

Septième Partie :
IMMUNOTECHNOLOGIE CELLULAIRE

Chapitre A: LES TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE

La plupart des expériences effectuées, *in vivo* ou *in vitro*, par les immunologistes nécessitent des populations de lymphocytes purifiés. Les principales sources de lymphocytes sont le thymus, la rate et les ganglions périphériques. Les lymphocytes T recirculants peuvent être obtenus par cathétérisation du canal thoracique et collection du liquide lymphatique pendant quelques heures. Chez l'homme, les lymphocytes du sang périphérique sont les plus couramment utilisés. On utilise aussi les lymphocytes provenant de ganglions ou des amygdales obtenus par exérèse chirurgicale.

Plusieurs techniques sont utilisées pour séparer les lymphocytes et les sous-populations lymphocytaires: centrifugation simple ou en gradient de densité, les techniques de rosettes, l'adhérence spécifique et non spécifique, les séparations magnétiques, etc. Cependant les technologies utilisant des anticorps monoclonaux et les principes de la cytométrie de flux intégrés dans un trieur de cellules (L'analyseur-trieur de cellules ou Fluorescence-activated cell sorter: FACS), permettent aujourd'hui d'obtenir des populations de cellules quasiment pures.

I- LA TECHNIQUE DES GRADIENTS DE FICOLL

La séparation en gradient de densité est basée sur les différences de densité existant entre les lymphocytes et les autres cellules plus denses tels que les érythrocytes et les polynucléaires. Ce principe est appliqué pour isoler la majorité des lymphocytes du sang. Un échantillon de sang complet est défibriné par agitation sur billes de verre et le coagulat obtenu est éliminé. Le sang est alors dilué dans un milieu de culture est déposé à la surface d'un tube rempli à moitié de Ficoll. Le Ficoll est centrifugé. Les globules rouges et les polynucléaires (plus denses que le Ficoll) passent à travers et sédimentent au fond du tube. Alors que les lymphocytes et certains macrophages ont une densité plus faible que le Ficoll restent à l'interface du milieu et du Ficoll. Les macrophages peuvent être éliminés, des populations de lymphocytes, de deux manières:

- Par adhérence: la suspension cellulaire est déposée sur une surface plastique à laquelle seul les polynucléaires adhèrent. Les lymphocytes qui, eux, n'adhèrent pas, sont ensuite récupérés par lavage.
- Par phagocytose de particules de limaille de fer et déplétion des cellules phagocytaires avec un aimant.

II- NUMERATION DES LYMPHOCYTES

Elle constitue, actuellement, le premier examen à demander pour évaluer, *in vitro*, l'immunité à médiation cellulaire. Elle est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les marqueurs de différenciation (CD). Ces anticorps anti-CD se fixent, lors d'une réaction d'immunofluorescence, sur une population lymphocytaire isolée (en général, lymphocytes du sang périphérique chez l'homme). Il est ainsi possible de connaître soit le nombre absolu de lymphocytes T (CD2, CD3), soit le nombre de lymphocytes T correspondant à une sous-population donnée: CD4 pour les lymphocytes auxiliaires, CD8 pour les lymphocytes cytotoxiques.

III- LA TECHNIQUE D'ADHERENCE NON-SPECIFIQUE

Les macrophages adhèrent au plastique, ce qui permet de les éliminer des suspensions cellulaires en incubant celles-ci dans des boîtes de cultures en plastiques sur la surface desquelles ils vont s'attacher.

IV- LES TECHNIQUES D'ADHERENCE SPECIFIQUE (*panning en anglais*)

L'adhérence spécifique est une sorte de chromatographie d'affinité appliquée aux lymphocytes et elle est souvent utilisée pour éliminer (ou isoler) les sous-populations de cellules. On distingue les techniques utilisant des plaques et les techniques utilisant des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps spécifique.

IV.1- La technique utilisant des plaques couplées à un antigène ou à un anticorps

Elle consiste à séparer des cellules exprimant un antigène spécifique à l'aide de l'anticorps correspondant fixé de façon non-covalente sur le plastique d'une boîte de Pétri. Le mélange cellulaire est déposé sur la boîte recouverte de l'anticorps. Les cellules exprimant l'antigène se fixent sur la boîte. Les cellules non fixées peuvent être éliminées, avec précaution, par lavage de la boîte. On peut aussi fixer un antigène donné sur une plaque et les cellules exprimant un récepteur pour cet antigène s'accrochent sur la plaque. Dans certains cas, les cellules fixées peuvent être récupérées par un traitement enzymatique ou par changement des conditions de culture ou encore par refroidissement violent. Un exemple d'application de

cette technique est la séparation des cellules Th et Tc en utilisant des anticorps anti-CD4 ou anti-CD8; après avoir séparé les lymphocytes T des lymphocytes B grâce à un anti-immunoglobuline qui se fixe sur les anticorps de surface des cellules B.

Cette technique est mieux adaptée à l'élimination d'une population d'une suspension cellulaire; car les cellules qui se sont fixées sur la plaque sont souvent altérées.

IV.2- La technique des billes magnétiques

Une technique apparentée utilise des billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifique (par exemple anti-CD4). Ces billes sont mélangées à la population cellulaire et se fixent sur les cellules reconnues par leurs anticorps. Ces cellules peuvent alors être éliminées ou séparées par application d'un champ magnétique.

V- LA METHODE DES ROSETTES

Certaines cellules ont des récepteurs (molécules CD2) pour les érythrocytes. La méthode des rosettes utilise donc cette spécificité pour isoler certaines cellules en les associant avec des globules rouges. Les lymphocytes T humains expriment des récepteurs pour les érythrocytes de mouton et forment des rosettes quand ils sont mélangés avec ces érythrocytes. Ils peuvent ainsi être séparés des lymphocytes B (n'ayant pas formé de rosette) par centrifugation à travers un gradient de Ficoll. La séparation des cellules formant des rosettes permet leur purification.

Selon le même principe, on peut séparer les sous-populations cellulaires en fonction de l'expression d'autres récepteurs. Les lymphocytes exprimant des récepteurs pour le Fc des IgG (RFc γ) peuvent être isolés en les incubant en présence des globules rouges de bœuf sensibilisés par une dose subagglutinante d'anticorps IgG anti-érythrocytes de bœuf. L'anticorps forme un pont entre le globule rouge et le récepteur pour le Fc et les rosettes ainsi formées peuvent être isolées comme décrit précédemment.

VI- LA CYTOMETRIE EN FLUX

De nos jours, les cellules peuvent être analysées et isolées en fonction de leurs antigènes de surface et/ou de leur taille par un procédé connu sous le nom de cytométrie de flux. Ce sont des instruments qui peuvent analyser les caractéristiques (les propriétés) individuelles des cellules qui passent à travers un orifice à une haute vitesse. Passant dans un cytomètre sous forme d'un flot de gouttelettes, on peut mesurer leur taille, leur granulosité et leur fluorescence. Les cellules de l'échantillon peuvent être marquées avec des anticorps fluorescents différents (exemple des anticorps anti-CD4, etc.), permettant de mesurer la densité de surface d'un ou de plusieurs marqueurs différents. Les sous-populations cellulaires peuvent ainsi être identifiées en fonction de l'expression de ces molécules.

VI.1- L'analyseur-trieur de cellules (Fluorescence-activated cell sorter: FACS)

Le FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) est un appareil qui permet de réaliser une cytométrie en flux sur une population de cellules, de les analyser et de les trier en différentes sous-populations grâce à leurs marqueurs de surface qui sont souvent identifiées par des anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine. Chaque cellule est analysée et triée individuellement. Ces appareils mesurent la dispersion de la lumière, le volume et la fluorescence (**Figure 46**). Les paramètres de tri (taille, granulosité, intensité de fluorescence, etc.) sont définis par le manipulateur.

En pratique, les cellules de l'échantillon sont marquées avec des réactifs fluorescents détectant des molécules membranaires. Ces cellules sont alors introduites dans une chambre à partir de laquelle des gouttes, renfermant chacune une cellule, vont tomber et passer devant un faisceau laser. Grâce à des filtres appropriés et un jeu miroirs et de photomultiplicateurs, l'appareil enregistre l'intensité de la fluorescence de chaque cellule passant devant la source laser. Le système mesure la diffusion de la lumière aux petits angles (FSC: forward angle light scatter), à angle droit (RSC: right angle scatter) et l'intensité de la fluorescence pour au moins deux longueurs d'ondes différentes (rouge et verte), ce qui permet de détecter simultanément deux marqueurs de surface. Les gouttes peuvent être chargées électriquement et déviées de leur trajectoire sous l'impulsion d'un champ électrique. Par conséquent, le FACS permet une analyse multiparamétrique en déterminant pour chaque cellule la taille (diffusion de la lumière aux petits angles), la granulosité (diffusion de la lumière à angle droit) et l'intensité de fluorescence avec trois fluorochromes différents. On peut ainsi collecter une population cellulaire définie selon les paramètres choisis et mesurés. Cette technique permet ainsi le tri de populations cellulaires en fonction de leur expression de certains antigènes de surface qui seront marqués par des anticorps de différentes spécificités couplés à différents

Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)

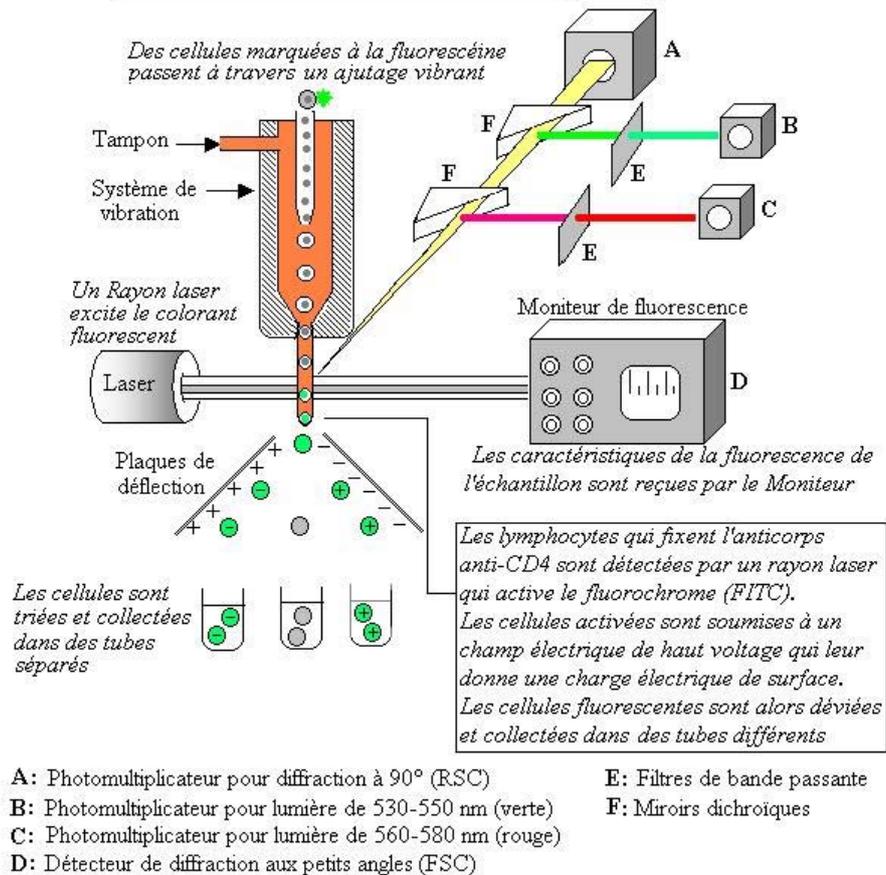


Figure 46

fluorochromes. C'est le cas par exemple de l'analyse des populations de thymocytes. Ainsi, avec 1 ml de sang total on peut dénombrer les cellules T CD4⁺, HLA-DR⁺ ou CD8⁺, CD25⁺, etc.

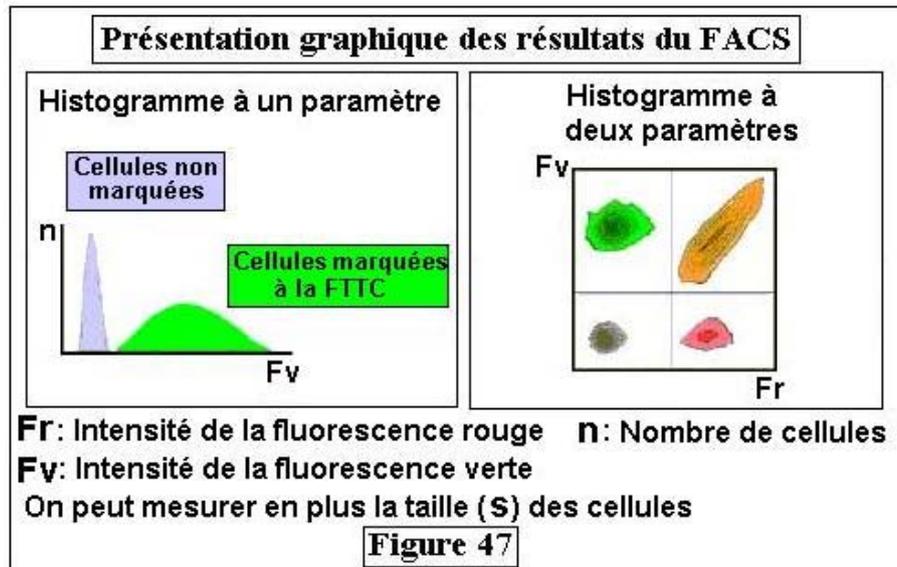
Par exemple, dans le cas de l'identification et de tri des sous-populations lymphocytaires, une suspension de leucocytes est incubée avec un anticorps monoclonal marqué dirigé contre les cellules CD4 auxiliaires (helper). L'échantillon lavé est alors introduit dans la chambre des échantillons du FACS et les cellules sont forcées à travers un ajutage par un jet de tampon. Par une vibration étudiée sur le bout de l'ajutage l'écoulement de l'échantillon se casse en gouttelettes. La taille des gouttelettes peut être réglée de telle sorte que chacune d'elle ne contient qu'une seule cellule. Les cellules passent devant un rayon laser qui excite le colorant fluorescent qui sera contrôlé par un détecteur de fluorescence. Les gouttelettes qui émettent un signal fluorescent approprié seront chargées électriquement dans un champ de très haut voltage entre le détecteur et la plaque de déflexion et sont séparées dans des tubes de collection. Les cellules CD4 helpers seront ainsi séparées des autres leucocytes sur la base de la fluorescence de l'anticorps anti-CD4 fixé.

Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes (**Figure 47**) représentant le nombre (n) des cellules en fonction de l'intensité de la fluorescence verte (Fv) et rouge (Fr) et aussi de la taille (s) de chaque cellule sur une échelle logarithmique arbitraire de quatre décades de 10 à 10⁴. La détermination du seuil permet de distinguer les cellules positives ou négatives exprimant ou n'exprimant pas l'antigène étudié.

VII- LA TECHNIQUE DE SUICIDE PAR L'ANTIGÈNE.

Cette technique est utilisée pour éliminer les cellules spécifiques d'un antigène donné. L'incubation d'une population cellulaire avec cet antigène fortement radioactif provoque la mort des sous-populations de ces cellules qui captent l'antigène radioactif. Les exemples d'application de cette technique sont nombreux. D'ailleurs, la capacité de la thyroïde à capter, à concentrer et à incorporer l'iode dans la thyroglobuline est utilisée pour traiter certains goitres en utilisant l'iode radioactif sans avoir recouru à la chirurgie. Une modification de cette technique permet de tuer spécifiquement les cellules en prolifération en les incubant en présence de bromodésoxyuridine. Un rayonnement UV active ce métabolite qui tue les cellules qui l'ont

incorporé.



VIII - LA TECHNIQUE DE LYSÉ DÉPENDANTE DU COMPLÉMENT

Une sous-population de cellules peut être sélectivement éliminée par traitement avec un (ou des) anticorps spécifique(s) d'un (ou des) antigène(s) membranaire(s) en présence de complément. Ainsi, les complexes formés entre les anticorps et les antigènes cellulaires entraînent la fixation du complément et son activation par la voie classique. Le résultat de cette activation est la formation de complexes d'attaque membranaire qui provoquent la lyse de la sous-population cellulaire en question.

Chapitre B: QUELQUES TECHNIQUES DE MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DE CERTAINS LYMPHOCYTES

Différentes méthodes peuvent être utilisées pour mesurer les fonctions effectrices des lymphocytes, telles que la production d'anticorps, la cytotoxicité, les fonctions auxiliaires (Th) et suppressives.

I- LA MISE EN EVIDENCE DE CELLULES PRODUCTRICES D'ANTICORPS

Les cellules productrices d'anticorps peuvent être détectées et quantifiées au moyen de plusieurs techniques: techniques de la microgoutte, techniques avec détection intracytoplasmique des anticorps, techniques de plages d'hémolyse en gélose directe (de Jerne et Nordin) et indirecte (de Dresser et Wortis ou Sterzl et Riha), techniques de plages d'hémolyse directe ou indirecte (de Cunningham et Szenberg), technique immuno-enzymatique appelée ELISPOT, techniques d'immunocyto-adhérence ou technique des rosettes, etc. Certaines de ces techniques ont été étudiées plus haut.

II- LA MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE DES CELLULES T

L'activité des lymphocytes T cytotoxiques est habituellement estimée par leur capacité à détruire des cellules cibles (cellules infectées par un virus, cellules tumorales, cellules allogéniques) marquées avec un radioélément (technique de relargage du chrome). Mais, elle peut aussi être évaluée soit par la fonction de sécrétion de cytokines après activation spécifique de l'effecteur par les antigènes viraux (technique ELISPOT, marquage intracellulaire), soit encore par la mesure de l'expression de surface d'un récepteur particulier spécifique d'un épitope viral (technique dite des tétramères) soit encore par l'évaluation des fonctions auxiliaires et suppressives. Les effecteurs T spécifiques d'antigènes sont souvent détectés par le test de stimulation lymphocytaire en mesurant la synthèse d'ADN par incorporation de précurseurs radioactifs.