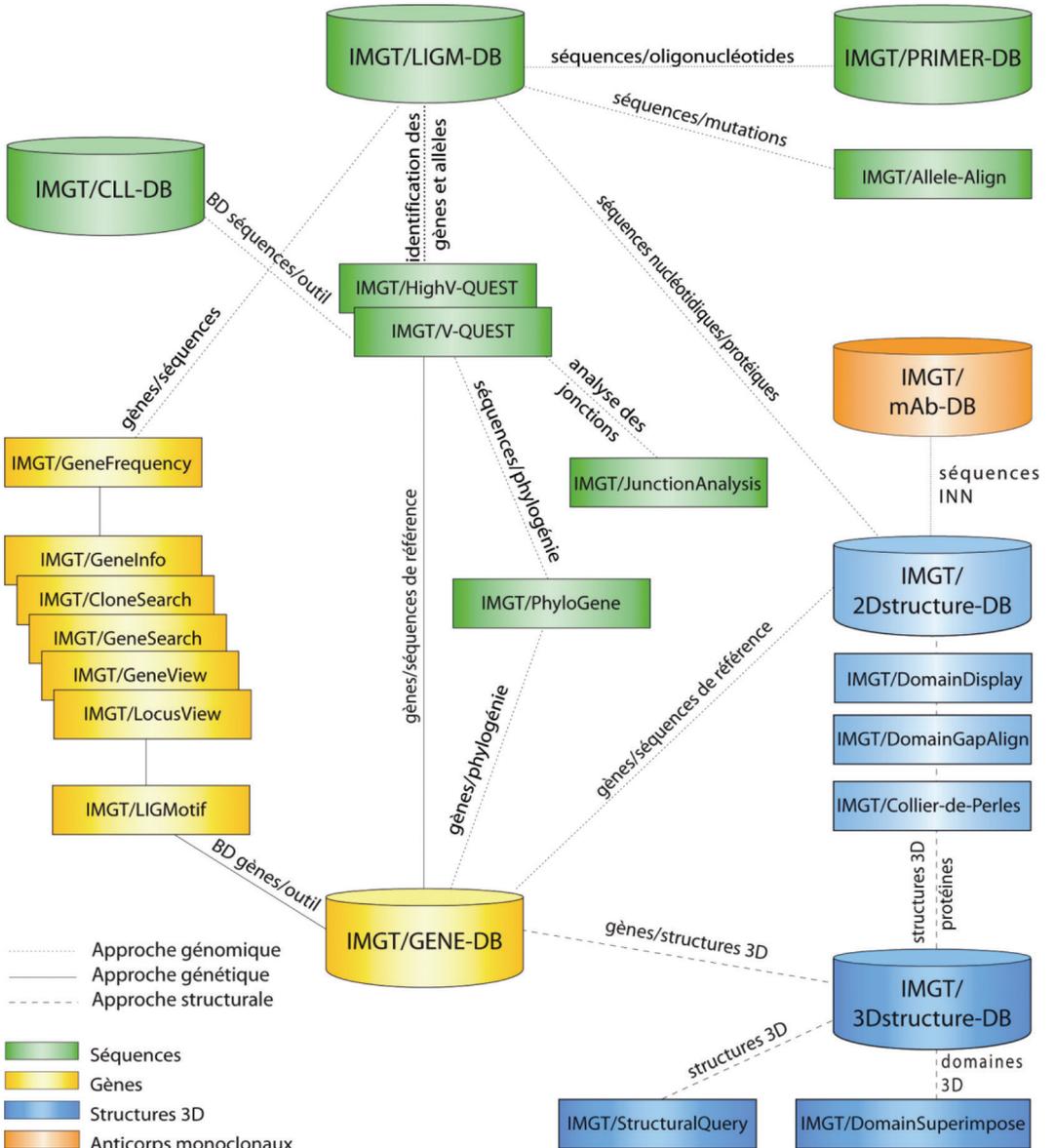
Les principales étapes de la synthèse d'une immunoglobuline sont indiquées par des chiffres. 1 : Réarrangement des gènes variables (V), de diversité (D) et de jonction (J) (**V-D-J-gene** code le domaine variable de la chaîne lourde et **V-J-gene** celui de la chaîne légère).

2 : Transcription des séquences réarrangées et épissage des introns.

3 : Traduction de l'ARN messager en une chaîne polypeptidique. Le peptide signal (L pour **leader** ou L-REGION) est présent dans l'ARN messager et la chaîne polypeptidique. Il est ensuite éliminé dans la cavité du réticulum endoplasmique.

**gDNA**, **mRNA** et **protein** sont des types de molécules, **germline** et **rearranged** sont les types de configuration germinale et réarrangée des gènes V, D et J. Le type de configuration des gènes constants (C) est **undefined** car ces gènes ne réarrangent pas. **MoleculeType** et **ConfigurationType** sont des concepts d'identification d'IMGT-ONTOLOGY.

Source : IMGT® ([www.imgt.org](http://www.imgt.org))



**Fig. 14.2** IMGT®.

International ImMunoGeneTics information system® ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)) comprend sept bases de données, dix-sept outils interactifs pour l'analyse des séquences, des gènes et des structures 3D et plus de 15 000 pages de ressources Web. Les bases de données sont représentées sous forme de cylindres et les outils par des rectangles.

Source : IMGT® ([www.imgt.org](http://www.imgt.org))

## Approche génétique

L'approche génétique permet l'étude des gènes en relation avec leurs polymorphismes de séquence et leurs mutations, leur expression, leur spécificité et leur évolution. Elle utilise :

- les bases de données :
  - IMGT/LIGM-DB, qui contient les séquences nucléotidiques des immunoglobulines (IG) et des récepteurs T (TR) de l'homme et d'autres espèces de vertébrés ainsi que leur traduction,
  - IMGT/PRIMER-DB, qui contient les séquences nucléotidiques utilisées comme amorces ou *primers*,
  - IMGT/CLL-DB, qui contient les séquences immunoglobulines de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC);
- les outils :
  - IMGT/V-QUEST,
  - IMGT/JunctionAnalysis,
  - IMGT/HighV-QUEST pour l'analyse des séquences IG et TR issues du séquençage haut débit.

## Approche structurale

L'approche structurale inclut l'étude des structures 3D et des interactions protéiques en relation avec les fonctions, les polymorphismes et l'évolution des domaines. Elle utilise IMGT/3Dstructure-DB, la base 3D d'IMGT® et IMGT/2Dstructure-DB, la base de séquences protéiques, ainsi que les outils tels que IMGT/DomainGapAlign et IMGT/Collier-de-Perles.

## IMGT/mAb-DB

IMGT® comprend également IMGT/mAb-DB, la base de données spécialisée pour les anticorps monoclonaux thérapeutiques. Cette base de données est développée en collaboration avec le programme *International Nonproprietary Name* (INN) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) qui assigne leur dénomination commune internationale (DCI) aux médicaments. IMGT/mAb-DB contient

les anticorps monoclonaux (suffixe INN -mab), les protéines de fusion à visée thérapeutique (*fusion proteins for immune applications* ou FPIA, suffixe INN-cept), ainsi que des protéines composites à visée clinique (*composite proteins for clinical applications* ou CPCA). IMGT/mAb-DB donne accès aux séquences protéiques d'IMGT/2Dstructure-DB et aux structures 3D d'IMGT/3Dstructure-DB.

## IMGT-ONTOLOGY

IMGT-ONTOLOGY permet la gestion standardisée des connaissances en immunogénétique grâce à ses principaux concepts d'identification (mots clés standardisés IMGT®), de classification (nomenclature des gènes et allèles IMGT®), de description (labels IMGT®) et de numérotation (numérotation unique IMGT et IMGT Collier de Perles).

Les concepts d'IMGT-ONTOLOGY, élaborés à l'origine pour les immunoglobulines et les récepteurs T (TR), ont été étendus comme le système d'information IMGT® aux autres molécules du système immunitaire. Une protéine appartient à la superfamille des immunoglobulines (IgSF) si elle possède au moins un domaine variable V et/ou un domaine constant (C). Une protéine appartient à la superfamille des molécules d'histocompatibilité (MhSF) si elle possède deux domaines *groove G* (terme anglais qui désigne le sillon où se loge le peptide). Les concepts d'IMGT-ONTOLOGY sont illustrés ici en prenant comme exemple le domaine V.

## Identification

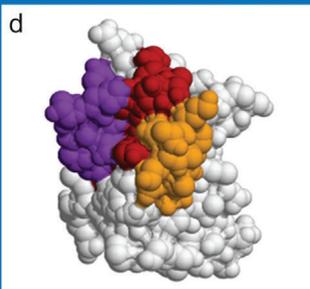
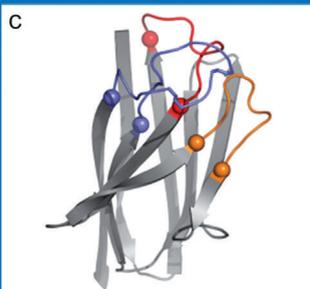
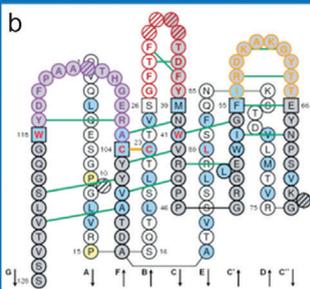
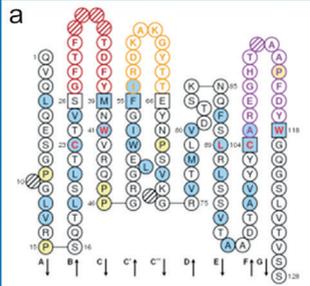
Les concepts d'identification d'IMGT-ONTOLOGY permettent d'identifier une séquence ou une structure à l'aide de mots clés standardisés, l'objectif étant de pouvoir fournir une définition. Par exemple, un domaine V (fig. 14.3) est constitué d'environ 100 acides aminés, formant neuf brins bêta antiparallèles (A, B, C, C', C'', D, E, F, G) disposés sur deux plans ou feuilletts [ABED] [GFCC'C''] maintenus par un

## DES SÉQUENCES AUX STRUCTURES 3D

>CAMPATH-1H|1bey\_H|VH-CH1|219 AA|23397.2  
MW|VH+CH1

```

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGFTFTDFYMNWVRQ
PPGRGLEWIGFIRDKAKGYTT
EYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAR
EGHTAAPFDYWGGQSLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHFTPAVLQS
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVKV
  
```



**Fig. 14.3** Des séquences aux structures 3D (a à d) et réciproquement des structures aux séquences (d à a).

La numérotation unique IMGT permet de représenter, de manière standardisée, la séquence en acides aminés d'un domaine variable V d'anticorps sous forme d'un IMGT Collier de Perles sur un plan (a) ou sur deux plans (b). Les AA hydrophobes conservés dans plus de 50 % des séquences sont en bleu et les Prolines P en jaune, en ligne sur le site Internet IMGT® ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)). Les brins antiparallèles (A à G) constituent les FR-IMGT. Les trois boucles correspondent aux 3 CDR-IMGT de longueur [8.10.12], chacun délimité par ses deux ancres (représentées dans des carrés). Les cinq AA conservés sont indiqués en rouge sur le site : 23 (1st-CYS), W41, hydrophobe 89, 104 (2nd-CYS), 118 (ici W, pour J-TRP). En (b), les traits (verts, en ligne) représentent les liaisons hydrogène lorsque la structure 3D est disponible dans IMGT/3Dstructure-DB. (c) Visualisation d'un domaine V avec les brins bêta antiparallèles des FR-IMGT (flèches grises) formant deux plans ou feuillet, et supportant les trois boucles des CDR-IMGT (en couleurs, en ligne : [www.imgt.org](http://www.imgt.org)). (d) Représentation compacte (*spacefill*) d'un domaine V. Les CDR-IMGT sont visualisés en couleurs en ligne ([www.imgt.org](http://www.imgt.org)), par exemple pour un VH, CDR1-IMGT (rouge), CDR2-IMGT (orange) et CDR3-IMGT (violet). Les CDR-IMGT confèrent la spécificité d'un anticorps et ce sont ces trois régions qui sont greffées lors de l'humanisation d'un anticorps.

Source : IMGT® ([www.imgt.org](http://www.imgt.org))

pont disulfure entre les feuillets B et F, et supportant trois boucles BC', C'C'' et FG. Dans le cas des IG et des TR, le domaine V résulte des réarrangements de trois gènes V, D et J pour le domaine VH des chaînes lourdes ou de deux gènes V et J pour le domaine VL des chaînes légères kappa ou lambda (voir fig. 14.1).

## Classification

Les concepts de classification d'IMGT-ONTOLOGY permettent une nomenclature standardisée des noms de gènes et allèles des IG et TR (e.g. *Homo sapiens* IGHV1-2\*01, *Homo sapiens* IGHG1\*02, *Homo sapiens* TRBJ1-1\*01)<sup>19</sup>.

## Description

Les concepts de description d'IMGT-ONTOLOGY permettent de décrire précisément une séquence ou une structure à l'aide de labels repérables en majuscules. Ces labels permettent d'interroger les bases de données et sont utilisés dans les outils informatiques d'analyse de séquences ou de structures. Ainsi, «V-D-J-REGION» et «V-J-REGION» sont les labels qui décrivent les V-DOMAIN (domaines V des IG et TR). Les labels FR-IMGT (pour *Framework Region* ou charpente) et CDR-IMGT (pour *Complementarity Determining Regions*, région complémentaire à l'antigène ou hypervariable) sont également propres au V-DOMAIN. Les labels FR-IMGT définissent quatre régions de la charpente formée

par les brins antiparallèles, FR1-IMGT (brins A et B), FR2-IMGT (brins C et C'), FR3-IMGT (brins C'', D, E et F) et FR4-IMGT (brin G). Les labels CDR-IMGT définissent les trois régions en contact avec l'antigène qui confèrent la spécificité des récepteurs d'antigènes, CDR1-IMGT (boucle BC'), CDR2-IMGT (boucle C'C'') et CDR3-IMGT (boucle FG). Le CDR3-IMGT qui résulte de la jonction V-(D)-J est le plus diversifié en termes de séquences et longueurs.

## Numérotation

Les concepts de numérotation d'IMGT-ONTOLOGY permettent d'établir une numérotation unique pour des positions conservées dans une séquence ou une structure et de la représenter graphiquement sous forme d'IMGT Colliers de Perles (voir fig. 14.3). La numérotation unique IMGT permet de décrire les séquences et structures des domaines V, quels que soient le type de récepteurs (IG et TR), le type de chaînes (lourde, légère kappa ou lambda des IG, alpha, bêta, gamma ou delta des TR) ou l'espèce (du poisson à l'homme).

## Exemples d'outils IMGT®

### IMGT/V-QUEST

IMGT/V-QUEST analyse les séquences nucléotidiques des domaines V des immunoglobulines et des récepteurs T. Il identifie les gènes et allèles V, D et J *germline* les plus proches, en alignant les séquences à analyser avec les séquences nucléotidiques des gènes et allèles *germline* des IG et TR des répertoires de référence, et évalue la fonctionnalité (productive ou non productive) des séquences réarrangées. IMGT/V-QUEST identifie les mutations dans la région V et les caractérise selon leur type. Il peut s'agir de transitions (modification d'une purine en purine, ou d'une pyrimidine en pyrimidine), de transversions (changement d'une purine en pyrimidine ou d'une pyrimidine en purine), de mutations silencieuses ou non silencieuses liées au remplacement d'un acide aminé par un autre.

<sup>19</sup> La nomenclature IMGT® des gènes V, D, J et C des immunoglobulines (IG) et des récepteurs T (TR) a été approuvée en 1999 par le *Human Genome Organisation* (HUGO) *Gene Nomenclature Committee* (HGNC) et a été adoptée par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). IMGT® est membre du comité de nomenclature du *World Health Organization/International Union of Immunological Societies* (WHO/IUIS) pour les IG et TR de toutes les espèces de vertébrés et IMGT/GENE-DB est la référence internationale pour les gènes et allèles des IG et TR dont la nomenclature a été approuvée. Les noms des gènes et allèles IMGT® sont utilisés dans les définitions INN des anticorps thérapeutiques.

IMGT/V-QUEST fournit aussi une analyse détaillée et standardisée des jonctions V-(D)-J des domaines V des immunoglobulines et des récepteurs T, grâce à l'outil IMGT/JunctionAnalysis qui y est intégré. La JUNCTION comprend le CDR3-IMGT avec ses deux ancres 104 (2nd-CYS) et 118 (J-PHE or J-TRP). IMGT/JunctionAnalysis identifie le gène D pour les domaines V des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGH) et des chaînes bêta (TRB) et delta (TRD) des récepteurs T.

## IMGT/HighV-QUEST

IMGT/HighV-QUEST est la version haut-débit d'IMGT/V-QUEST qui permet d'analyser des lots contenant jusqu'à 500 000 séquences d'immunoglobulines et de récepteurs T obtenues par les méthodes de séquençage en *Next Generation Sequencing* (NGS). IMGT/HighV-QUEST analyse les longues séquences (*e.g.*, celles issues du 454 Life Science®). Les analyses statistiques effectuées par IMGT/HighV-QUEST sur les résultats d'un lot de 500 000 correspondent à plus de  $2.10^8$  données, chaque séquence ayant en moyenne 530 colonnes de résultats.

## IMGT/DomainGapAlign

IMGT/DomainGapAlign permet l'analyse de séquences protéiques des domaines V ou C (IG, TR et autres protéines IgSF) ainsi que des domaines G (MH et autres protéines MhSF). Il aligne les séquences à analyser avec les séquences de référence, selon la numérotation unique IMGT et délimite les différentes régions (brins bêta, boucles et, pour le domaine G, hélice alpha). Dans le cas des domaines V des IG et TR, il identifie les gènes et allèles V et J *germline* les plus proches, les FR-IMGT et les CDR-IMGT. Il permet de visualiser les changements d'acides aminés.

## IMGT/Collier-de-Perles

L'outil IMGT/Collier-de-Perles permet de générer automatiquement l'IMGT Collier de Perles

des domaines V, C ou G. La séquence protéique à représenter doit au préalable être « gappée » selon la numérotation unique IMGT, manuellement ou le plus souvent grâce à l'outil IMGT/DomainGapAlign.

IMGT/Collier-de-Perles est intégré dans IMGT/V-QUEST et dans IMGT/DomainGapAlign, ce qui permet la représentation des domaines, respectivement, à partir de séquences nucléotidiques et de séquences protéiques. Dans la version intégrée d'IMGT/DomainGapAlign, l'outil IMGT/Collier-de-Perles visualise les changements d'acides aminés (bord rose, en ligne), par rapport à la séquence de référence.

## IMGT/3Dstructure-DB

IMGT/3Dstructure-DB est la base de structures 3D d'IMGT®. Elle contient les structures 3D des IG, TR et MH, ainsi que d'autres protéines IgSF et MhSF. Elle fournit des informations détaillées sur les chaînes protéiques et leurs domaines. Elle est la seule base qui fournit les noms des gènes et allèles des structures 3D des immunoglobulines et des récepteurs T. Les liaisons hydrogène des domaines V et C sont visualisées dans les IMGT Collier de Perles sur 2 plans (voir [fig. 14.3](#)). IMGT/3Dstructure-DB décrit de manière détaillée les interactions entre les acides aminés des domaines des immunoglobulines et des récepteurs T en contact avec l'antigène (ces acides aminés constituent le paratope) et les déterminants de l'antigène (qui constituent l'épitope) dans les complexes IG/Ag et TR/pMH<sup>20</sup>.

<sup>20</sup> L'épitope reconnu par une IG est porté par une molécule native (antigène Ag). L'épitope reconnu par un TR est porté par le complexe peptide présenté par le MH (antigène pMH). Le peptide est logé dans le sillon formé par les deux G domaines. Le MH peut être de classe I (MH1) (les deux domaines G appartiennent à la même chaîne I-ALPHA) ou de classe II (MH2) (les deux domaines G appartiennent à deux chaînes différentes, II-ALPHA et II-BÊTA). La requête dans IMGT/3Dstructure-DB peut se faire sur IG/Ag, TR/pMH1 et TR/pMH2.

## Exemples d'applications (tableau 14.1)

IMGT/V-QUEST est très utilisé pour l'analyse des séquences réarrangées des immunoglobulines et des récepteurs T (jusqu'à 50 séquences en ligne). C'est l'outil de référence pour l'analyse des mutations somatiques dans les leucémies lymphoïdes chroniques et la caractérisation de la clonalité dans les leucémies et lymphomes.

IMGT/HighV-QUEST permet l'analyse des répertoires d'anticorps ou de récepteurs T dans les réponses immunitaires en situation normale (vaccination) ou pathologique (infections, maladies autoimmunes ou cancer) ou encore l'analyse de la diversité et de l'expression des clonotypes pour les séquences NGS.

IMGT/DomainGapAlign est très utilisé pour délimiter les CDR-IMGT à greffer et pour définir les FR-IMGT à utiliser dans les expériences d'humanisation des anticorps thérapeutiques. En effet, quand un anticorps murin est injecté chez un patient, une réponse immunitaire se produit, ce qui a pour conséquence de réduire considérablement son efficacité et d'empêcher son utilisation en thérapie. L'humanisation consiste à greffer, au niveau de l'ADN, les CDR-IMGT de souris (ou d'une autre espèce), conférant la spécificité de l'anticorps, aux FR-IMGT d'un anticorps humain pour ainsi obtenir un anticorps dont le potentiel immunogène est considérablement réduit.

**Tableau 14.1 Fonctionnalités d'outils IMGT® et de la base de données IMGT/3D structure-DB**

Outils IMGT® et base de données IMGT/3Dstructure-DB	Fonctionnalités
IMGT/V-QUEST	Analyse des séquences nucléotidiques des domaines V des immunoglobulines et des récepteurs T : 1. identification des gènes et allèles V, D et J <i>germline</i> les plus proches 2. analyse des mutations 3. analyse de la jonction V-(D)-J par IMGT/JunctionAnalysis 4. IMGT Collier de Perles
IMGT/HighV-QUEST	Version haut débit d'IMGT/V-QUEST : 1. jusqu'à 500 000 séquences pour la soumission (longues séquences, <i>e.g.</i> , issues du 454 Life Sciences®) 2. analyse statistique des résultats jusqu'à 500 000 résultats de séquences (plus de 2.10 <sup>9</sup> données à analyser)
IMGT/DomainGapAlign	Analyse des séquences protéiques des domaines V et C (IG, TR et autres protéines IgSF) et des domaines G (MH et autres protéines MhSF) : 1. identification des gènes et allèles les plus proches (gènes et allèles V et J <i>germline</i> pour les domaines V des IG et TR) 2. délimitation des brins bêta et des boucles des domaines V et C et, pour les domaines G, des hélices alpha (délimitation des FR-IMGT et CDR-IMGT pour les domaines V des IG et TR) 3. visualisation des changements d'acides aminés
IMGT/Collier-de-Perles	Représentation graphique automatique d'IMGT Colliers de Perles, à partir de séquences protéiques gappées selon la numérotation unique IMGT : 1. représentation sur un plan et sur deux plans des domaines V ou C 2. représentation des domaines G
IMGT/3Dstructure-DB	Base de structures 3D d'IMGT® : 1. détermination des noms de gènes et allèles des chaînes IG et TR des structures 3D 2. IMGT Colliers de Perles avec liaisons hydrogène 3. analyse des contacts dans les interactions protéine-protéine 4. définition du paratope et de l'épitope dans les complexes IG/Ag et TR/pMH

# Index

## A

Activité, 157  
– succinate déshydrogénase, 119  
Adhérence immune/*panning*, 111, 163  
Adhésion cellulaire, 140, 161  
Affinité, 3, 10, 16, 158  
Agglutination, 13, 26, 35, 37, 195  
Allèle, 203  
Allergène, 139, 151  
Allo-anticorps, 200  
Amplification, 42, 75, 109, 189  
Analyse en composante principale, 63  
Anaphylatoxine, 161  
Angioedème, 162  
Anticorps, 1, 10, 193  
– monoclonal, 15, 110, 112  
– – thérapeutique, 206  
– polyclonal, 15  
Antigène, 1, 3, 9, 11, 13, 15, 116, 151, 195  
Antigénicité, 9  
Apoptose, 110, 120, 122, 126, 127  
Auto-anticorps, 196  
Autophagie, 130, 133

## B

Bactéricidie, XI, 135  
Balayage, 107  
Basophile, 110, 138, 161  
Biologie moléculaire, 75–104, 187  
Biothérapie, 111, 117, 185  
Bruit de fond, 119

## C

Caspase, 122, 126, 127, 179  
Cellule, 179  
– cytotoxique, 4  
– dendritique, 2, 4, 114, 117, 151  
– formant des colonies (*Colony Forming Units*), 135  
– formant des spots (*Spot Forming Cells*), 73  
– mononucléée, 115, 128  
– présentatrice, 2  
– rare, 109  
– suppressive, 130  
Chambre de Boyden, 142

Chimérisme, 79, 113, 189  
Chimiokine, 139, 179, 181  
Chimioluminescence, 137  
Chimiotactisme, 38, 142, 163  
<sup>51</sup>Chrome, 121, 122  
Chromogène, 41, 44  
Clonage, 114  
Clonalité, XI, 82, 167, 210  
Co-culture, 114, 128  
Complément, 157  
Complexe  
– immun, 13, 39  
– majeur d'histocompatibilité, 9, 187  
Composant, 158  
Compteur  
– à scintillation, 117  
– gamma ou bêta, 121  
Contraste interférentiel en réflexion, 142  
Convertase, 158  
*Cross-match* lymphocytaire, 189  
Cryoglobuline, 158  
Cryomicrotome/cryostat, 67  
Cryoprotecteur, 67, 116  
Culture, 5  
– cellulaire, 114, 120, 185  
– mixte, 116  
Cytocentrifugat/cytospin, 107, 108  
Cytokine, 2, 115, 128, 133, 179–186, 139, 183, 184  
Cytomètre en flux, 5, 108, 128  
Cytométrie en flux, 60, 113, 124, 131, 133, 137, 138, 160  
Cytotoxicité, XI, 110, 115, 120  
– dépendante du complément, 39

## D

Déficit immunitaire, 110, 116, 120, 127, 138  
Dégranulation, 138  
Désorption laser assistée par matrice/MALDI, 96  
Dilution limite, 122

## E

Électronébulisation, 96  
Électrophorèse, 55, 76, 95, 96, 126  
ELISA, 46, 126, 174, 182

ELISpot, 72, 121, 122, 183, 185  
 Élutriation, 110, 113  
 Enzyme, 41, 108, 157  
 Épitope, 10, 120, 134

## F

Ficoll®, 110, 188  
 Fixation chimique, 66  
 FLISA, 46  
 Fluorochrome, 43, 46, 65, 108, 109, 190  
 Forme réactive de l'oxygène, 135, 136

## G

Gammapathie monoclonale, 167  
 Génotypage, 79, 201  
 Gradient de densité, 110, 111, 113  
 Granulocyte (ou « polynucléaire »), 110  
 Groupe sanguin, 195

## H

Haptène, 10  
 Hémagglutination, 38, 199  
 Hématimètre, 106  
 Hémolyse, 157  
 Histoprotéomie, 99  
 Hybridation, 69, 75, 86, 112, 183  
 – *in situ* en fluorescence, 69, 112, 183  
 Hybridome, 19, 116  
 Hypersensibilité, 120, 140, 151, 153

## I

IFN, 4  
 IG, 203  
 Imagerie moléculaire, 99  
 Imageur en flux, 65  
 IMGT, 203  
 Immuno-adhérence, 200  
 Immuno-analyse, 183  
 Immunoblot, 176  
 Immunochromatographie, 176  
 Immunodiffusion, 25  
 – double, 28  
 – radiale, 158  
 Immunodosage multiplex sur billes, 53  
 Immunodot/*dot-blot*, 55  
 Immuno-électrophorèse, 160  
 Immuno-empreinte/western-blot, 56, 126, 167, 169  
 Immunofixation, 28, 162, 174  
 Immunofluorescence, 108, 119, 174  
 Immunogénétique, 187  
 Immunogénicité, 9  
 Immunoglobuline, 1, 10, 15, 19, 191  
 Immuno-hématologie, 195–202

Immunohistologie, 66  
 Immunoinformatique, 203–210  
 Immunomarquage, 68, 194  
 Immuno-PCR, 79  
 Immunophénotypage, 108, 109, 117  
 Immunoprécipitation, 19, 25, 52, 172  
 Immunosoustraction, 167  
*Inbred*, 147  
 Indice de phagocytose, 131  
 Infection VIH, 175  
 Inflammation, 38, 134, 183  
 Interférence d'ARN, 95  
 Interféron, 134, 186  
 Intradermoréaction, 152

## K

Kininoformation, 163

## L

Laser, 43  
 Leucocyte, 36, 187  
 Ligand, XI, 31, 34, 161  
 Lignée, 21, 22, 181  
 – cellulaire, 114, 115, 116  
 – de souris, 146  
 Lymphocyte, 1, 3, 110, 182  
 – B, 2  
 – T, 2, 112, 117, 118, 138  
 – – cytotoxique, 120, 127  
 – – régulateur, 4, 114

## M

Mastocyte, 138, 151, 161  
 Méthode TUNEL, 127  
 MH, 203  
 Microsatellite, 91, 189  
 Microscope, 107  
 Microscopie, 131, 133, 182  
 – de contraste interférentiel en réflexion, 143  
 – électronique  
 – – à balayage, 107  
 – – à transmission, 107  
 Microtome, 67  
 Migration cellulaire, XI, 140  
 Mitogène, 116, 182  
 Modèle  
 – animal, 117, 120, 145  
 – murin, 145  
 Monocyte/macrophage, 110, 111, 187  
 Mutation, 83

## N

Néphélométrie, 158  
*Next Generation Sequencing*, 209

**O**

Opsonisation, 131, 161  
*Outbred*, 146

**P**

Paratope, 9, 10, 15, 16, 209  
 Patch-test, 151, 152  
 Phagocyte, 5, 131, 132, 136  
 Phagocytose, XI, 110, 130, 135, 160  
 Photodétecteur/photomultiplicateur, 62  
 Polymorphisme, 79, 91, 165  
 Polynucléaire, 138  
 Population, 189  
 – clonale, 82  
 Précipitation, 13, 19, 22, 28, 158  
 Prick-test, 151, 152  
 Profil, 182  
 – d'expression génique, 86  
 Prolifération, XI, 115, 118, 120, 191  
 – cellulaire, 66, 110, 117  
 Protéine Ki67, 119  
 Protéome, 95  
 Protéomique, 95  
 Puce  
 – à ADN (*DNA microarrays*), 85  
 – à anticorps (*antibody array*), 59  
 – à protéines (*protein arrays*), 58  
 – tissulaire (*Tissue MicroArray*), 69

**Q**

*Quenching*, 131

**R**

Réaction  
 – croisée, 19, 153, 188  
 – de fixation du complément, 39  
 – de polymérisation en chaîne, 75  
 – – quantitative en temps réel, 90  
 Réarrangement, 82, 192  
 Récepteur, 1, 9, 10, 75, 161  
 – pour l'antigène, 120  
 – T, 203  
 Répertoire, 82, 191  
 RIA, 51  
 Rosette, 112, 113

**S**

Sensibilité, 4, 5, 18, 122, 158  
 Signal, 109

Sonde, 54, 79, 90, 188

Souris  
 – cKO, 150  
 – KI, 150  
 – KO, 150  
 Spécificité, 4, 15, 16, 19, 25, 113, 170  
 Spectrométrie de masse, 95, 201  
 Spectrophotomètre, 41, 47  
 Structure tridimensionnelle, 203  
 Suppression cellulaire, 115, 127  
 Syndrome lymphoprolifératif, 127, 173  
 Système  
 – ABO, 196  
 – Rhésus, 196

**T**

Test  
 – cutané, 151  
 – de Coombs, 199  
 – – direct, 200  
 – – indirect, 200  
 – en dilution limite, 121  
 – épicutané/patch-test, 151  
 – fonctionnel, 112  
 Tétramère, 121, 122, 189  
 Thymidine tritiée, 117, 119, 128  
 TNF, 4, 179  
 TR, 203  
 Traceur, 25–40  
 – enzymatique/enzyme, 183  
 – fluorescent, 183  
 Transcription inverse (*reverse transcription*), 77, 191  
 Transcriptome, 90, 183  
 Transcrit, 90, 183, 191  
 Transfection, 93  
 Transfusion, 189, 195  
 Transgénèse, 147, 148, 149  
 Transplantation d'organes/greffe, 187, 189  
 Tri cellulaire, 65, 110, 112, 113, 128  
 Trieur de cellules/FACS, 65, 110, 113  
 Tumeur/tumoral, 68, 114, 127, 193  
 Turbidimétrie, 158  
 Typage du *HLA*, 188

**V**

Vaccin, 11  
 Vaccination, 11, 153, 210  
 Vidéomicroscopie, 131, 133, 142