

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

Cours de:

Immunologie Appliquée

Cours destiné aux étudiants de:

Licence Biotechnologie et santé

Préparé par Dr. BOUDOUKHA Chahra

Année universitaire : 2023-2024



Sommaire

1. Introduction	3
2. Rappels	4
2.1. Définition et rôle de système immunitaire	4
2.2. Immunité innée	4
2.3. Immunité adaptative	4
2.4. Cellules effectrices et régulatrices de l'immunité	5
2.2.1. Les organes du système immunitaire	8
3. Hématopoïèse	9
3.1. Définition	9
3.2. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques	9
3.2.1. Totipotence	9
3.2.2. Auto renouvellement	9
3.2.3. Différenciation	10
3.3. Etapes de l'hématopoïèse	10
3.4. Régulation de l'hématopoïèse	11
3.4.1. Facteurs de croissance	12
3.4.2. Facteurs de régulation négative	14
3.5. Utilisations thérapeutiques des cellules souches hématopoïétiques	15
3.5.1. Différentes formes de greffes CSH	15
4. Cytokines	20
4.1. Généralités	20
4.2. Caractéristiques des cytokines	20
4.3. Hormones et cytokines	22
4.4. Récepteurs des cytokines	22
4.4.1. Composition multimérique des Rc des cytokines	23
4.4.2. Classification des Récepteurs des cytokines	24
4.4.3. Formes solubles des récepteurs	25
4.5. Mode d'action des cytokines	26
4.6. Régulation de la synthèse et de l'action des cytokines	27
4.7. Méthodes de dosage des cytokines	27
4.7.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sandwich	28
4.7.2. Cytométrie en flux utilisant des billes	28

4.8. Rôle des cytokines en pathologie	28
4.8.1. L'exemple des maladies auto-immunes	29
4.8.2. L'exemple des maladies néoplasiques	30
4.8.3. Stratégies thérapeutiques anti-IL-6 dans les cancers	30
5. Modèles immuno-pathologiques	31
5.1. Pathologies inflammatoires chroniques	31
5.1.1. Types de l'inflammation	31
5.2. La maladie de Crohn	32
5.2.1. Définition	32
5.2.2. Diagnostic	34
5.2.3. Physiopathologie de la maladie de Crohn	37
5.3. Polyarthrite rhumatoïde	41
5.3.1. Définition	41
5.3.2. Diagnostic	42
6. Techniques immunologiques	44
6.1. Production des Ac monoclonaux	45
6.1.1. Obtention et sélection des hybridomes	45
7. Techniques d'immuno-dosages	47
7.1. Immuno-doasage sans marqueur	47
7.1.1. Techniques d'immunoprécipitation	47
7.2. Immuno-doasage avec marqueur	54
7.2.1. Dosages immuno-enzymatiques (ELISA)	54
7.2.2. Dosages immuno-fluorescents (FLISA)	56
7.2.3. Dosages radioimmunologiques (RIA)	57

1. Introduction

L'immunologie est désormais une discipline médicale majeure au même titre que la microbiologie ou l'hématologie qui l'ont longtemps hébergée. Cette promotion est justifiée par la place croissante occupée par les concepts et les techniques de l'immunologie dans les sciences biologiques et dans tous les secteurs de la médecine. Il est peu (ou pas) d'organes qui ne puissent être la cible d'une agression immunitaire ; la plupart des maladies infectieuses sont associées à des événements immunologiques qui favorisent, compliquent ou heureusement plus souvent freinent l'évolution de l'infection. Les rejets des greffes et peut-être des tumeurs relèvent essentiellement de phénomènes immunologiques. Enfin, l'immunologie est à l'origine de la découverte de nouveaux médicaments chimiques ou biologiques, qui peuvent transformer l'évolution de très nombreuses maladies.

Cet ouvrage est destiné à présenter de façon simple, directe et largement illustrée, les principales connaissances modernes de l'immunologie appliquée et de l'immunopathologie. Il s'adresse en premier lieu aux étudiants de troisième année licence en Biotechnologie et Santé qui y trouveront les éléments de leur programme d'immunologie appliquée. Le polycopié est organisé sous forme de chapitres, présentés de façon délibérément succincte et bien illustrés par des schémas et des exemples.

2. Rappels

2.1. Définition et rôle de système immunitaire

Le système immunitaire est l'ensemble des cellules, des tissus et des molécules qui concourent à opposer une résistance aux infections. La défense de l'hôte nécessite différents systèmes de reconnaissances et une grande variété de mécanismes effecteurs pour détecter et détruire le non soi et le soi altéré dans les diverses régions de l'organisme, donc ce système peut discriminer une grande variété d'antigènes du soi et du non soi. Chez les organismes supérieurs, on distinguait jusqu'à récemment deux grands systèmes de défense, ceux-ci sont immédiate est donc limitée dans le temps et n'a pas de mémoire. De plus, l'immunité innée peut activer un système immunitaire dit adaptatif via les cellules présentatrices de l'antigène.

2.2. Immunité innée

L'immunité innée met en jeu des barrières anatomiques (peau, muqueuses) et les acteurs de la réaction inflammatoire (cellules phagocytaires, cytokines, protéines du complément, récepteurs Toll-like). Ces barrières ne comprenaient pas seulement des cellules à la surface mais aussi des composants solubles, tels que des enzymes, peptides antimicrobiennes.

Le système immunitaire inné joue principalement trois fonctions : c'est la première réponse face à l'invasion des microbes ; il prévient, contrôle ou élimine l'infection de l'hôte par de nombreux agents pathogènes. S'il échoue, il initie la réponse adaptative et peut l'influencer pour la rendre la plus optimale possible face au pathogène engagé dans l'infection, il reconnaît les produits de dommage et de mort cellulaires. Il doit éliminer ces cellules et initier les réparations tissulaires (fig.1).

2.3. Immunité adaptative

L'immunité adaptative constitue la deuxième ligne de défense. Elle est déclenchée par les antigènes et conduit à l'activation sélective des lymphocytes B et T spécifiques des antigènes auxquels les individus sont exposés, ce qui induit une protection dont le mécanisme est à la base des vaccinations. Contrairement à la réponse immunitaire innée, l'immunité adaptative implique le développement de la mémoire immunologique.

Immunité innée

Immunité adaptative

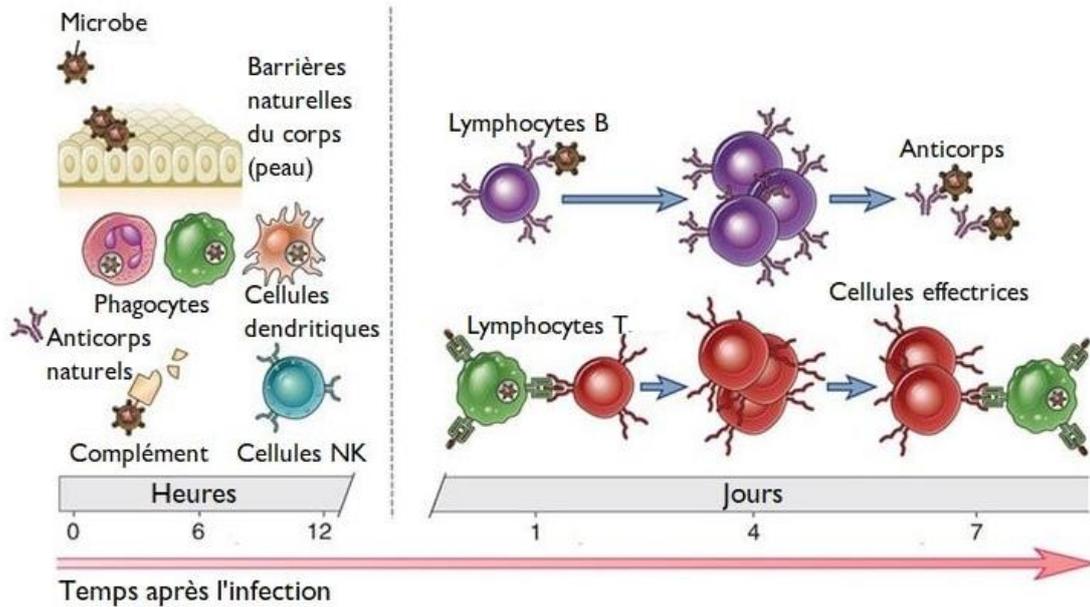


Figure 1: Illustration de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. A gauche, l'immunité innée prenant exemple sur les barrières naturelles du corps comme la peau et les cellules épithéliales, les anticorps naturels et les cellules NK pour natural killer (tueuses naturelles). A droite, l'immunité adaptative, avec l'action des lymphocytes B et T, et des cellules effectrices.

Il existe deux types d'immunité adaptative, appelés immunité humorale et immunité cellulaire (Fig. 2), qui font intervenir différentes cellules et molécules, et sont destinés à opposer une défense respectivement aux microbes extracellulaires et intracellulaire. Les cellules de système immunitaire adaptatif comprennent les effecteurs des réponses immunitaires cellulaires, les lymphocytes T, qui mûrissent dans le thymus, et les cellules productrices d'anticorps, les lymphocytes B, qui surviennent dans la moelle osseuse.

2.4. Cellules effectrices et régulatrices de l'immunité

Les cellules immunitaires sont des globules blancs dérivés de la moelle osseuse qui ont des fonctions spécialisées et peuvent être fonctionnellement classées en trois groupes principaux :

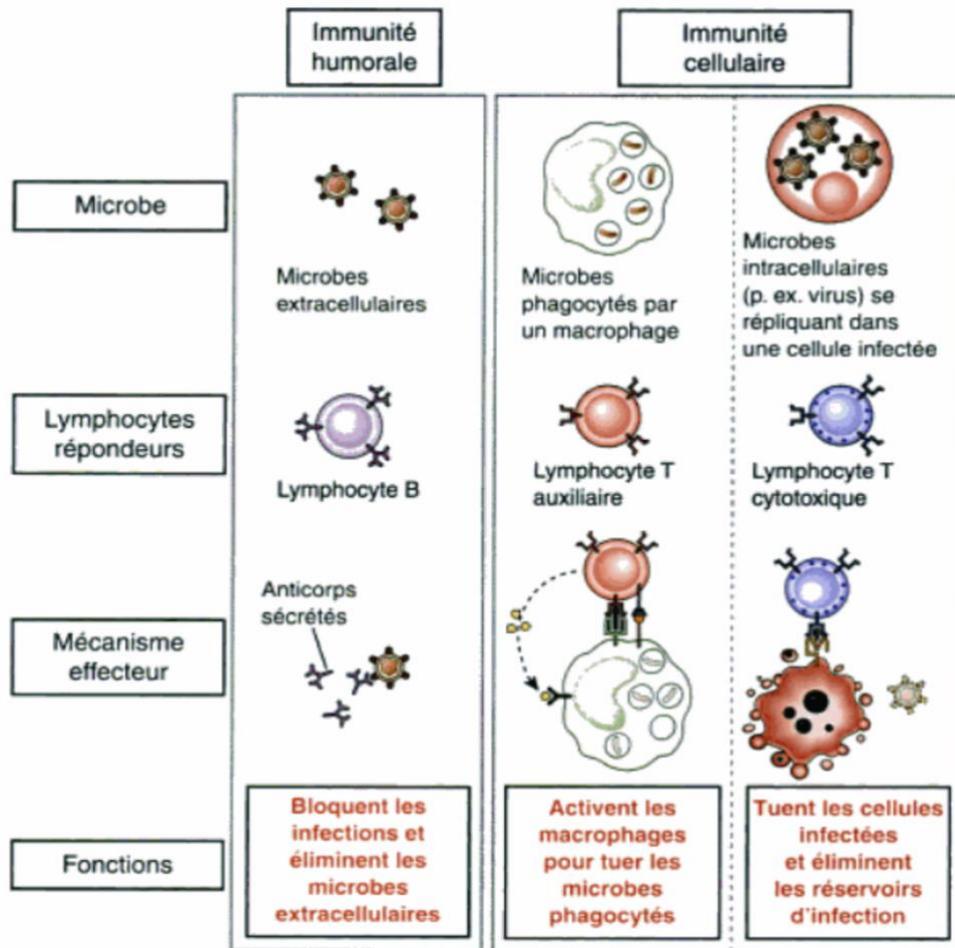
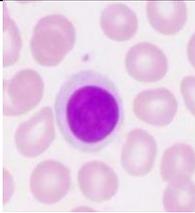
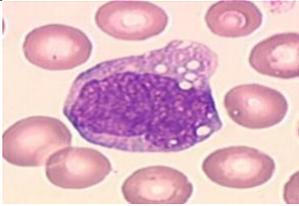
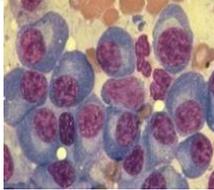
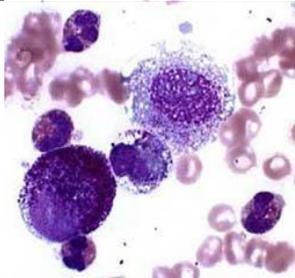


Figure 2: Types d'immunité adaptative. Dans l'immunité humorale, les lymphocytes B sécrètent des anticorps qui éliminent les microbes extracellulaires. Dans l'immunité cellulaire, les lymphocytes T soit activent les macrophages qui détruisent les microbes phagocytés, soit tuent les cellules infectées.

- Lymphocytes (LT et LB) responsables de la médiation des réponses immunitaires adaptatives.
- Les cellules présentatrices des antigènes (CPA), y compris les macrophages et les cellules dendritiques (CD). Leur fonction est de capturer, traiter et présenter les antigènes aux lymphocytes.
- Les cellules tueuses, y compris les tueuses naturelles (NK), les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) qui tuent les agents pathogènes envahissant (tableau 1).

Tableau1 : Principales cellules du système immunitaire.

Leucocyte	Photographie	Diamètre moyen	Rôles principaux
Cellule dendritique		Variable	<ul style="list-style-type: none"> - Phagocytose - Cellule présentatrice de l'antigène - Sécrétion de médiateurs chimiques de l'inflammation
Granulocyte		12 à 14 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule au noyau à plusieurs lobes - Phagocytose - Sécrétion de médiateurs chimiques de l'inflammation
Lymphocyte		6 à 10 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule avec un gros noyau - 2 types : Lymphocytes T et B - Réponse immunitaire adaptative (production d'anticorps & destruction des cellules infectées)
Monocyte		12 à 20 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Cellules au noyau à un seul lobe. - Présents dans le sang -Peuvent traverser la paroi des vaisseaux et se transformer en macrophage
Macrophage		14 à 21 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Proviennent des monocytes sanguins, - Phagocytose - Sécrétion de médiateurs chimiques de l'inflammation.
Mastocyte		8 à 20 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule contenant de nombreux granules sombre - Sécrétion d'histamine et de prostaglandines
Plasmocyte		8 à 20 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Cellule sécrétrice d'anticorps (issu d'un lymphocyte B)

2.2.1. Les organes du système immunitaire

Le système immunitaire est composé d'organes et de tissus dits lymphoïdes dévolus à la production de lymphocytes et aux fonctions immunitaires, ils sont connectés par les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il comprend des organes lymphoïdes primaires et secondaires (Fig. 3). Les organes lymphoïdes primaires produisent les constituants cellulaires du système immunitaire. Ce sont la moelle osseuse et le thymus. Les organes lymphoïdes secondaires sont les sites où se déroulent les réactions immunitaires. Ils incluent les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales et les agrégats de lymphocytes et de CPA situés au niveau de poumon et de muqueuse du tube digestif (plaques de Peyer)

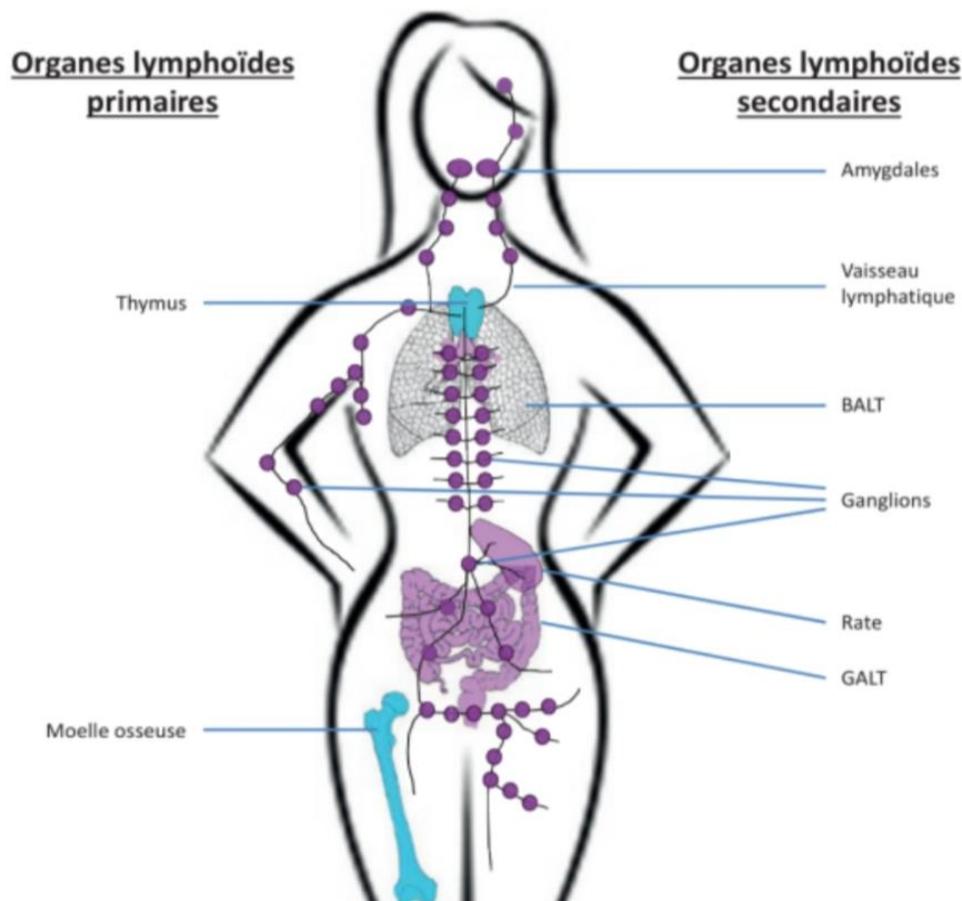


Figure 3 : Localisation des organes lymphoïdes primaires et secondaires. Ce schéma précise la position anatomique à gauche des organes lymphoïdes primaires, et à droite des organes lymphoïdes secondaires, y compris le tissu lymphoïde associé aux muqueuses. Ceux-ci sont connectés grâce à un réseau de vaisseaux lymphatiques. BALT : Bronchus Associated Lymphoid Tissue. GALT : Gut Associated Lymphoid tissue.

3. Hématopoïèse

3.1. Définition

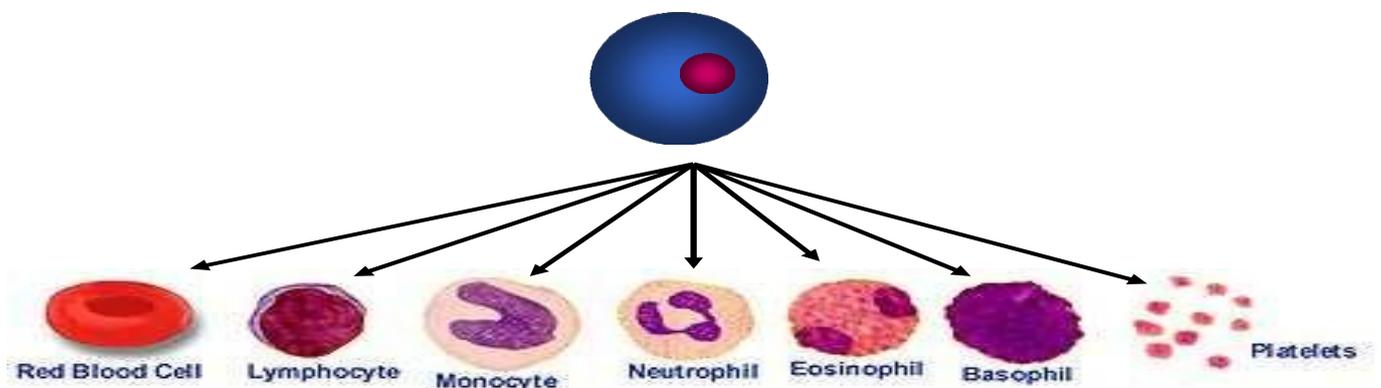
Hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont localisées dans la moelle osseuse (+/- sang) Appelées CFU-S (Colony Forming Units-Spleen), Peu nombreuses (0.01 à 0.05 % des cellules médullaires) et identifiables morphologiquement (forme de petits lymphocytes). Elles expriment le marqueur de surface CD34+ et conservent leurs propriétés après congélation à -196°.

3.2. Propriétés des cellules souches hématopoïétiques

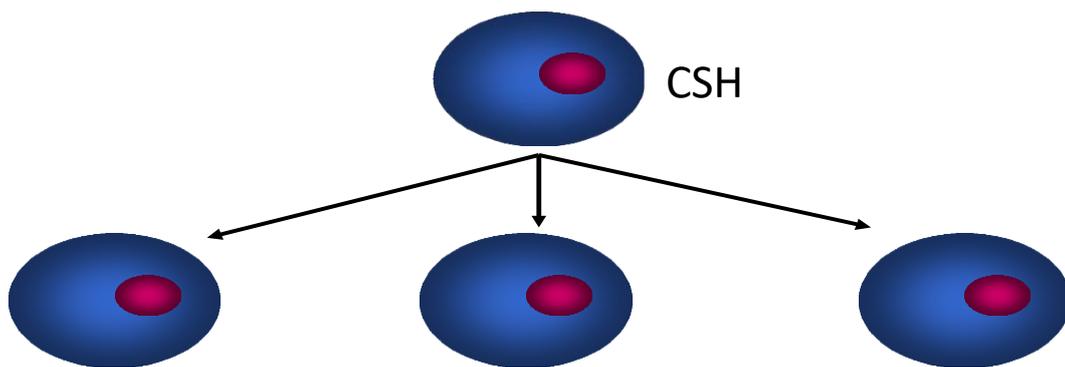
Les cellules hématopoïétiques apparaissent au niveau du foie fœtal, Puis passent dans la moelle osseuse. Elles possèdent les propriétés suivantes:

3.2.1. Totipotence

Une CSH est capable de donner, après différenciation, naissance à n'importe quelle cellule du sang



3.2.2. Auto renouvellement : Reproduction à l'identique des CSH pour maintenir un stock permanent de CSH dans la moelle



3.2.3. Différenciation

En réponse à un signal, une cellule souche peut commencer à se différencier de façon irréversible et s'engager ainsi dans une lignée cellulaire donnée.

3.3. Etapes de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse se déroule en 4 étapes successives. Le passage d'une étape à une autre est sous influence de signaux (cytokines et autres)

a- Cellules souches totipotentes :

- localisées dans la moelle osseuse
- Elles sont en Go et présentant CD34+
- capacité d'auto-renouvellement
- capacité de différenciation
- différenciation irréversible vers plusieurs lignées

b- Progéniteurs

- La première différenciation de la cellule souche totipotente
- Perdent progressivement la capacité d'autorenouvellement
- Deux progéniteurs principales de cellules sanguines : progéniteur lymphoïde et progéniteur myéloïde (fig. 4).

c- Précurseurs

- Les premières cellules morphologiquement identifiables
- perdus toute capacité d'autorenouvellement
- Les différents précurseurs :
 - Les myéloblastes (Futurs polynucléaires),
 - Les proérythroblastés (Futurs hématies),
 - Les mégacaryoblastés (Futurs plaquettes),
 - Les lymphoblastés (Futurs lymphocytes)
 - Les monoblastés (Futurs monocytes).

d- Cellules matures

- Cellules terminales fonctionnelles
- Modifications spécifiques (noyau, membranes ...)
- les différentes lignes: lymphocytes, érythrocytes, granulocytes, monocytes, plaquettes.....

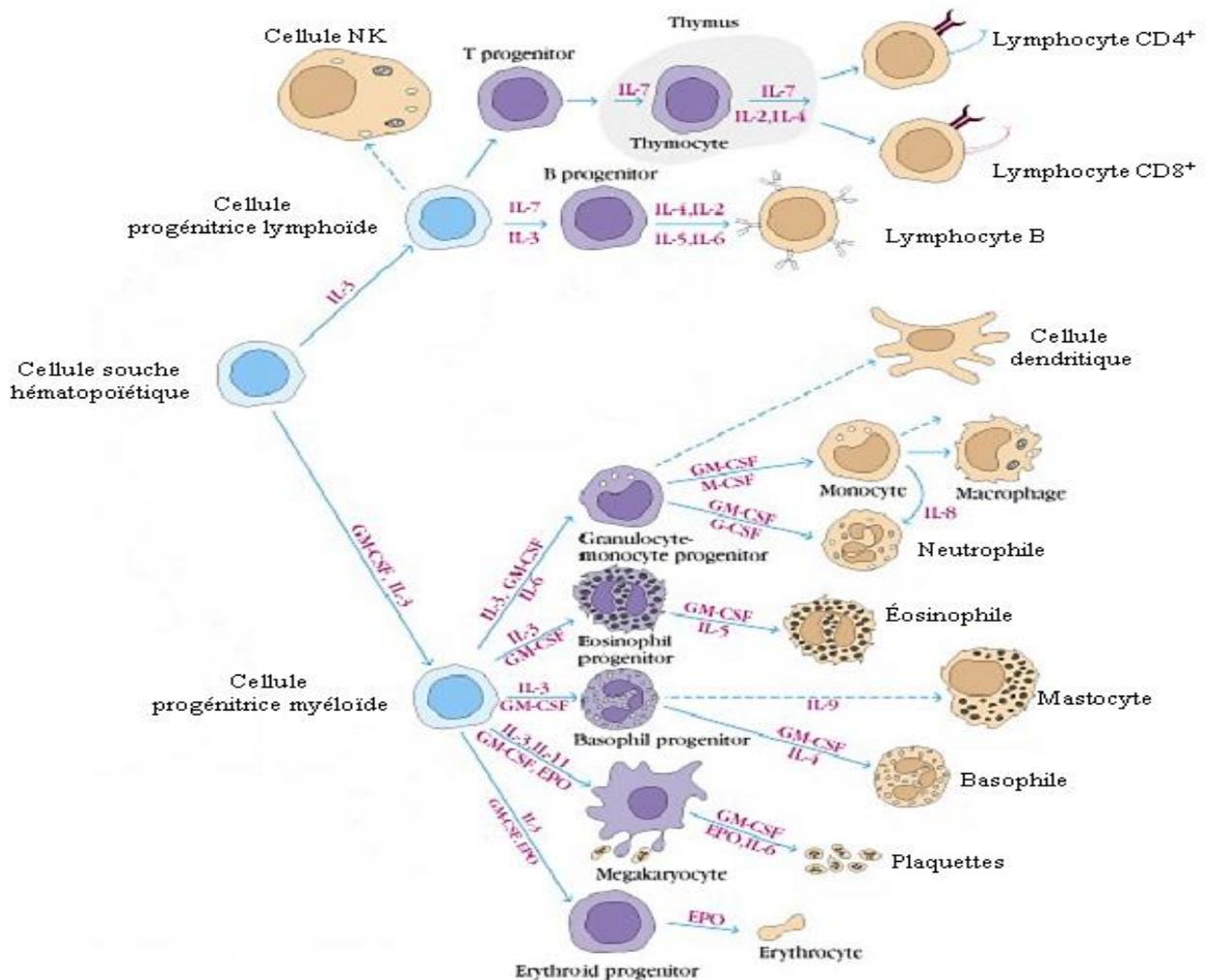


Figure 4: Hématopoïèse du système immunitaire dérivant d’une cellule souche de la moelle osseuse. Ces cellules souches expriment le marqueur de surface CD34. Classiquement, les progéniteurs peuvent être classés en deux familles : (1) ceux qui proviennent d’une cellule souche myéloïde et donnent naissance aux polynucléaires, aux monocytes/macrophages, aux cellules dendritiques, aux érythrocytes et aux plaquettes ; (2) ceux qui proviennent d’une cellule souche lymphoïdes donnant naissance aux lymphocytes T, B et NK (Natural Killer).

3.4. Régulation de l’hématopoïèse

Trois éléments jouant un rôle dans la régulation : microenvironnement médullaire, certaines vitamines et oligoéléments et les facteurs de croissance.

➤ *Microenvironnement médullaire*

Le stroma médullaire est un tissu de soutien et de nutrition de toutes les cellules hématopoïétiques, constitué de différents types de cellules baignant dans une matrice extracellulaire (fibroblastes, endothéliales, macrophages, épithéliales et adipocytes). Le

stroma sécrète des matrices extracellulaires et des facteurs de croissance (réservoir de facteurs de régulation de l'hématopoïèse).

➤ *Les vitamines et oligoéléments*

Vitamine B12 et acide folique (synthèse d'ADN) et le fer (hémoglobine)

➤ *Les facteurs de croissance*

Cytokines et CSF (Colony Stimulating Factor) augmentent le nombre de cellules souches - IL 3, GM-CSF (CSF = Colony Stimulating Factor), survie et la différenciation des cellules souches.

3.4.1. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des glycoprotéines de la famille des cytokines capables de stimuler l'hématopoïèse et synthétisées par divers types de cellules : Sanguines, endothéliales, fibroblastes.... Leur rôle est la régulation de la croissance et des fonctions des cellules sanguines en se fixant sur récepteurs membranaires de grande affinité. Leur mode d'action est principalement paracrine ou autocrine à des très faibles doses. On distingue trois types de facteurs de croissance :

a. Facteurs de promotion

Agissent au stade précoce de l'hématopoïèse, au niveau des cellules souches. Leur rôle consiste à augmenter le nombre de cellules souches en cycle cellulaire et sensibiliser les cellules souches totipotentes à l'action des autres facteurs de croissance (fig.5). Ces facteurs sont : IL1 (Interleukine 1), IL4 (Interleukine 4), IL6 (Interleukine 6), SCF (*Stem Cell Factor*) et Flt3L (Flt-3 Ligand).

Les facteurs de croissance de promotion

capables d'agir sur les cellules souches totipotentes
augmentent le nbre de cellules souches en cycle cellulaire

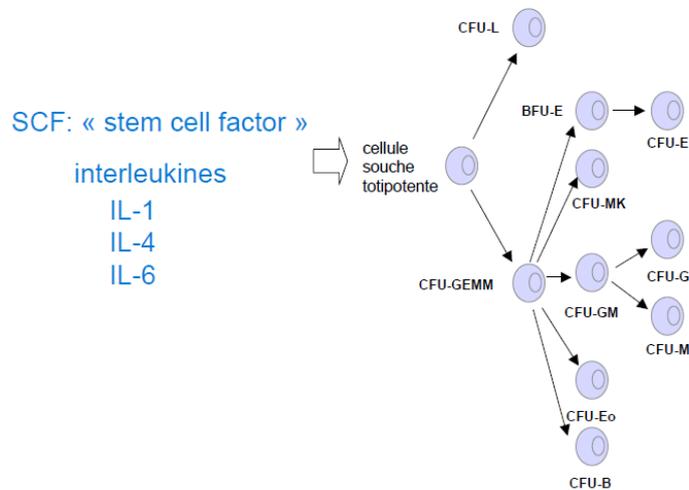


Figure 5 : facteurs de croissance de promotion

b. Facteurs multipotents

Ils agissent au stade précoce de l'hématopoïèse (cellules souches et jeunes progéniteurs). Les facteurs multipotents permettent la survie et la différenciation des cellules souches les plus immatures lorsque celles-ci ont déjà été sensibilisées par les facteurs de promotion. Ces facteurs sont : GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) et IL3.

c. Facteurs restreints

Ils agissent au stade final de l'hématopoïèse (précurseurs). Ces facteurs agissent sur les cellules souches déjà engagées (précurseurs) en favorisant leur multiplication et leur maturation. Leur Effet est limité à une lignée cellulaire. es facteurs sont présentés par la figure 6.

Les facteurs de croissance restreints

Exemples: **IL-7** « interleukine 7 », **EPO** « erythropoïétine », **TPO** « thrombopoïétine », **G-CSF** « granulocyte colony stimulating factor », **M-CSF** « monocyte colony stimulating factor »

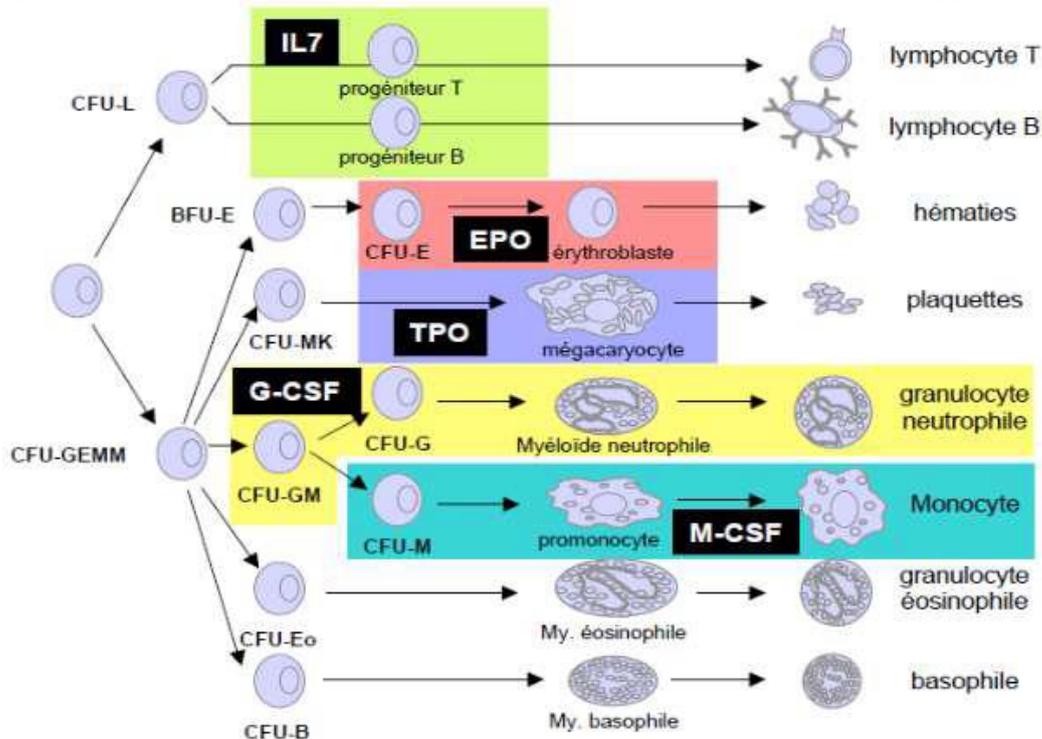


Figure 6 : Facteurs de croissance restreints

3.4.2. Facteurs de régulation négative

Inhibent l'hématopoïèse de façon générale ou spécifique

- *TGF β* (Transforming growth Factor β)

Inhibe croissance Progéniteurs précoces *in vitro*

- *TNF α* (Tumor necrosis Factor α)

Produit par monocytes et lymphocytes T

- *Interférons*

Protéines produites par de nombreuses cellules (telle que lymphocytes) notamment lorsqu'elles sont attaquées par un virus antimitotiques (antivirales). Il activent les macrophages et les phagocytose.

3.5. Utilisations thérapeutiques des cellules souches hématopoïétiques

3.5.1. Différentes formes de greffes CSH

Une greffe de CSH est une transplantation de cellules souches médullaires ou sanguines sans rétablissement de la vascularisation à partir d'un don d'un individu à un autre. Les différents types de greffe sont :

- *Xéno greffe* (greffes entre 2 individus différents d'espèce différente)

N'est pas pratiquée en thérapeutique humaine pour les CSH.

- *allogreffe* : greffe entre 2 individus différents de même espèce

Prélèvement de CSH sur un donneur bénévole, familial ou non apparenté HLA compatible sélectionné sur fichier et réinjecté au malade après conditionnement.

- *autogreffe* : greffe d'un individu à lui-même

Prélèvement de CSH à un patient et réinjecté au même patient à un autre moment après conditionnement.

La nature du greffon varie selon l'origine des CSH:

- soit cellules souches médullaires:
 - ⇒ greffe de moelle : Prélèvement au bloc opératoire sous anesthésie générale
- soit cellules souches périphériques (CSP)
 - ⇒ recueillies dans le sang par cytophérèse
- soit cellules de sang de cordon ombilical
 - ⇒ prélevé au moment de la naissance

A. Autogreffe

Les plus fréquemment prescrites. Le donneur est le malade lui-même en état de rémission

- *avantages*

- bonne faisabilité
- moyenne d'âge plus élevée
- Mortalité moindre car pas de GVH (*greffon contre hôte*)
- immunodépression moindre

- *inconvénients*

- plus de rechute car pas de GVL
- immunodépression moindre

-Déroutement

➤ **1er temps : collecte du greffon de CSP >> moelle**

- chimiothérapie mobilisatrice induisant une aplasie brève
- facteurs de croissance (GM ou G-CSF puis perixafor)
- contrôle des CD34 sur des numérations au moment de la sortie d'aplasie.
- collecte par cytophérèse 1 ou plusieurs
- congélation des cellules prélevées
- contrôle de qualité par :

numération des CD34 des poches de cytophérèse
nombre de CFU-GM après 14 jours de culture

➤ **2ème temps : réinjection du greffon**

- suivi ou non de facteurs de croissance pour raccourcir l'aplasie

➤ **Suivi ultérieur**

- aplasie courte avec peu de risques infectieux mais risque de mucite
- risque sur la stérilité surtout si irradiation corporelle totale (rare)
- absence d'effet greffe contre la maladie
- pas d'immunosuppresseur.
- suivi de la maladie résiduelle car risque de rechute élevé

B. Allogreffe de CSH

1. Sélection du donneur

➤ **Respect de la compatibilité HLA**

Indispensable pour faire cohabiter les lymphocytes donneur et receveur :

- HLA de classe I codé par les gènes A,B,C
- HLA de classe II codé par les gènes D (DR, DQ, DP...)
- gènes HLA sur le chromosome 6 et se transmettent par bloc (haplotype)
- => Les chances de trouver un donneur HLA compatible dans la fratrie sont de 25 %.
- => 35 % des patients seulement peuvent avoir un frère et une soeur HLA compatible
- recherche donneur HLA compatible
- => géno-identique dans la fratrie

=> phéno-identique sur fichiers des banques de donneurs non apparentés
=> haplo-identique dans les ascendants ou descendants un seul haplotype compatible => immaturité HLA banque de cordon

➤ **Bilan pré-greffe du donneur**

- contrôle du bilan viral: HIV, HVC, HVB....
- absence de contre-indication à l'anesthésie
- recueil de son consentement

- *Déroulement de la greffe*

Elle se déroule en plusieurs temps

1. Conditionnement du receveur

Conditionnement myélo-ablatif ou atténué: Eradication ou diminution du système lymphoïde et de la maladie résiduelle s'il y a lieu par chimiothérapie ou irradiation corporelle totale (ICT) ou serum antilymphocytaire

2. Prélèvement du donneur

Soit prélèvement de moelle sous anesthésie générale au bloc opératoire par ponction des crêtes iliaques et aspiration de 600 ml à 1200 ml de moelle osseuse selon les masses corporelles du donneur et du receveur. 48 heures d'hospitalisation pour le donneur.

Soit prélèvement de CSP par cytophérèse : plusieurs heures à l'hôpital. Pas d'anesthésie.

3. Réinjection des CSH congelées ou fraîches

- après contrôle de qualité (CD34/ CFU-GM/Kg)
- sur une voie veineuse périphérique.

4. Aplasie 3 à 4 semaines

- reconstitution hématopoïétique progressive
- reconstitution lymphoïde plus tardive

- *Indications de l'allogreffe*

1) Hémopathie maligne chimio-sensible mais dont les facteurs pronostiques font craindre une rechute :

Leucémie aiguë de l'adulte, myéloblastique et lymphoblastique

-LA de l'enfant avec facteurs de risque

- LA en rechute chimio-sensible

- *Complications tardives*

1- La réaction du greffon contre l'hôte ou GVH

Fréquente entre 20 et 50 % des cas.

- survenant entre le 20^{ème} et le 70^{ème} jour post-greffe
- sur un mode aigu : diarrhée, hépatopathie, rash cutané
- sur un mode chronique responsable de dénutrition
- insuffisance respiratoire chronique,
- aspect de pseudo-sclérodémie peau et muqueuse grave : responsable de la mortalité de la greffe
- à prévenir et à traiter par corticothérapie, immuno-suppresseurs (Ciclosporine, Methotrexate, Endoxan...)

2- Séquelles iatrogènes

- Stérilité
- cataracte, nécrose de la tête fémorale si irradiation
- risque de cancers secondaires
- séquelles psychologiques

- *Cas particulier les greffes alternatives*

1- Greffe de sang de cordon

Le prélèvement se fait à partir du sang placentaire d'un nouveau-né issu d'un couple de parents ayant un enfant atteint d'une maladie maligne, ou donneur volontaire. Ce processus exige l'information de la future maman, recueil du consentement écrit et oral lors de la consultation prénatale du 8^{ème} mois après contrôles sérologies des maladies transmissibles.

Avantages

- Source de CSH en cas d'absence de donneur HLA compatible
- pas de respect strict de l'HLA compatibilité.
- Grand nombre de CSH très immatures
- GVH moindre
- Meilleure prise du greffon car capacité proliférative 10 à 20 fois supérieure.
- Organisation en réseau de banque de sang placentaire
- Don anonyme et gratuit.

2- Greffes haploidentiques

- Donneur: ascendant ou descendant
- Compatibilité HLA à 50% => conditionnement avec Endoxan dès J2

4. Cytokines

4.1. Généralités

Les cytokines regroupent un domaine très vaste car elles entrent en jeu dans n'importe quel mécanisme de dialogue cellulaire. L'immuno-thérapie par les cytokines consiste à donner des Ac anti cytokines, ou à injecter des cytokines déficitaires. Mais, aux vues de leurs multiples fonctions, bloquer / injecter des cytokines peut provoquer des actions biologiques très diverses.

La réponse immunitaire est la résultante d'interactions complexes entre plusieurs types cellulaires qui communiquent entre eux via :

- des molécules de surface via un système ligand-Rc
- des médiateurs solubles : cytokines et chimiokines

Les molécules de la grande famille des cytokines (= molécules issues des cellules et agissant sur des cellules) ont portés des noms divers en fonction des cellules sécrétrices, au cours de l'histoire :

1. *Les interleukines* sont sécrétées entre les leucocytes
2. *Les lymphokines* sont sécrétées par des lymphocytes
3. *Les monokines* sont sécrétées par des monocytes

Le domaine d'activité des cytokines sont

- action sur le SI
- action sur l'hématopoïèse
- action sur la réponse inflammatoire, notamment en pathologie (IL6, IL1, TNF ...). Elles sont alors produites par les macrophages. Ce sont elles qui déclenchent la fièvre, l'augmentation de la perméabilité vasculaire ...

4.2. Caractéristiques des cytokines

- Les cytokines sont des glycoprotéines de PM > 10 000 D.
- Elles sont synthétisées de *novo* en réponse à une activation spécifique (Ag) ou non spécifique (mitogènes).
- Leur production ne s'accompagne pas nécessairement d'une réponse proliférative des cellules : En effet, elle nécessite la synthèse d'ARN mais pas celle d'ADN.
- La production d'une cytokine donnée peut être modulée de façon positive et négative par des nombreux facteurs et par d'autres cytokines, à tous les niveaux. Il existe en effet tout un

réseau des cytokines, interagissant entre elles par feedback. Chaque interaction est caractéristique d'un effet biologique donné.

- Les cytokines possèdent une double ubiquité au niveau de :

1. **la cellule productrice** : un même facteur peut être produit par différents types cellulaires et une cellule donnée produit plusieurs cytokines différentes (fig.7).

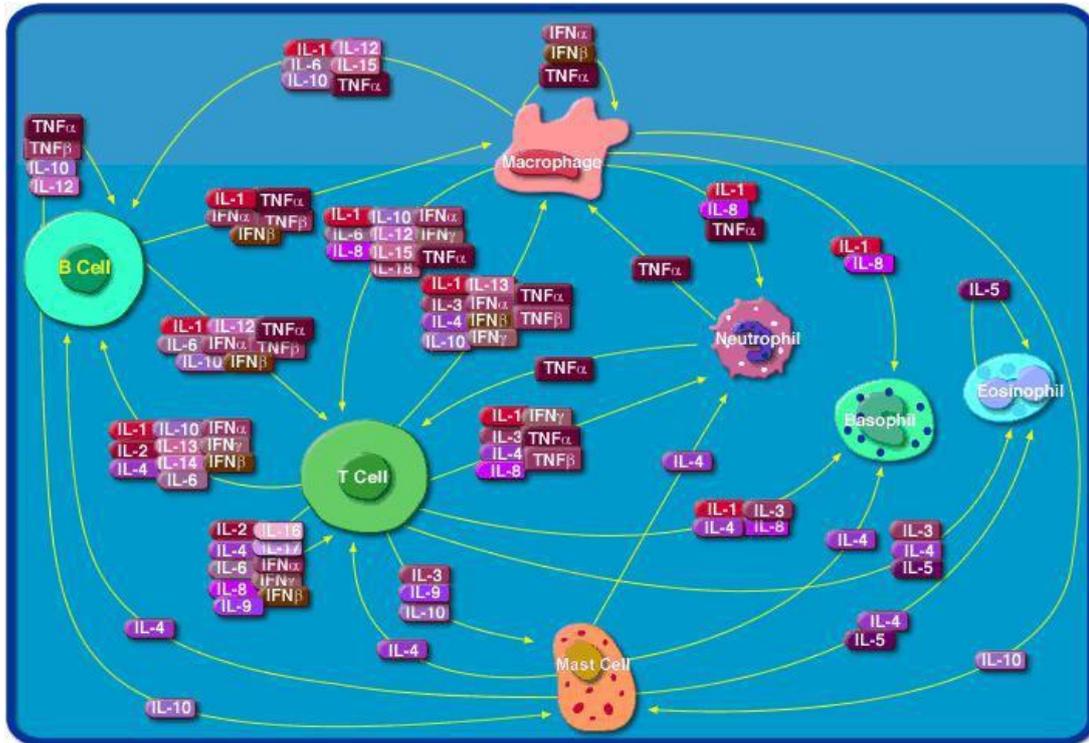


Figure 7 : Réseau de cytokines. Dans ce réseau, on retrouve toutes les cellules de l'immunité. Il illustre bien l'interaction entre ces dernières via la production de cytokines données et la mise en place de boucles régulatrices.

2. la cellule cible :

X Pléiotropie : un même facteur est responsable d'activités biologiques variées sur des cellules différentes

X Redondance : une activité biologique donnée peut résulter de l'effet de molécules différentes (fig. 8).



Figure 8 : Pléiotropie et redondance d'une cellule cible.

4.3. Hormones et cytokines

La différence entre les hormones et les cytokines est illustrée dans le tableau 2

Tableau 2 : Différence entre hormones et cytokines

Substance	Sources	Cibles	Activité	Mode d'action
Hormone	Sécrétées principalement par un seul type de cellule spécialisée et localisée	Spécificité vis à vis d'une cellule cible principale	Essentiellement unique	endocrine
Cytokine	Produites par plusieurs types cellulaires	Cellules hématopoïétiques et nombreuses autres	Large spectre et redondance	Action loco régionale Endocrine Juxtacrine Paracrine autocrine

4.4. Récepteurs des cytokines

Les cytokines agissent sur leurs cellules-cibles par un mécanisme analogue à celui des hormones peptidiques :

- Fixation sur un récepteur membranaire
- Mise en action de seconds messagers intracellulaires
- Induction d'une séquence d'évènements biochimiques aboutissant à l'effet spécifique de la cytokine.

Un grand nombre de récepteurs sont composés de deux ou trois chaînes α , β et γ dont l'association forme le récepteur de haute affinité capable de transmettre le signal (ex : récepteur pour l'IL-6)

La démonstration de récepteurs composés de plusieurs sous-unités, dont certaines sont communes à plusieurs récepteurs, nous permet de mieux comprendre la redondance des activités biologiques de certaines cytokines.

4.4.1. Composition multimérique des Rc des cytokines

Les cellules expriment le plus souvent un récepteur de faible affinité qui ne transmet pas le signal (mis à part les récepteurs des facteurs de croissance avec activité tyrosine kinase intrinsèque).

La plupart des récepteurs des cytokines sont composés de 2 ou 3 chaînes distinctes

- α qui assure la spécificité vis à vis du ligand
- β et/ou γ : qui ne reconnaissent pas la cytokine, mais s'associent pour former le récepteur de haute affinité et transmettre le signal déclenché par le contact ligand-Rc

Certains Rc peuvent transmettre le signal de manière directe et possèdent des domaines fonctionnels tels que les domaines tyrosine kinase et peuvent se brancher directement sur les voies de signalisation. Mais, la plupart ne disposent pas de ces domaines et se branchent sur les voies via des protéines JAK et STAT. En fonction du répertoire de ces dernières, il en résultera des effets différents.

Les Récepteurs des cytokines présentent également une redondance structurale et fonctionnelle. En effet, la propriété de redondance des cytokines s'explique par le fait que divers récepteurs peuvent partager une chaîne commune (tableau 3).

Tableau 3: Chaines communes de quelques récepteurs des cytokines

Récepteur	Chaîne commune
Rc à l'IL 3 Rc à la GM-CSF Rc l'IL 5	Ils partagent la même chaîne β qui s'associe à la chaîne α spécifique pour former le Rc à forte affinité et transmettre le signal
Rc à Gp 130 Rc à l'IL11	Ils partagent la même chaîne β que le Rc à l'IL6
Rc à l'IL2 Rc à l'IL 4 Rc à l'IL 7 Rc à l'IL 9 Rc à l'IL 15	Ils partagent la même chaîne γ et ont une chaîne α spécifique
Rc à l'IL 12 Rc à l'IL 23	Ils partagent la protéine p 40.

4.4.2. Classification des Récepteurs des cytokines

Les Rc aux cytokines peuvent appartenir à diverses familles; en fonction de leur conformation :

- Rc de type I : Rc des hématopoïétines
- Rc de type II : Rc des IFN
- Rc de type III : Rc du TNF
- Rc apparentés à la super famille des Ig
- Rc des chimiokines
- Autres (ex : famille Th17)

Dans le tableau précédent, on voit les différentes morphologies des Rc des cytokines avec quelques fois des parties intracellulaires qui peuvent transduire le signal d'activation n'existant pas sur tous les Rc des cytokines.

Exemples :

- Le Rc aux chimiokines est un petit serpent à 7 traversées membranaires. C'est le prototype de cytokine. Au niveau du cytoplasme, ils se branchent sur le cytosquelette. En effet, ils sont myo-attractants, c'est à dire qu'ils attirent les cellules sur les sites lésés et inflammatoires par l'intermédiaire d'un remaniement du cytosquelette leur permettant de faire la diapédèse. Ces molécules ont une action assez rapide.

- Les Rc de l'IL17 sont tous localisés au niveau du K3. On pense qu'ils se dirigent probablement vers la cascade des MAP kinases.

4.4.3. Formes solubles des récepteurs

A l'heure actuelle des formes solubles de la très grande majorité des récepteurs ont été identifiées. Elles résultent soit d'un clivage protéolytique de la forme membranaire soit d'un épissage alternatif de l'ARNm de la forme membranaire du récepteur. Les récepteurs solubles gardent la propriété de fixer la cytokine. Ces formes solubles exercent dans certains cas un effet antagoniste en inhibant la fixation de la cytokine sur son récepteur membranaire : récepteurs solubles du TNF- α , du LIF, de l'IL-4. Ils exercent ainsi un rétrocontrôle de l'effet des cytokines. Ces formes solubles des récepteurs existent sous forme recombinante utilisées en thérapeutique : l'étanercept ou Enbrel est le récepteur soluble de type 2 (p75) du TNF- α , couplé au fragment Fc d'une IgG1 humaine pour allonger sa durée de vie. Dans d'autres cas, ces récepteurs solubles peuvent avoir un effet porteur assurant la protection des cytokines. C'est le cas de l'IL-4 qui fixée à son récepteur soluble est moins sensible à la dégradation. Enfin ces récepteurs solubles peuvent amplifier la réponse comme pour le récepteur soluble de l'IL-6 qui peut alors se fixer sur n'importe quelle cellule exprimant la gp130 (fig. 10 ; 9)

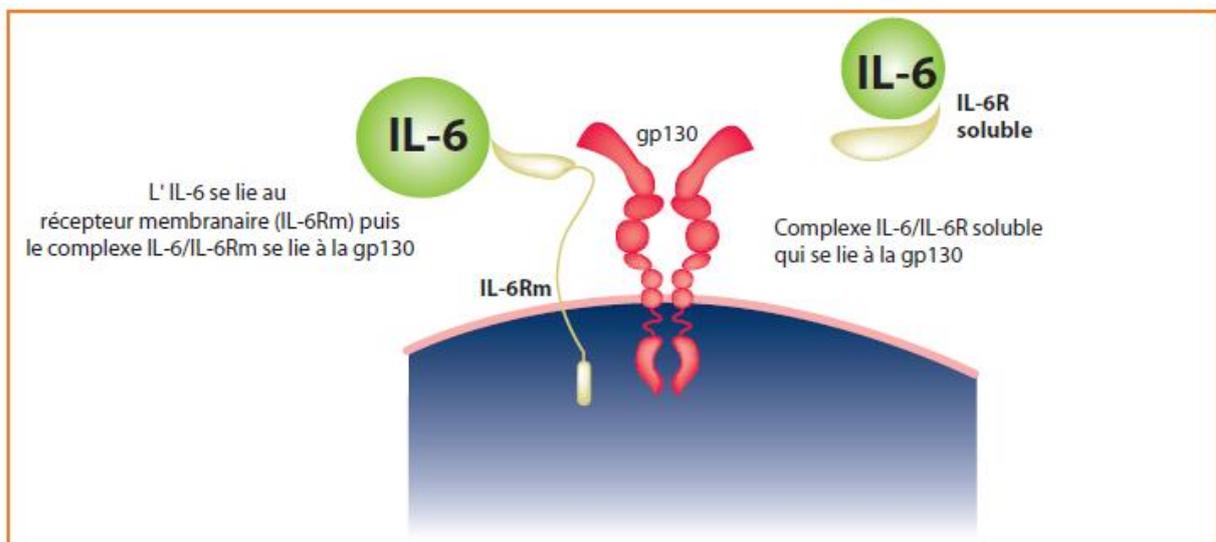


Figure 9 : Récepteurs de l'IL-6. L'IL-6 agit directement sur une cellule qui exprime un récepteur complet et fonctionnel (gp130 et mIL-6R) et de façon indirecte si la cellule n'exprime que la gp130 : l'IL-6 circulante se fixe d'abord sur une chaîne d'IL-6R soluble (sIL-6R), ce complexe interagit ensuite avec la gp130 membranaire pour former un récepteur complet et fonctionnel.

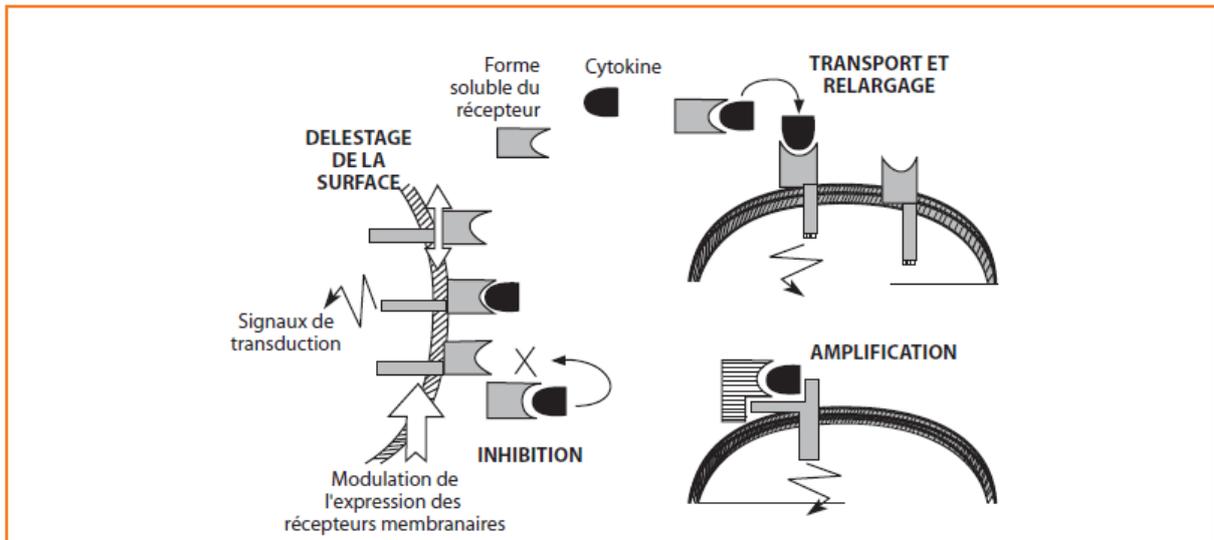


Figure 10: rôles des récepteurs solubles : transport et relargage, inhibition et amplification

4.5. Mode d'action des cytokines

L'interaction cytokine/récepteur induit un signal intracellulaire (activant différentes voies de signalisation intracellulaires) qui modifie le comportement de la cellule (expression génique). Les réponses cellulaires à l'action des cytokines s'expriment par l'augmentation ou la diminution d'expression des protéines membranaires (y compris les récepteurs aux cytokines), par la différenciation, l'activation, la prolifération ou la mort cellulaire et la sécrétion de molécules effectrices.

Les signaux de transduction font intervenir des tyrosine kinases. Certains récepteurs présentent une activité tyrosine kinase, intrinsèque, d'autres recrutent des tyrosine kinases cytoplasmiques appartenant à différentes familles : les JAK kinases ou les Src kinases (Src, Lyn, Fyn...). Le signal est ensuite assuré par des protéines transductrices dont les plus connues sont les protéines STAT. Leur phosphorylation permet leur translocation dans le noyau où elles vont activer la transcription de nombreux gènes. C'est ce que l'on observe en ce qui concerne l'IL-6 et les Interférons (fig. 11).

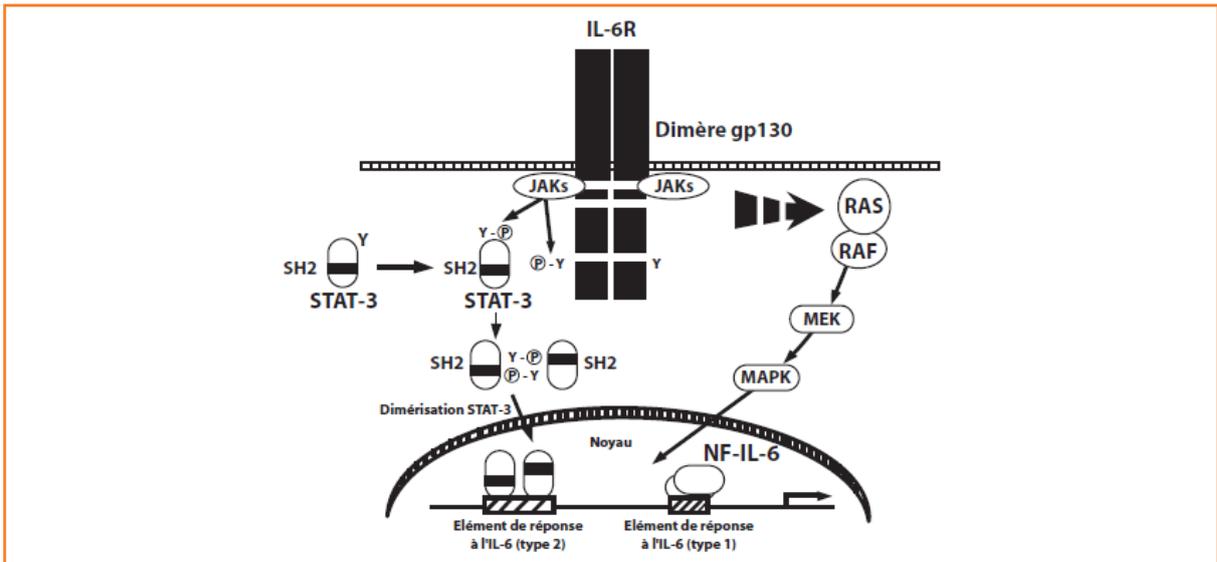


Figure 11 : La voie JAK/STAT (IL-6)

4.6. Régulation de la synthèse et de l'action des cytokines

Elle est réalisée par différents mécanismes :

- inhibition des voies de signalisation conduisant à leur synthèse. Ex : inhibiteurs des voies TLRs
- épissage alternatif du ARNm
- modifications épigénétiques : les microARN, petits ARN non codants qui régulent au niveau post-transcriptionnel, la synthèse de cytokines (dégradation de l'ARN messager ou non traduction de cet ARN messager) : miR-346 qui inhibe la synthèse de l'IL-18
- synthèse de cytokines antagonistes : l'IL-10
- libération de formes solubles des récepteurs ou d'antagonistes des récepteurs (TNFRs, IL1-RA)
- synthèse d'inhibiteurs des voies de signalisation activée par les cytokines : SOCS1 et SOCS3 qui sont des inhibiteurs de la voie JAK/STAT.

4.7. Méthodes de dosage des cytokines

Les techniques d'exploration des cytokines sont multiples. Le principe des méthodes biologiques consiste à mesurer l'activité d'une cytokine sur une lignée cellulaire donnée (technique de type bioassay). On pourra par exemple mesurer la stimulation de la croissance cellulaire. La limite de ces techniques biologiques vient notamment du fait que différentes cytokines peuvent parfois stimuler la même réponse biologique. Ainsi, en routine, des techniques de dosages spécifiques seront préférées à des tests fonctionnels.

Deux techniques sont principalement utilisées en routine :

4.7.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sandwich

Un anticorps spécifique de la cytokine à doser sera adsorbé sur un support solide (plaque plastique de 96 puits). L'échantillon à analyser, contenant la cytokine à doser, est ensuite ajouté dans la plaque, permettant la fixation de la cytokine sur l'anticorps spécifique. La révélation de la réaction antigène-anticorps est assurée par l'ajout d'un anticorps secondaire spécifique de la cytokine à doser, et marqué par une enzyme. Enfin, l'ajout d'un substrat de l'enzyme de type chromogène permet la production d'un produit coloré dont l'absorbance est mesurée et sera d'autant plus grande que la quantité de cytokine dans l'échantillon est importante. Le dosage est quantitatif grâce à l'utilisation d'une gamme de concentrations connues de la cytokine à doser. L'ELISA est une technique sensible et facilement automatisable qui est commercialisée sous forme de kits permettant d'augmenter la reproductibilité des résultats.

4.7.2. Cytométrie en flux utilisant des billes

La cytométrie en flux consiste à illuminer des cellules ou des billes par un rayon laser et à enregistrer la lumière diffusée (donnant des indications sur la taille) ou émise (par un fluorochrome à la surface de la cellule ou de la bille). Dans le cas de l'exploration des cytokines, le dosage implique l'utilisation de billes de capture sur lesquelles est fixé un anticorps spécifique de la cytokine à doser. Les billes sont mises en contact de l'échantillon contenant la cytokine à doser, puis la réaction est révélée par un anticorps secondaire spécifique couplé à un fluorochrome. L'intensité de fluorescence sera donc proportionnelle à la quantité de cytokines présente dans l'échantillon. Là encore, le dosage peut-être quantitatif grâce à l'utilisation d'une gamme de concentrations connues de la cytokine à doser. Cette technique, tout comme l'ELISA, est sensible, et peut être utilisée sous forme « multiplex » permettant de détecter plusieurs cytokines différentes dans le même échantillon.

4.8. Rôle des cytokines en pathologie

Une cytokine peut avoir des effets « anormaux » (pathogènes) dans différentes circonstances :

- Si la cytokine est produite en excès en raison d'un polymorphisme génétique ou par une stimulation chronique inappropriée,
- Si la cytokine est produite anormalement mais surtout si le système de rétrocontrôle (récepteurs solubles...) est déficitaire,

- Si la cytokine est produite de façon inappropriée par un tissu ou des cellules qui ne doivent pas en produire.

4.8.1. L'exemple des maladies auto-immunes

Un certain nombre de maladies auto-immunes (et notamment de maladies rhumatismales) implique une dérégulation du réseau des cytokines. Ceci peut se traduire par un défaut de production de cytokines suppressives, ou une surproduction de cytokines pro-inflammatoires. Une meilleure compréhension de cette dérégulation conduira sans doute au développement de nouveaux traitements spécifiques (fig. 12).

Signature IFN dans le lupus

Le développement récent de nouvelles technologies très performantes permettant l'analyse du transcriptome (c'est à dire l'expression des gènes sous la forme d'ARNm) à l'aide de puces à ADN a permis d'analyser le transcriptome des patients atteints de lupus érythémateux disséminé. Ces études, réalisées sur l'ensemble des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs), a montré une augmentation de l'expression de gènes dépendant de l'IFN, appelé « signature IFN », chez environ la moitié des patients. Les IFN de type I sont principalement responsable de cette signature.

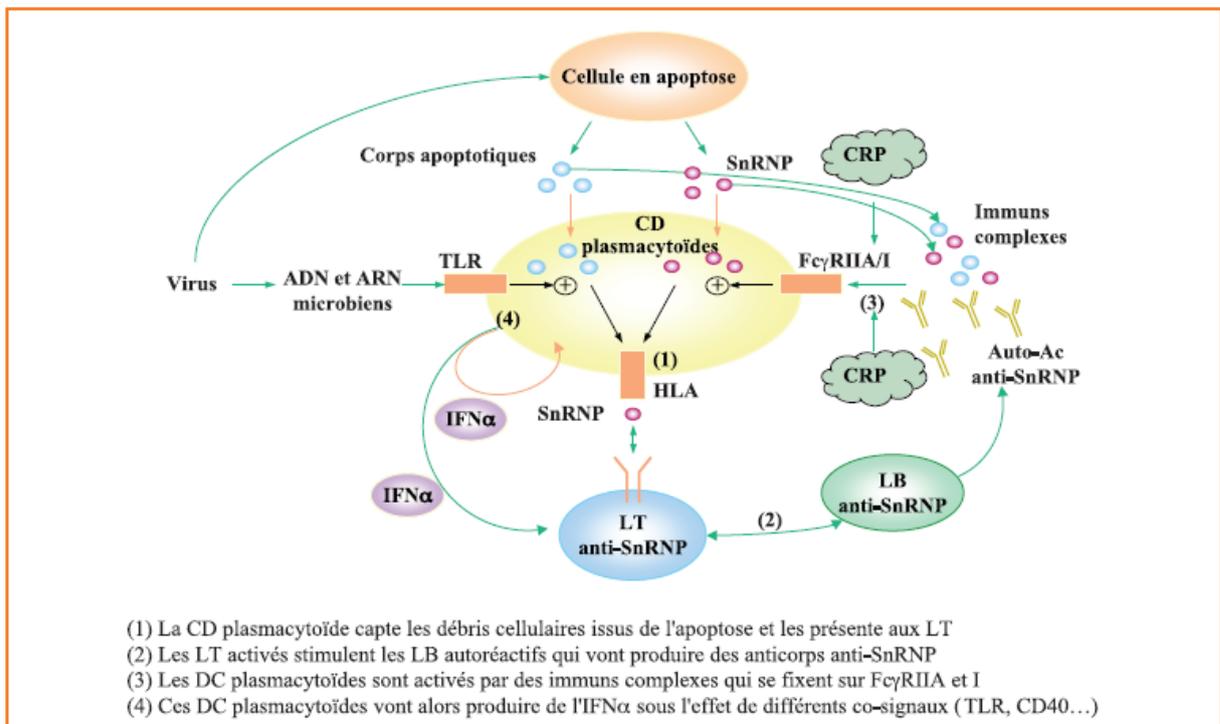


Figure 12 : L'hypothèse du rôle de l'IFN-α dans la pathologie lupique.

4.8.2. L'exemple des maladies néoplasiques

Les cytokines jouent un rôle important dans les interactions entre les cellules tumorales et leur micro-environnement.

Rôle de l'IL-6 dans la cancérogénèse chez l'homme

Chez l'homme, des travaux ont montré que le polymorphisme (-174G/c) de son promoteur (associé à une élévation des taux sériques d'IL-6) est corrélé à l'apparition de syndromes lymphoprolifératifs (lymphome, myélome) mais aussi de cancers solides (côlon, sein). Des données plus controversées ont été publiées dans d'autres cancers, en particulier les cancers ORL et gastriques. Les taux sériques d'IL-6 semblent plus élevés en cas de cancer mais il n'y a pas d'étude prospective permettant de démontrer un lien de causalité entre la production de cette cytokine et l'apparition du cancer.

Des études physiopathologiques dans certains cancers ont fortement suggéré le rôle protumoral de l'IL-6. Dans le myélome, les lymphomes et la maladie de Castleman, l'IL-6 est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic. Le rôle de l'IL-6 est particulièrement important dans la maladie de Castleman. Dans sa forme induite par le virus HHV8, il a été démontré que ce virus est capable de produire un facteur analogue à l'IL-6 qui induit la prolifération tumorale. Dans l'hépatocarcinome, il a été démontré que l'IL-6 exerçait un rôle important dans la transformation maligne des hépatocytes après que ces cellules aient été agressées par un stress viral, toxique ou immunologique (fig.13).

4.8.3. Stratégies thérapeutiques anti-IL-6 dans les cancers

Au total, ces données, plutôt en faveur d'un rôle pro-tumoral de l'IL-6 ont conduit au développement de stratégies anti-tumorales ciblant l'IL-6. Les principales indications étudiées sont la maladie de Castleman et le myélome mais l'inhibition de l'IL-6 a été également envisagée dans le traitement des lymphomes et d'autres cancers disséminés, notamment dans le cancer du rein. Deux anticorps humanisés dirigés contre l'IL-6 ont été développés (CNTO-328 et B-E8). L'étude de leur efficacité dans des modèles précliniques de myélome et dans un essai non randomisé est encourageante. Le tocilizumab (Actemra), anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'IL-6 pourrait être testé dans cette indication. Plusieurs inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaire médiées par l'IL-6, inhibiteur des JAK kinases (INCB20) ou du facteur de transcription STAT (531-201) ont montré une efficacité dans le traitement d'un modèle murin de myélome. Le lenalidomide (Revlimide) a obtenu récemment une AMM pour le traitement du myélome ayant reçu au moins un traitement antérieur. Son mécanisme d'action

n'est pas entièrement connu mais pourrait reposer en partie sur l'inhibition de la sécrétion d'IL-6 par les monocytes.

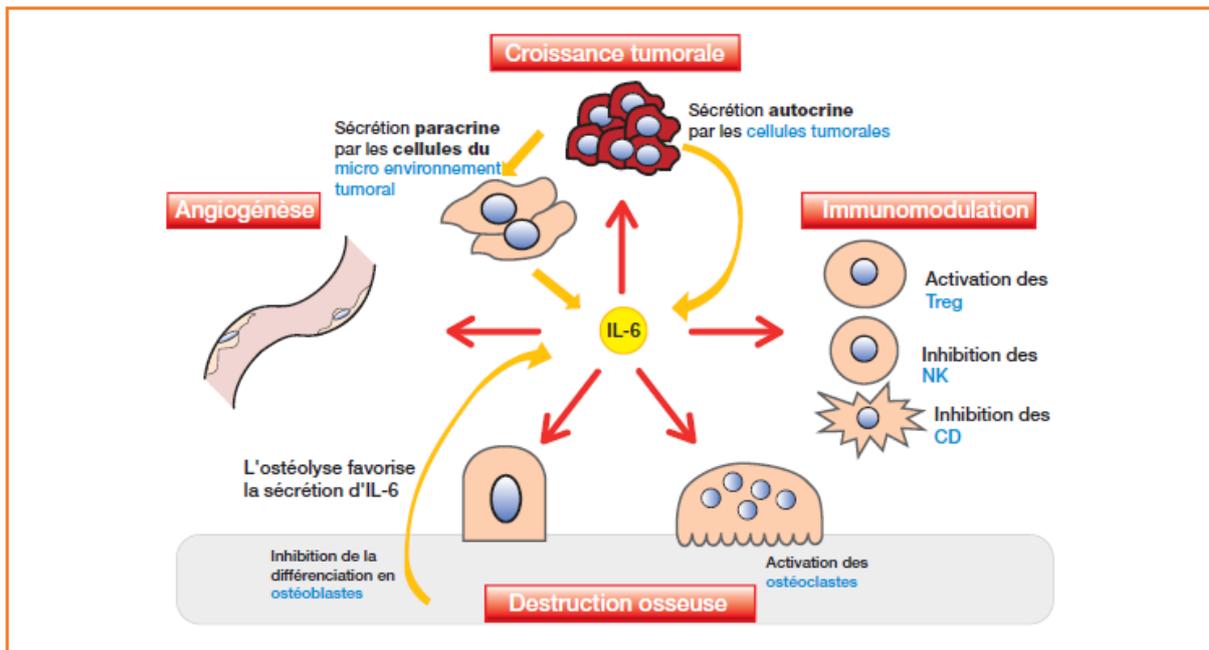


Figure 13 : L'IL-6 et cancer

5. Modèles immuno-pathologiques

5.1. Pathologies inflammatoires chroniques

La réaction inflammatoire est une réponse immunitaire essentielle qui permet à l'organisme de survivre pendant une infection ou une blessure et de maintenir l'homéostasie tissulaire dans des conditions nocives.

L'inflammation constitue l'élément essentiel de la dynamique de l'immunité innée qui alerte et recrute les cellules immunitaires environnantes dans le site de l'infection telles que les macrophages et les cellules dendritiques (Galanaud et Emile, 2001 ; Xu, 2017). En plus, l'inflammation conduit à la production de médiateurs pro-inflammatoires, y compris cytokines, chimiokines et les médiateurs lipidiques.

5.1.1. Types de l'inflammation

il existe deux types d'inflammation : aigue et chronique

A. Inflammation aigue

L'inflammation aiguë est considérée comme un trouble physiologique qui se produit dans les tissus vascularisés pour défendre l'hôte et de maintenir l'homéostasie (Marcelo, 2013). Elle survient généralement quelques minutes ou au plus tard après une lésion tissulaire. En plus, elle est caractérisée par les symptômes classiques: rougeur, chaleur, œdème et douleur.

B. Inflammation chronique

Un déséquilibre de balance tissulaire conduit à une réponse inflammatoire soutenue entraînant une inflammation chronique irréversible. L'inflammation chronique correspond donc à un échec de l'inflammation aiguë. Elle persiste plus longtemps et augmente le développement de différentes maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer, l'asthme, la sclérose en plaques. L'inflammation peut donc devenir pathologique en fonction de l'intensité et la chronicité de la réponse (fig. 14).

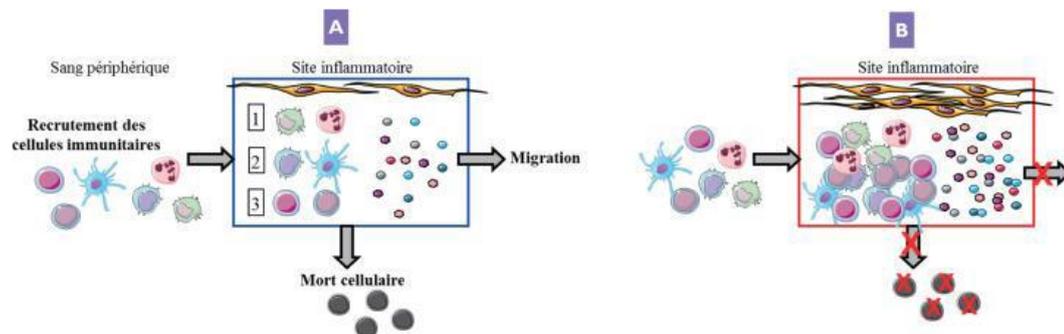


Figure 14 : Inflammation aiguë et chronique (Noack et al., 2018).

A. Lors de la phase initiale de l'inflammation, les PN neutrophiles (1) sont les premières cellules recrutées. La libération de cytokines et chimiokines va alors agir sur les cellules endothéliales et permettre le recrutement dans un second temps des monocytes et cellules dendritiques (2) puis des lymphocytes (3). **B.** Une fois l'agression maîtrisée, la phase de résolution se déclenche : libération de cytokines anti-inflammatoires, migration hors du site inflammatoire et mort cellulaire. Lors de l'inflammation chronique, cette phase de résolution est absente. L'infiltrat immunitaire persiste, ce qui contribue à l'hyperplasie et à la destruction du tissu.

5.2. La maladie de Crohn

5.2.1. Définition

En 1932, Crohn, Ginzbourg et Oppenheimer publièrent plusieurs observations d'une nouvelle entité pathologique et clinique sous le terme d'iléite régionale puis prit rapidement le nom du premier auteur : la maladie de Crohn (MC). MC est une maladie généralisée puisqu'elle touche l'ensemble du tube digestif, de la bouche à l'anus mais plus souvent iléon et colon. Elle se rencontre surtout chez des adultes jeunes. La maladie est caractérisée par une atteinte

inflammatoire transmurale et discontinue du tube digestif, accompagnée de sténoses, de fistules et d'abcès de la paroi (fig.15). Elle se manifeste par des symptômes cliniques variés et par une évolution chronique avec une succession de poussées plus ou moins intenses, entrecoupées de phases de rémission plus ou moins longues. La sévérité des poussées est mesurée en utilisant des indices cliniques particulièrement CDAI (Crohn's Disease Activity Index).

Tableau 4 : Les principales chimiokines et les cytokines pro-inflammatoire secrétés lors la réaction inflammatoire

Médiateurs		Source	Rôle
<u>les chimiokines</u>	MCP-1	Monocyte /macrophage, les lymphocytes et les cellules endothéliales.	Induisent l'augmentation de la synthèse d'intégrines et favorise ainsi l'attachement des leucocytes circulants aux cellules des parois des vaisseaux sanguins
	L'IL-8	Monocyte /macrophage, les lymphocytes , les cellules endothéliales et les neutrophiles.	augmente la perméabilité vasculaire et stimule la diapédèse des leucocytes activés.
<u>Cytokines pro-inflammatoire</u>	TNF	principalement produit par les monocytes et les macrophages mais aussi par certains lymphocytes T.	Conduit à la formation de granulome et joue un rôle dans l'induction de la réparation tissulaire. En plus, le TNF contribue à la résolution de l'inflammation en induisant l'apoptose des cellules inflammatoires.
	IL-6	Produite par la plupart des cellules stromales et immunitaires	Il module l'hématopoïèse et l'accumulation de PN neutrophiles sur le site infecté.

	1	IL-	principalement sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques	
	17	IL-	principalement sécrétée par les lymphocytes Th17.	le recrutement des PN neutrophiles sur le site de l'infection induit également la production de chimio-attractants pour d'autres cellules de l'immunité

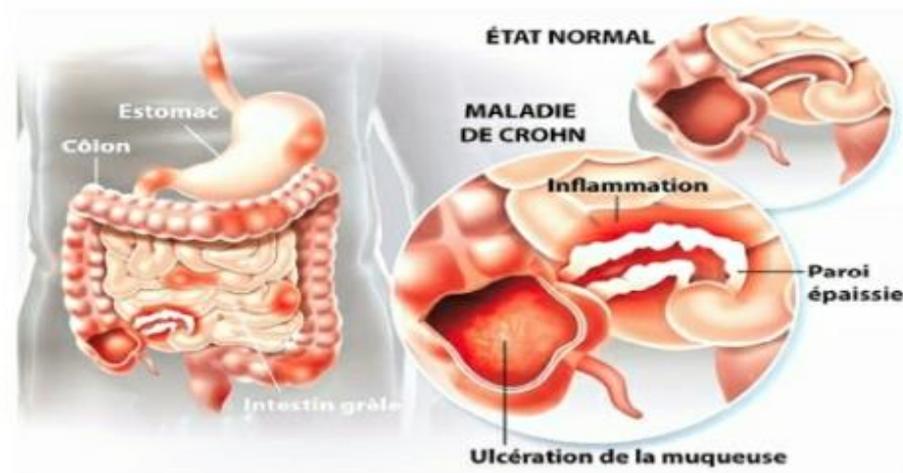


Figure 15. Maladie de Crohn.

5.2.2. Diagnostic

Le diagnostic de MC repose sur un faisceau d'arguments cliniques et paracliniques (examens complémentaires). En effet, aucun des examens expliqués ne permet de porter le diagnostic. Il n'existe aucun test permettant d'affirmer à lui seul le diagnostic.

a-Critères biologiques

Il n'existe aucun signe biologique spécifique de la MC. Les examens réalisés ont pour but de confirmer le caractère des symptômes. D'une part, pour évaluer le niveau d'activité de l'inflammation, la possibilité de développer une anémie. D'autre part, pour l'analyse d'échantillons de selles. On trouve un bilan biologique standard qui comprend : NFS (Formule Numération Sanguine). En plus, la recherche des signes d'inflammation par marqueurs de

l'inflammation : la vitesse de sédimentation (VS) et du taux de protéine C réactive (CRP). Bilan électrolytique (calcium, magnésium...) et dosages des oligo-éléments et des différentes vitamines. Un autre examen pour la recherche de marqueurs sérologiques tels que le dosage des anticorps pluri-nucléaires anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (pANCA) et anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Ces deux dosages ne sont pas utiles au diagnostic des MICI mais plutôt à la distinction entre RCH et MC dans les colites difficiles à classes. On utilise actuellement un dosage dans les selles : la calprotectine fécale qui permet de mesurer indirectement l'état inflammatoire de la muqueuse intestinale et peut être utile chez les patients ayant une diarrhée chronique).

b-Critères morphologiques

Les radiographies à rayons X sont réalisés pour préciser l'aspect et l'étendue des lésions. L'échographie dite « haute fréquence » est très utile pour visualiser l'épaisseur de la paroi *intestinale* (fig. 16). Selon la partie du tube digestif touchée, une imagerie par résonance magnétique (IRM) peut être utile. L'intestin grêle est examiné par scanner (ou tomodensitométrie) et plus précisément par un entéro-scanner qui est un scanner réalisé après remplissage du grêle avec un liquide opaque ou avec de l'eau. Pour éviter l'irradiation répétée du scanner on utilise de plus en plus (sauf dans le cadre de l'urgence) une imagerie par résonance magnétique (IRM). L'IRM est un peu moins disponible et un peu plus coûteuse que le scanner mais elle donne des informations à peu près comparables. Pour bien voir l'intestin on demandera une entéro-IRM.



Figure 16 : Aspect radiologique (entéro-IRM) de l'iléon terminal.

La coloscopie permet d'examiner directement la muqueuse du côlon et de la partie terminale de l'intestin grêle (*fig. 17*). En plus, de faire des prélèvements (biopsies) qui seront étudiés au microscope. L'examen complet du grêle peut être réalisé par une vidéo capsule, qu'on avale par la bouche et qui stocke des images tout au long de son transit dans l'intestin. La principale contre-indication de la vidéo capsule est l'existence d'un rétrécissement (ou sténose) dans lequel peut se bloquer la capsule.



Figure 17. Vue endoscopique d'une ulcération iléale longitudinale au cours de la MC.

5.2.3. Physiopathologie de la maladie de Crohn

L'homéostasie de l'intestin est maintenue à l'état normal sans développement d'inflammation intestinale. L'altération du système immunitaire intestinal joue un rôle important dans sa pathogénèse. A l'heure actuelle, la cause exacte de la maladie de Crohn, en tant qu'elle est une maladie chronique de l'intestin, n'est pas encore entièrement identifiée. Cette pathologie est multifactorielle et implique le rôle d'une flore intestinale perturbée et le dysfonctionnement des voies immunitaires innées et adaptatives contribuent à la réponse inflammatoire aberrante de l'intestin (fig. 18).

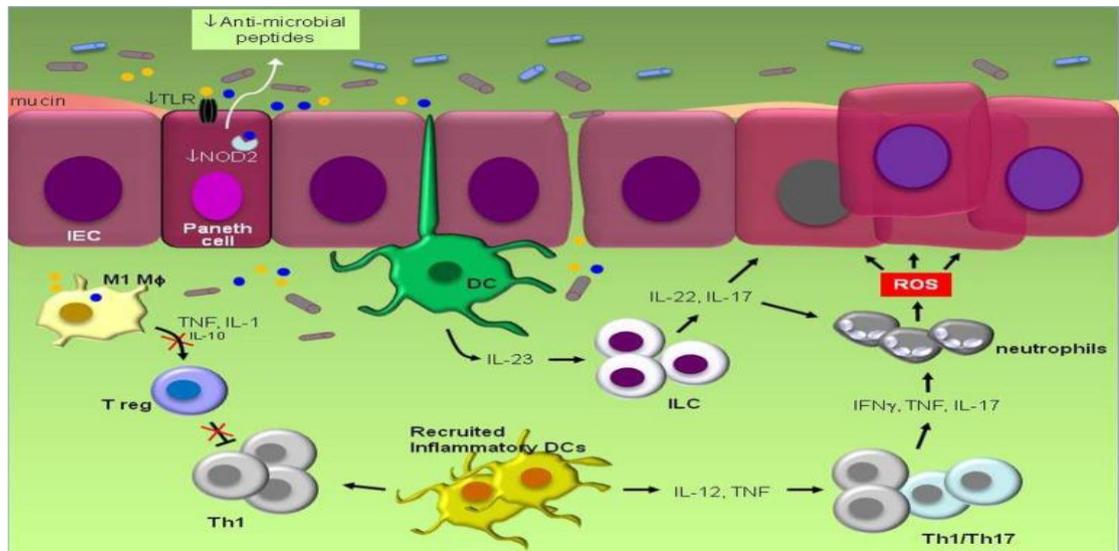


Figure 18 : Représentation schématique des événements physiopathologiques actuellement identifiés dans les maladies inflammatoires chroniques expérimentales

A. Altération des barrières intestinales

Perturbation de la barrière intestinale peut permettre une invasion des micro-organismes pathogènes, des bactéries commensales et des antigènes alimentaires. Ces agents sont impliqués dans la pathogénèse des maladies intestinales.

- **Cellules épithéliales** au cours de MC, le rôle de la cellule épithéliale peut être perturbé. La production de lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) par les cellules épithéliales est diminuée.
- **Jonctions intercellulaires**

La perméabilité paracellulaire chez les sujets atteints de MC est augmentée à cause d'une altération de la structure des jonctions serrées. Elles ont subi une diminution de leur nombre. La modification de la morphologie des jonctions serrées est souvent le résultat de modifications

de l'expression de ses protéines. Une expression réduite de la claudine 3, 5 et 8 alors que l'expression de la claudine 2 est augmentée. Ce dernier favorise la formation des pores. En plus, les changements de jonctions serrées sont la conséquence de modifications du profil local des cytokines. La production accrue de $TNF\alpha$ par les lymphocytes contribue à une expression élevée de la claudine 2 dans la MC.

B. Réponse inflammatoire de l'intestin

La dérégulation du système immunitaire muqueux est caractérisée par une réponse inflammatoire exagérée et une cascade de mécanismes. La stimulation anormale des cellules résidentes de la muqueuse intestinale est à l'origine de l'activation des voies de transduction, notamment $NF-\kappa B$. Cette activation permet la production de médiateurs inflammatoires (cytokines) impliqués dans le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires du sang vers la paroi intestinale via la surexpression de molécules d'adhésion. Ce mécanisme aboutit à la formation d'un infiltrat de cellules inflammatoires dans la paroi intestinale. Enfin l'inhibition des mécanismes d'apoptose qui provoque une augmentation de la survie de ces cellules inflammatoires et donc la chronicité de l'inflammation.

Une atteinte des macrophages, qui présentent une sécrétion de lymphokines altérée par dégradation au sein des lysosomes intracytoplasmiques (fig. 19). On constate ainsi qu'un traitement visant à inhiber les lysosomes restaure la sécrétion de cytokines. Les macrophages n'assurent plus le recrutement des polynucléaires, ce qui diminue la capacité de la muqueuse intestinale à éliminer une population bactérienne ainsi que les débris microbiens. Ceci entraîne une réponse granulomateuse médiée par les cellules T.

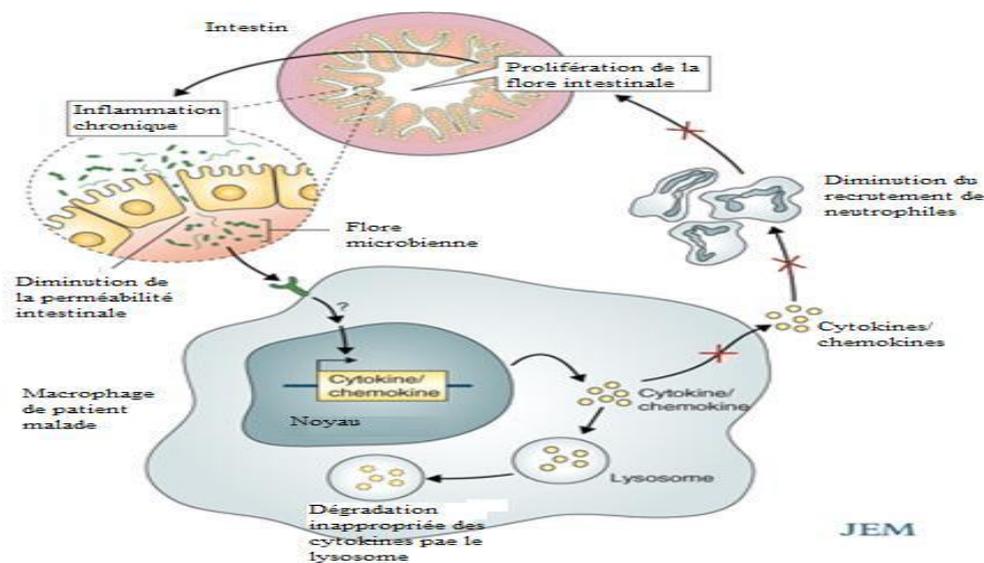


Figure 19 : Modèle d'inflammation chronique provoquée par un trouble inné du macrophage chez les patients atteints de maladie de Crohn (Casanova et Abel, 2009).

A. Cytokines pro-inflammatoire

Les lésions intestinales de MC sont associées à une augmentation de la synthèse des cytokines inflammatoires et probablement à un déficit relatif en cytokines anti inflammatoires. La balance locale muqueuse des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires gère la durée et l'intensité de la réaction inflammatoire (fig. 20).

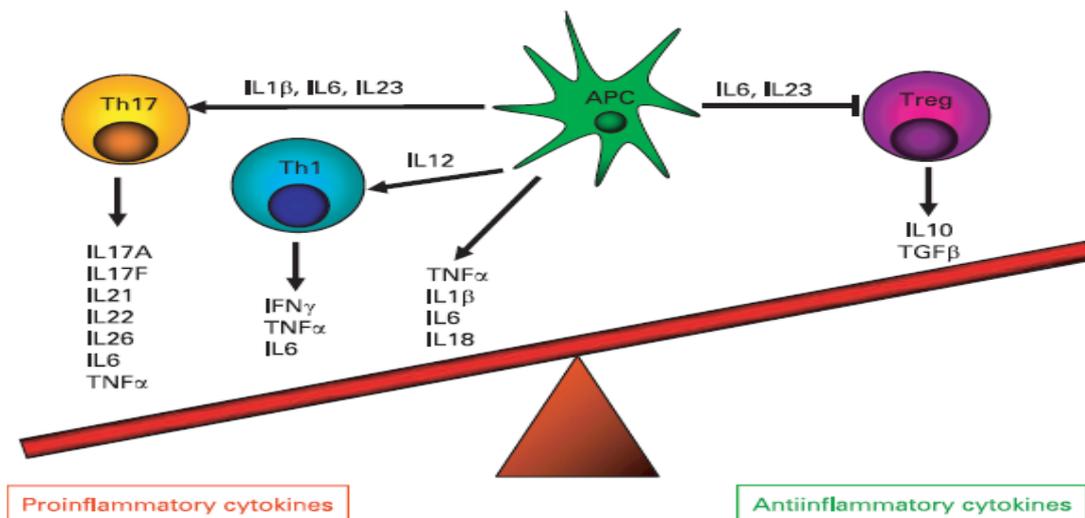


Figure 20 : Déséquilibre de la production des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans la MC .

Les cytokines pro-inflammatoire possèdent une forte influence au niveau local et contribuer ainsi à la chronicité de l'inflammation. Elles peuvent également avoir des effets systémiques.

➤ **Effet local**

Les cytokines pro-inflammatoires : TNF, IL-6 et IL-1 β , IL17 sont impliquées dans les lésions inflammatoires intestinales chroniques de patients atteints de MC.

L'expression de TNF est présente dans les lésions au niveau de la muqueuse, de la sous-muqueuse et de la séreuse. La principale source cellulaire dans la lamina propria est le macrophage mais également la graisse mésentérique. Dans les MC, le TNF stimule les fibroblastes intestinaux à produire des quantités excessives de collagène et diminuant la mobilité des myofibroblastes, responsable d'une altération de la réparation des muqueuses. En plus, les concentrations élevées d'IL-6, en action avec l'IL-23, entraînent une stimulation des lymphocytes Th17 qui vont produire les cytokines inflammatoires IL-17 et IL-17F. L'IL-6 est capable de rendre les cellules T réfractaires à l'inhibition par les T régulateurs et d'entraîner une production de collagénase effectrices par les cellules musculaires conduisant à une fibrose. Une autre cytokine, IL1 β , la production soutenue d'IL-1 β entraîne un défaut de réparation intestinale, compromettant l'intégrité du mur intestinal. De plus, l'IL-1 β initie l'inflammation du côlon en recrutant les granulocytes et en activant la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes Th17. Une augmentation de la production d'IL-17 par les cellules T de la muqueuse est également observée dans la MC. L'IL-17 peut agir directement sur les myofibroblastes du côlon, ce qui est un facteur déterminant dans le développement de sténoses. De plus, l'IL-17 surproduit dans ces sténoses, agit directement sur les myofibroblastes sub-épithéliaux (cellules de réparation post-inflammatoire), qui expriment l'IL- 17R. Ceci entraîne un défaut de migration de ces cellules et une production intensive de collagène, favorisant la fibrose tissulaire.

➤ **Effet systémique**

Des effets au niveau de différents organes sont ainsi retrouvés au cours des maladies inflammatoires chroniques. Au niveau du cerveau, le TNF et l'IL-1 sont capables d'induire de la fièvre en augmentant la production de prostaglandine E2 par les cellules endothéliales de l'hypothalamus. Au niveau de neurotransmetteurs, le relargage de ces cytokines telles que l'IL-6 ou le TNF peut induire des changements chimiques et physiologiques au niveau du système nerveux central. Ceci peut expliquer la prévalence des troubles d'anxiété et de dépression chez les patients atteints de MC. Au niveau du foie, le TNF et surtout l'IL-6 induisent la synthèse de protéines de phase aiguë de l'inflammation telles que la CRP (protéine C-réactive). Au niveau vasculaire, l'IL-17, en synergie avec le TNF, agit sur les cellules musculaires lisses en augmentant l'apoptose de ces cellules et favorisant l'athérosclérose. Ces cytokines ont une action pro-coagulante et augmentent l'agrégation plaquettaire favorisant la thrombose.

5.3. Polyarthrite rhumatoïde

5.3.1. Définition

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est un rhumatisme inflammatoire chronique qui résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire, caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes.

Le terme « arthrite » désigne toute inflammation d'une ou plusieurs articulations de l'organisme. Cette inflammation peut être aiguë, c'est-à-dire d'apparition brutale et d'évolution rapide, ou au contraire chronique. Elle se caractérise par une inflammation de la membrane synoviale (synovite) qui va sécréter de la synovie en quantité anormale et qui va s'accumuler dans l'articulation, et produire un épanchement de synovie. La synovite va engendrer un gonflement de l'articulation et la rendre douloureuse.

Le terme « rhumatisme » est utilisé pour définir, d'une manière assez large, différentes affections osseuses, articulaires ou péri-articulaires. Sans être spécifiques aux articulations, les rhumatismes regroupent donc des affections qui touchent l'ensemble de l'appareil locomoteur. Par abus de langage, ce terme est couramment employé pour désigner l'arthrose, qui est la maladie rhumatismale la plus fréquente et qui résulte de la dégénérescence du cartilage articulaire, due principalement au vieillissement (fig. 21). Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, plusieurs articulations sont infectées. C'est pour cette raison que l'on utilise le terme de polyarthrite.

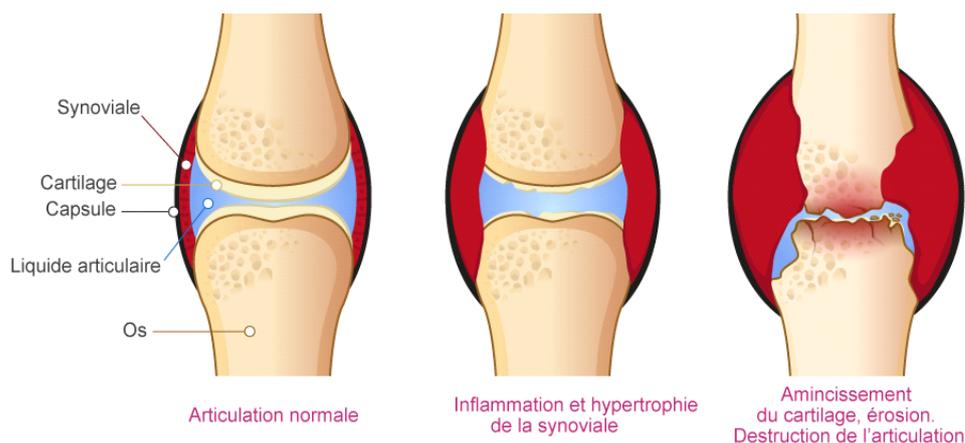


Figure 21: schéma montrant le développement de la polyarthrite rhumatoïde.

5.3.2. Diagnostic

Le diagnostic doit être aussi précoce que possible, afin de permettre une prise en charge immédiate du malade ce qui augmente considérablement l'efficacité de la thérapeutique. Le diagnostic précoce n'est pas aisé, car les symptômes observés peuvent correspondre à d'autres maladies dont le traitement et le pronostic sont différents. Pour élaborer le diagnostic, certains examens complémentaires sont nécessaires : examens du sang, radiographies ...

Au début de la maladie il n'existe aucune anomalie visible à la radiographie des articulations. Les signes radiographiques n'apparaissent que lorsque l'inflammation de la synoviale a induit des lésions du cartilage articulaire. Ils sont donc tardifs.

Le diagnostic repose sur trois objectifs majeurs :

- (1) Identifier un rhumatisme inflammatoire débutant susceptible de correspondre à une PR.
- (2) Evincer un autre rhumatisme inflammatoire défini.
- (3) Rechercher la présence d'éléments évoquant l'évolution vers une PR destructive.

A. Diagnostic différentiel

Lorsque le diagnostic de polysynovite (gonflements articulaires) est certain, il faut alors savoir rechercher les signes des autres diagnostics potentiels (par l'interrogatoire et l'examen clinique essentiellement). Pour confirmer le caractère « nu » de la polysynovite (cela signifie qu'il n'existe aucun signe extra-articulaire ou axial associé).

B. Moyens de diagnostic

Il n'y a pas de test diagnostique spécifique de polyarthrite rhumatoïde. Le diagnostic est suspecté devant l'association de différents éléments :

- À l'examen : présence d'une polyarthrite touchant les mains et les pieds,
- À la prise de sang : un syndrome inflammatoire biologique et la présence d'auto-anticorps qui sont des marqueurs de Polyarthrite Rhumatoïde, comme le facteur rhumatoïde et les anticorps anti peptides cycliques citrullinés (anti CCP) ou anticorps anti-peptide citrullinés (ACPA), sans oublier le liquide synoviale
- Sur les examens d'imagerie médicale (radiographies, échographie, Imagerie par résonance magnétique ou IRM).

C. Analyses immunologiques

Le diagnostic via un marqueur immunologique nécessite que ce dernier soit très spécifique et très sensible. En ce qui concerne le diagnostic de la PR, les anticorps essentiellement recherchés sont listés ci-dessous et présentés avec leurs spécificités et sensibilités respectives (Tableau 5)

Tableau 5 : Les principaux anticorps recherches avec leurs spécificités et leur sensibilité.

Anticorps	Fréquence dans la population générale	Sensibilité	Spécificité	Valeur Pronostique	Valeur évolutive
FR IgM	5 à 10 %	70-85 %	65-85 %	OUI	NON
FR IgA	5 à 10 %	60-80 %	60-80 %	OUI	NON
Anticorps Antifilagrine	1%	36-55 %	90-99 %	OUI	NON

Antipérimucléaires	3%	40-90 %	73-90 %	OUI	NON
--------------------	----	---------	---------	-----	-----

➤ **Le liquide synovial**

Le liquide synovial est de type inflammatoire, riche en cellules et constitué en majorité de polynucléaires neutrophiles. Parfois, la formule est à prédominance lymphocytaire. On peut retrouver du FR dans le liquide synovial, mais il est rare qu'il ne soit pas aussi présent dans le sang. Le taux de complément et de certaines de ses fractions est bas en raison de sa consommation par les complexes immuns, mais le dosage du complément synovial n'a pas d'intérêt clinique.

D. Imagerie médicale de la PR

Il se confirme que les techniques modernes d'imagerie, notamment l'IRM et l'échographie sont utiles comme aide au diagnostic et lors du suivi de la polyarthrite rhumatoïde. Néanmoins, plusieurs études récentes ont mis en évidence les limites de ces deux modes d'imagerie, et surtout, très peu de travaux se sont encore véritablement intéressés aux rapports coût/bénéfice de l'utilisation intensive de telles techniques d'imagerie en pratique clinique.

6. Techniques immunologiques

Les techniques immunologiques reposent sur une réaction antigène-anticorps. Ces techniques sont utilisées pour mettre en évidence, des antigènes ou des anticorps. Lorsqu'on veut détecter des antigènes, on doit disposer d'anticorps spécifiques correspondant à la spécificité antigénique recherchée. Ces anticorps peuvent être des immunoglobulines purifiées ou, plus fréquemment aujourd'hui, des anticorps monoclonaux. Lorsqu'on cherche à mettre en évidence des anticorps, on doit utiliser des antigènes de spécificité connue correspondant à celle des anticorps recherchés.

Les anticorps sont habituellement recherchés dans le sérum. On peut plus exceptionnellement les rechercher dans d'autres milieux biologiques tel que le liquide céphalorachidien. Les antigènes peuvent être mis en évidence dans le sérum, mais aussi dans d'autres prélèvements tels que les tissus.

Il existe de nombreuses techniques permettant de détecter les antigènes ou les anticorps. Le choix de la technique est fonction de différents paramètres :

- La concentration de l'antigène ou de l'anticorps.
- La forme de l'antigène : soluble ou particulaire.

- La localisation de l'antigène ou de l'anticorps.

6.1. Production des Ac monoclonaux

Dans la technique de base, la production des Ac monoclonaux se déroule en deux étapes principales, à savoir, la production *in vivo* (immunisation) de cellules lymphoïdes sécrétant des Ac, leur hybridation et la sélection *in vitro* d'un hybridome producteur d'Ac, puis la multiplication de clones de l'hybridome, soit *in vitro*, soit *in vivo*, afin d'obtenir de grandes quantités d'Ac (fig.22).

6.1.1. Obtention et sélection des hybridomes

L'antigène contre lequel on veut préparer des Ac est injecté à l'animal avec ou sans adjuvant. Des injections de rappel sont réalisées. Les cellules lymphoïdes de la rate ou des ganglions lymphatiques de l'animal sont isolées (Fig. 22). Elles sont ensuite fusionnées, en présence de polyéthylène glycol, avec des cellules myélomateuses préalablement cultivées et sélectionnées *in vitro*. Le mélange de toutes ces cellules (hybrides et cellules parentales) est placé sur un milieu de culture sélectif appelé milieu HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine).

La sélection par le milieu HAT dépend du fait que les cellules de mammifères peuvent synthétiser les nucléotides par deux voies différentes : la voie *de novo* et la voie de récupération. La voie *de novo*, dans laquelle un groupe méthyle ou formyle est transféré à partir d'une forme activée du tétrahydrofolate, est bloquée par l'aminoptérine, qui est un analogue de l'acide folique. Lorsque la voie *de novo* est bloquée, les cellules utilisent la voie de récupération, qui contourne le blocage par l'aminoptérine en incorporant directement les purines et les pyrimidines dans les nucléotides nécessaires à la synthèse du ADN et du ARN. Les enzymes qui catalysent la voie de récupération incluent HGPRT et TK. Une mutation de l'un ou l'autre de ces deux enzymes bloque la capacité de la cellule à utiliser la voie de récupération et entraîne sa mort dans le milieu HAT.

Dans la technologie des hybridomes, les cellules de myélome utilisées sont, en fait, des doubles mutants. Comme mentionné précédemment, elles n'ont pas l'enzyme HGPRT. Elles ont aussi perdu la capacité de produire des immunoglobulines (mutants Ig-). En utilisant des mutants Ig-, on s'assure que les Ac produits par l'hybridome ne sont codés que par les cellules spléniques et que les cellules de myélome n'apportent que leur propriété d'immortalité aux cellules résultant de la fusion. L'autre partenaire de la fusion est habituellement une population de cellules

spléniques contenant des cellules B HGPRT⁺ activées par l'antigène (Ig⁺). Ces cellules contribuent à la capacité des hybridomes à utiliser la voie de récupération de l'hypoxanthine, ce qui rend ainsi possible leur survie dans le milieu HAT. Quant aux lymphocytes B non fusionnés, ils disparaissent au bout de quelques jours, car ils sont incapables de se répliquer *in vitro*. De même, si des hybrides se forment entre cellules B ou entre cellules de myélome, ils disparaissent spontanément.

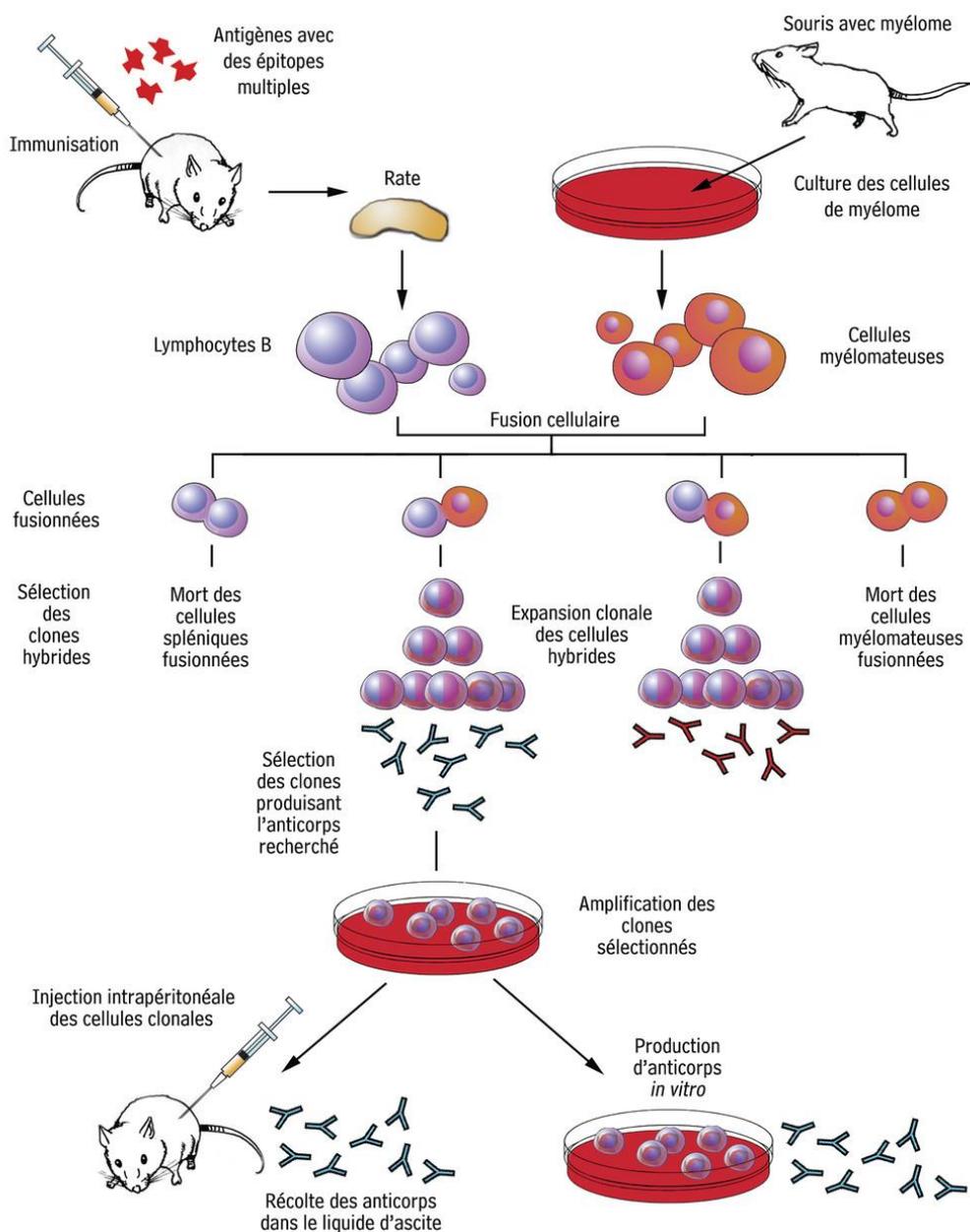


Figure 22: Production d'anticorps monoclonaux.

7. Techniques d'immuno-dosages

L'immuno-dosage est basé sur la formation des complexes immuns *in vitro* c'est-à-dire la combinaison d'un épitope d'un Ag avec le paratope de l'anticorps correspondant (spécifique). Cette réaction est mise à profit pour la recherche et/ou le dosage d'un Ag (ou d'un Ac) dans un milieu biologique.

7.1. Immuno-dosage sans marqueur

7.1.1. Techniques d'immunoprécipitation

Une réaction de précipitation est une réaction mettant en jeu des antigènes solubles et des anticorps spécifiques précipitants. La formation de complexes immuns aboutit à un édifice multimoléculaire qui peut dans certaines conditions précipiter en solution.

Dans cette réaction :

- Les antigènes sont solubles et ayant plusieurs épitopes.
- Les anticorps sont précipitants, polyclonaux.

Selon le milieu dans lequel se déroule la réaction : Ces réactions peuvent s'observer Soit en milieu liquides, soit en milieu gélifié.

A. Précipitation en milieu liquide

Lorsque des quantités suffisantes d'anticorps sont mélangées avec un antigène soluble on peut observer une réaction de précipitation. Le précipité ainsi formé est composé de larges agrégats d'antigène reliés les uns aux autres par des molécules d'anticorps. La quantité de précipité dépend non seulement de la quantité d'anticorps et d'antigène mais aussi du rapport entre les deux protagonistes.

En effet, dans la réaction de précipitation, si des quantités croissantes d'antigène soluble sont ajoutées à une quantité connue de sérum contenant l'anticorps à doser, on observe dans un

premier temps une corrélation directe entre la quantité d'antigène apportée et la quantité de précipité. La courbe de précipitation atteint alors un maximum et si la quantité d'antigène augmente encore, on note que la quantité de précipité tend cette fois à diminuer (fig. 23)

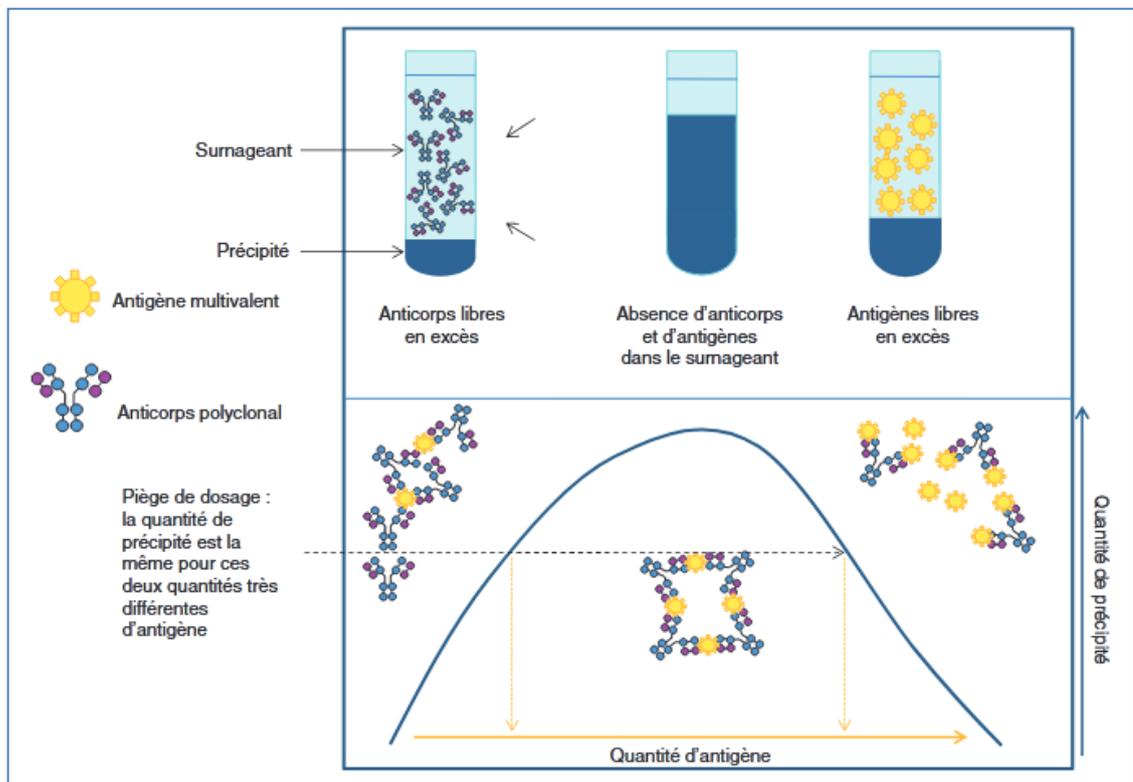


Figure 23 : Courbe de précipitation en milieu liquide

Deux principes optiques (fig. 24) 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 des complexes immuns insolubles. La néphélométrie, 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.

Avantages

- Spécificité de la réaction antigène-anticorps
- Rapidité

- Automatisation
- Nombreuses applications

Inconvénients

- Redissolution du précipité
- Concentrations critiques des antigènes et des anticorps
- Caractéristiques optiques des sérums
- Sensibilité modérée (mg/l)

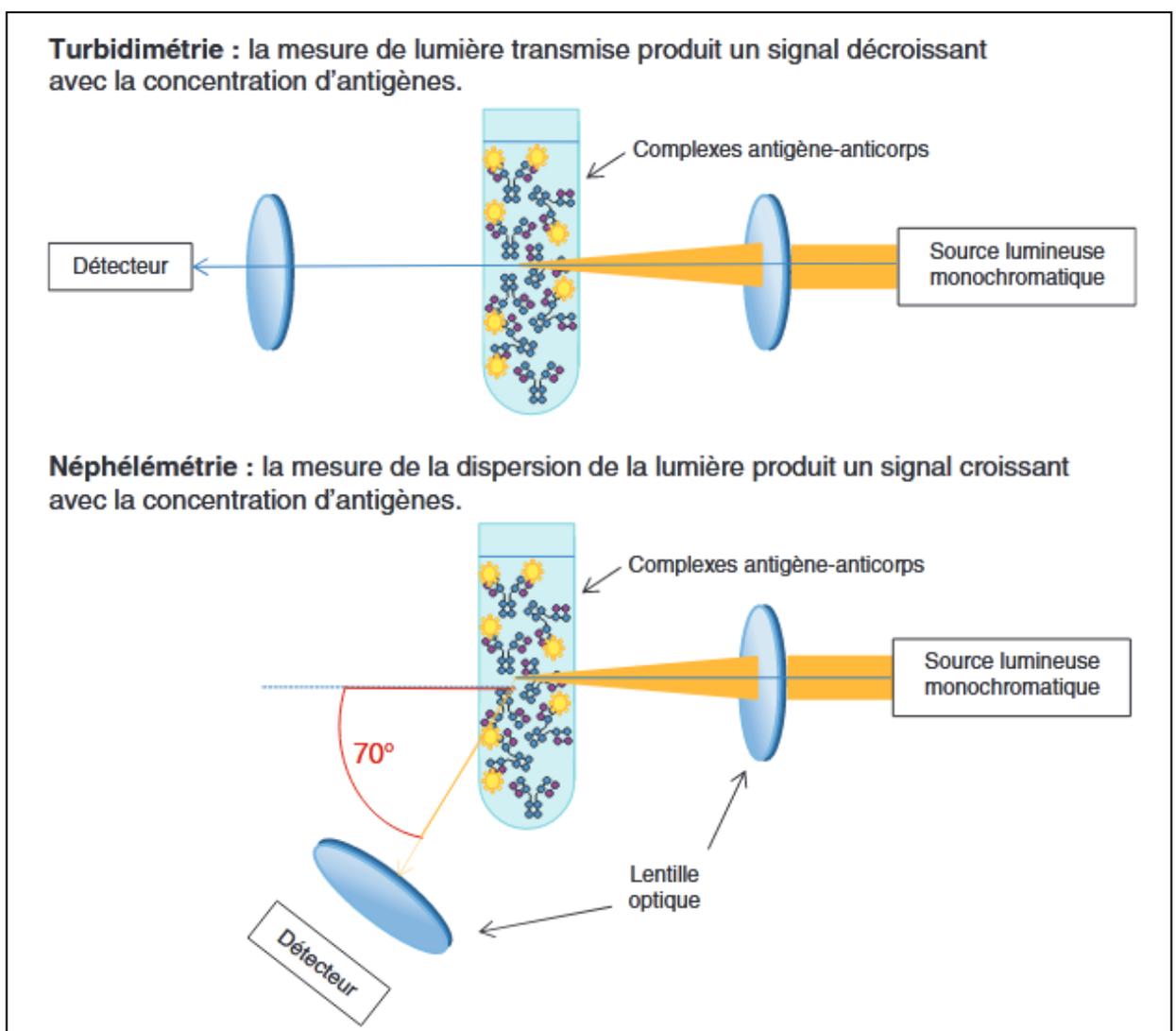


Figure 24 : Principes de la turbidimétrie et de la néphélométrie

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 Ac–Ag. 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 permettent le dosage des facteurs rhumatoïdes, de certaines sous-classes d'IgG et des chaînes légères libres.

B. Précipitation en milieu gélifié

Les méthodes de précipitation en milieu gélifié, ou immunodiffusion, 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 Ag-Ac. La densité du gel dicte la dimension des mailles du gel devant permettre la libre diffusion des molécules à analyser mais piéger le précipité.

- **Immunodiffusion selon Mancini**

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'anti- gène. 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 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. 25).

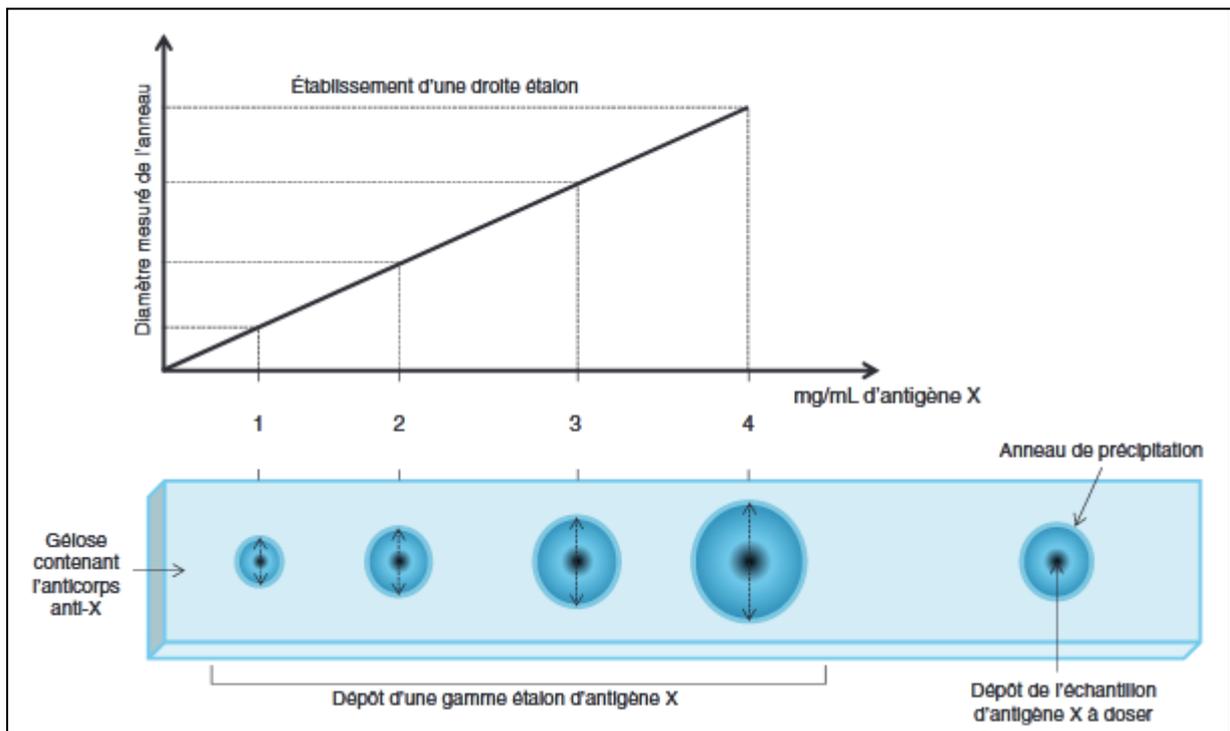


Figure 25: Technique de Mancini, immunodiffusion radiale.

- **Immunodiffusion double d'Ouchterlony**

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 Ag-Ac 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'antisérum, et les arcs de précipitation sont continus, car il s'agit du même système Ag-Ac : 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 Ag-Ac 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. 26).

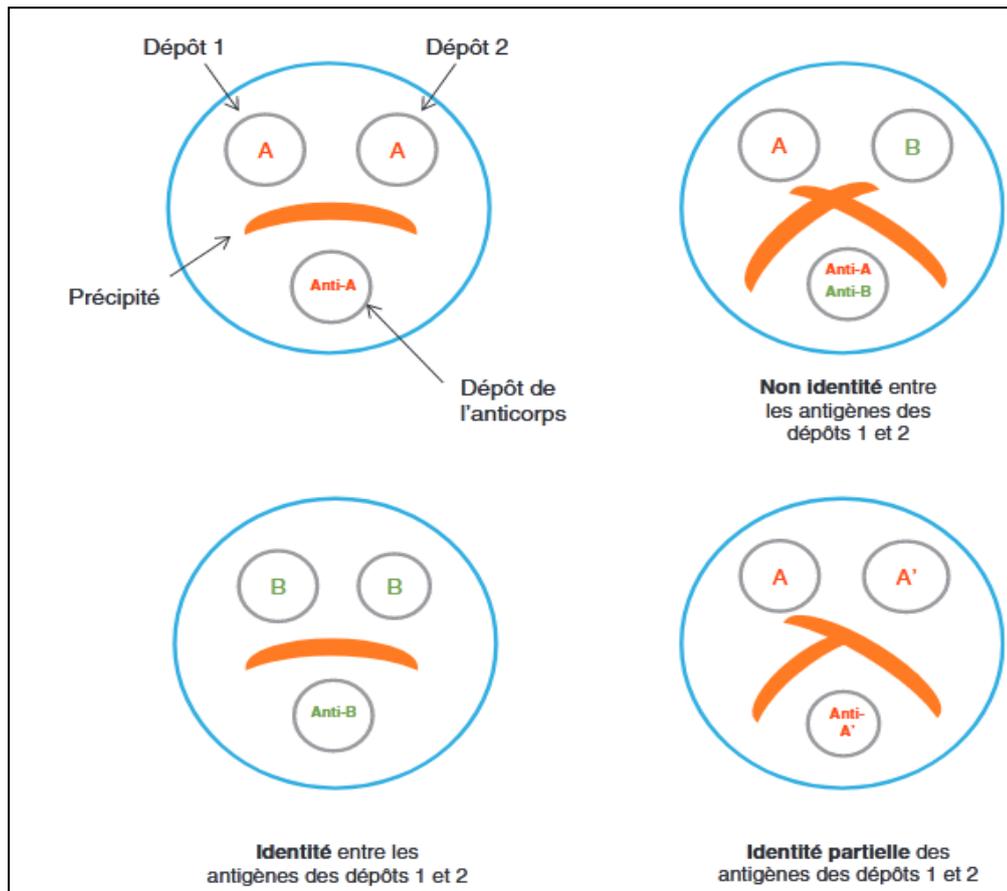


Figure 26 : Technique d'Ouchterlony, immunodiffusion double. Représentation schématique des arcs de précipitation obtenus en comparant deux dépôts d'antigènes identiques, différents ou partiellement identiques. A : antigène A ; A' : antigène A' partiellement identique à A mais plus complexe ; Anti-A : anticorps anti-A ; Anti-A' : anticorps anti-A' ; B : antigène B ; Anti-B : anticorps anti-B.

- **Immuno-électrophorèse**

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 y 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.

- **Electro-immunodiffusion selon Laurell**

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 échantillons à doser sont placés dans des puits pratiqués dans un gel contenant l'antisérum spécifique, puis soumis à une migration accélérée par électrophorèse. A l'équivalence, les complexes antigène–anti-corps 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.

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

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.

7.2. Immuno-dosage avec marqueur

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.

7.2.1. Dosages immuno-enzymatiques (ELISA)

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

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. 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 5, fig. 26).

Tableau 6 : 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

Les techniques ELISA comportent différentes étapes :

1. Immobilisation de la molécule à adsorber sur un support solide
2. Saturation du support adsorbant
3. Première réaction antigène–anticorps
4. Deuxième réaction antigène–anticorps
5. Révélation
6. Expression des résultats

Il faut noter qu'après chaque étape on doit réaliser des lavages (fig. 27).

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.

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.

7.2.2. Dosages immuno-fluorescents (FLISA)

Les dosages immuno-fluorescents (FLISA) ont le même principe que l'ELISA. Un fluorochrome est utilisé pour révéler la réaction dans la variante FLISA (*Fluorescence-Linked Immuno Sorbent Assay*).

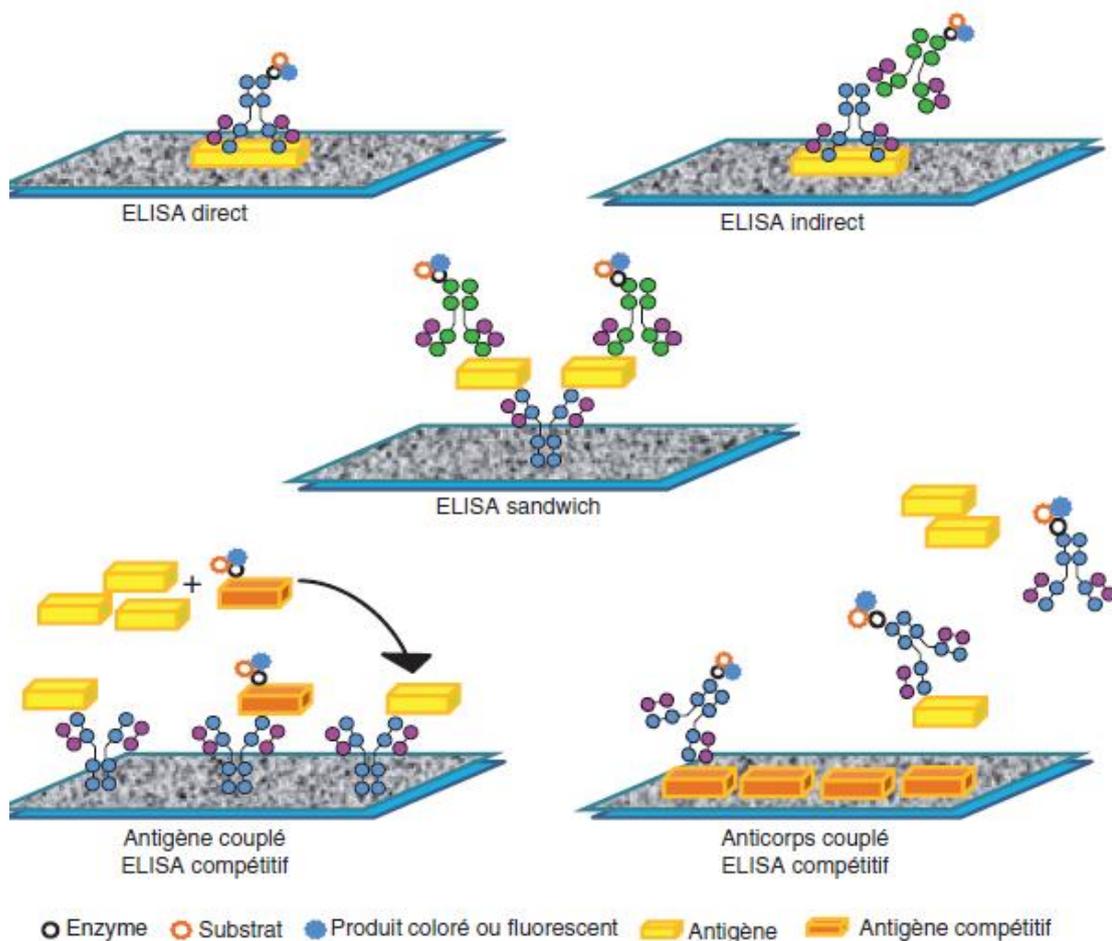


Figure 27 : Représentation schématique des différents types d'ELISA ou FLISA

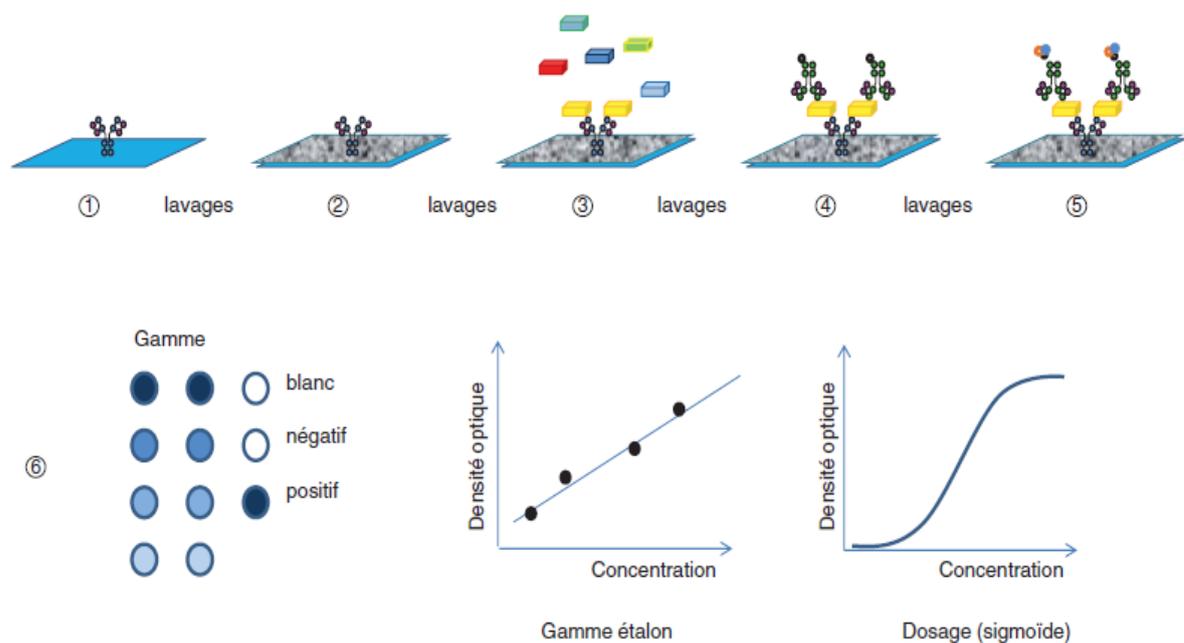


Figure 28 : Différentes étapes d'un ELISA de type sandwich.

7.2.3. Dosages radioimmunologiques (RIA)

Les techniques radio-immunologiques ont pu être mises au point à la suite de la découverte des radioisotopes 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 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.

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).

Avantages/inconvénients

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

REFERENCES

1. Balkwill, F., Tumor necrosis factor and cancer. *Nature Reviews cancer*, 2009. 9: p. 361-371.
2. Beavis PA., Gregory B., Green P., Cribbs A., Kennedy A., Amjadi P., Palfree- man A.,
3. Parslow, T. G.; Stites, DP.; Terr, AI.; and Imboden JB., *Medical Immunology* (ISBN 0-8385-6278-7)
4. Cavaillon, J.M., *Le Monde des cytokines*. Institut Pasteur. 2003.
5. Klareskog, L. Catrina, A.I and Paget, S. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2009. 373(9664): p 659-72.
6. Mistretta V.I., Valler Ca, Collette J., ChaPelle J.P. Production des anticorps monoclonaux. *Rev Med Liège* 2009; 64 : 5-6 : 248-252
7. Naugler, W.E., and M. Karin, The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol Med*, 2008. 14:109-119.
8. Ronnblom, L., Eloranta M.L, and G.V. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(2): p. 408-20.
9. <http://www.ebioscience.com/resources/pathways/hematopoiesis-from-pluripotent-sem-cells.htm>
10. https://fac.umc.edu.dz/vet/Cours_Ligne/cours_22_23/Biochimie_A4/Techniques_immunologiques.pdf