



association des collèges
des enseignants d'immunologie
des universités de langue française

Campus

MÉTHODES en immunologie

Des principes aux bonnes applications

2^e édition

Principes
généraux

Recommandations
de mise en œuvre

Exemples
d'application



ELSEVIER

Elsevier Masson



Table des matières

Liste des collaborateurs	IX
Avant-propos	XIII
Abréviations	XV
Introduction générale	XIX

I Techniques immunologiques

Chapitre 1	
L'antigène comme réactif : définition et propriétés	3
Caractéristiques des antigènes	3
Nature chimique, origine et localisation des antigènes	3
Thermodynamique de la réaction antigène-anticorps	4
Qualité de l'antigène et interactions antigène-récepteur	5
Propriétés des antigènes influant sur les méthodes de dosage	5
Autres facteurs conditionnant l'interaction antigène-récepteur	5
Particularités des allergènes	8
Chapitre 2	
Les anticorps comme réactifs et outils thérapeutiques	11
Rappels sur les anticorps	11
Préparation d'anticorps polyclonaux	12
Préparation d'anticorps monoclonaux	15
Ingénierie moléculaire des anticorps	18
Fragments d'anticorps recombinants (18). Fragments d'anticorps recombinants solubles (18). Fragments d'anticorps recombinants intracellulaires (18). Fragments d'anticorps recombinants multivalents, multispécifiques ou multifonctionnels (21).	

Fragments d'anticorps à domaine unique (22).	
Fragments d'anticorps exprimés à la surface d'un bactériophage (22). Anticorps chimériques (23).	
Anticorps humanisés (23). Anticorps humains (24).	
Applications des anticorps monoclonaux	24
Conservation des anticorps	25

Chapitre 3	
Techniques sans traceur	27
Immunoprécipitation	27
Immunodiffusion	29
Immunochromatographie	33
Mesure d'affinité par résonance plasmonique de surface	35
Agglutination immunologique	38
Mise à profit des capacités cytotoxiques du complément	41

Chapitre 4	
Techniques avec traceurs	43
Types de traceurs	43
Les enzymes comme traceurs (43).	
Les fluorochromes comme traceurs (47).	
Les radio-isotopes comme traceurs (48).	
Dosages immuno-enzymatiques (ELISA) ou immuno-fluorescents (FLISA)	49
Des dosages radio-immunologiques (RIA) à la spectrométrie de masse	53
Dosages radio-immunologiques (53).	
Spectrométrie de masse (54).	
Immunodosages multiplexes	57
Immuno-empreinte/western blot	60
Immunofixation	63
Puces à protéines (<i>protein arrays</i>)	63
Cytométrie en flux	65
Marquages cellulaires et tissulaires, immunocytologie et immunohistologie	73
Puce tissulaire (<i>tissue microarray</i>)	77
ELISpot et FLUOROSpot	79

Chapitre 5

Techniques de biologie moléculaire 83

Techniques d'amplification utilisées en immunologie	83
Réaction de polymérisation en chaîne (83). RT-PCR (85). qRT-PCR ou RT-PCR quantitative (85). Génotypage par PCR-SSO, PCR-SSP et PCR-SBT (87). Immuno-PCR (89). Avantages/inconvénients (90).	
Méthodes de séquençage	91
Diagnostic de clonalité, analyse du répertoire	92
Puces à ADN (<i>DNA microarrays</i>)	96
Principe (96). Hybridation génomique comparative sur puce (<i>CGH array</i>) (97).	
Transcriptomique	100
Transfections cellulaires d'ADN	102
Transfection d'ARN	104
Modification du génome : CRISPR-Cas9	104
Protéomique	105
Protéomique conventionnelle (106). Protéomique et imagerie MALDI (110).	

Chapitre 6

Tests cellulaires 115

Étude cytologique des cellules immunitaires ...	115
Immunophénotypage	118
Séparation et tri cellulaire	119
Techniques de séparation par densité (120). Techniques de séparation en phase solide (121). Tri cellulaire par cytométrie en flux (122).	
Culture cellulaire et co-cultures	124
Prolifération cellulaire	126
Cytotoxicité, fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8 ⁺ et des cellules NK	130
Apoptose	134
Évaluation de l'altération des membranes plasmiques liée à l'apoptose (136). Mesure des modifications mitochondriales liées à l'apoptose (138). Mesure de l'activation des caspases (138). Étude de la fragmentation de l'ADN (140). Avantages/inconvénients (141). Exemples d'applications (141).	
Autophagie et système immunitaire	141
Autophagie (141). <i>Monitoring</i> de l'activité autophagique (143). Xénophagie (147). <i>Monitoring</i> des conséquences cellulaires de la dérégulation de l'autophagie (149).	
Suppression	150
Phagocytose	153
Phagocytose conventionnelle (153). Phagocytose assistée par LC3 (155).	
Bactéricidie	156
Métabolisme oxydatif	157
Dégranulation	162

Migration cellulaire/adhérence	164
Tests phénotypiques ou génotypiques classiques (165). Tests fonctionnels classiques (165). Tests quantitatifs par méthodes physiques (167). Tests fonctionnels des intégrines en cytométrie en flux : les anticorps conformationnels (169).	

Chapitre 7

Modèles et tests *in vivo* 171

Pertinence des modèles animaux	171
Les différentes espèces utilisées (171). Points clés des modèles souris (172). Différents types de lignées de souris (172). Aspects éthiques et législatifs (174).	
Transgénèse, KO-KI	174
Transgénèse additionnelle (174). KO ou KI (175). cKO (178). <i>Knockdown</i> géniques (178).	
Autres modèles animaux : <i>Danio rerio</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> et <i>Caenorhabditis elegans</i>	179
<i>Danio rerio</i> (zebrafish) (179). Modèles invertébrés : <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>Drosophile</i>) et <i>Caenorhabditis elegans</i> (182).	
Tests cutanés	184

II

Exemples d'applications

Chapitre 8

Exploration du complément 191

Dosage hémolytique du complément	191
Dosage des fractions du complément	192
Exploration des récepteurs du complément ...	195
Exploration des produits de clivage des protéines du complément	196

Chapitre 9

Exploration des immunoglobulines 199

Immunoglobulines monoclonales : méthodes diagnostiques	199
Recherche d'anticorps spécifiques	209

Chapitre 10

Exploration de pathologies impliquant le complément 213

Syndrome hémolytique et urémique atypique	213
Angio-œdème à kinines	214

Chapitre 11

Détection/dosage des cytokines et de leurs récepteurs 217

Chapitre 12

Exploration du complexe majeur d'histocompatibilité **225**

Réactions cellulaires	226
Tétramères CMH-peptides	226
Exemples d'applications	226

Chapitre 13

Hypermutations somatiques et translocations chromosomiques **227**

Hypermutations somatiques	227
Translocations chromosomiques	229

Chapitre 14

Immunohématologie **231**

Techniques sérologiques par hémagglutination	234
Hémagglutination directe (235). Hémagglutination indirecte (235). Techniques en microplaques (235). Hémagglutination en tube (235).	

Alternatives à l'hémagglutination	235
Immuno-adhérence (235). Génotypage (236). Autres techniques (237).	

Chapitre 15

Immuno-informatique **239**

IMGT®	239
Approche génomique (239). Approche génétique (239). Approche structurale (240). IMGT/mAb-DB (240).	
IMGT-ONTOLOGY	241
Identification (242). Classification (242). Description (242). Numérotation (242).	
Exemples d'outils IMGT®	244
IMGT/V-QUEST (244). IMGT/HighV-QUEST (244). IMGT/DomainGapAlign (245). IMGT/Collier-de-Perles (245).	
IMGT/3Dstructure-DB	245

Index **247**

MÉTHODES en immunologie

Des principes aux bonnes applications



L'ouvrage

Cet ouvrage rédigé sous l'égide de l'Assim, offre un tour d'horizon complet et synthétique de toutes les méthodes actuelles en immunologie. Il en recense les différentes pratiques, partant des principes des méthodes à leurs applications. Il s'articule en deux grandes parties : la première portant sur les techniques elles-mêmes ; la seconde dédiée à des domaines d'applications spécifiques et mobilisant parfois une grande diversité de techniques.

Chacun des 15 chapitres est étayé d'illustrations didactiques et de tableaux synthétiques, construits de telle sorte que le lecteur y retrouve :

- une présentation générale de chaque technique ;
- une description synoptique de la méthodologie ;
- des recommandations spécifiques de mises en œuvre ;
- des indications sur le mode de présentation des résultats ;
- des informations sur la validation des résultats ;
- un point sur les avantages et les inconvénients de chaque technique ;
- des exemples d'applications pratiques.

Cette nouvelle édition propose une actualisation des contenus avec une **révision complète** des contenus et l'**harmonisation de la terminologie et des définitions** ainsi que de nouveaux schémas et photographies.

Le public

Rédigé par des professionnels de la discipline, cet ouvrage s'adresse aux chercheurs et enseignants-chercheurs ainsi qu'aux étudiants en Master ou en Doctorat. Son lectorat comporte également tous les personnels des laboratoires de recherche académique ou industrielle dans les secteurs concernant la biologie (sciences de la vie, pharmacie, vétérinaire, recherche médicale, bioréactifs, équipement de laboratoires...).

Les auteurs

Cet ouvrage a été coordonné par Marie-Christine Béné, PU-PH en hématologie CHU de Nantes et faculté de médecine, université de Nantes ; Christian Drouet, PU-PH en immunologie, université de Paris et Hôpitaux Paris Centre, site Cochin AHP, Paris ; Sylvain Fisson, PU en immunologie, faculté des sciences fondamentales appliquées, université d'Évry Val d'Essonne – Paris Saclay ; Sylvie Fournel, PU en immunologie, faculté des sciences de la vie, université de Strasbourg ; et Estelle Seillès, PU-PH en immunologie, CHU de Besançon et UFR des sciences de la santé, université de Franche-Comté.



ELSEVIER

www.elsevier.com/fr-fr/connect

www.elsevier-masson.fr

59 6949 7

METHODES EN IMMUNOLOGIE CAMPUS



9 782294 773280