



DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES INNOVANTES DE DÉTECTION DES AUTO-ANTICORPS NON CONVENTIONNELS DANS LA MYASTHÉNIE AUTO-IMMUNE

Samantha Ballesta

► To cite this version:

Samantha Ballesta. DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES INNOVANTES DE DÉTECTION DES AUTO-ANTICORPS NON CONVENTIONNELS DANS LA MYASTHÉNIE AUTO-IMMUNE. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. hal-01964989

HAL Id: hal-01964989

<https://ephe.hal.science/hal-01964989>

Submitted on 10 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté par
Samantha BALLESTA

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE : DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODES INNOVANTES
DE DÉTECTION DES AUTO-ANTICORPS NON CONVENTIONNELS
DANS LA MYASTHÉNIE AUTO-IMMUNE

Soutenu le 03 décembre 2018, devant le jury suivant :

Pr EXBRAYAT Jean-Marie – Président

Dr SIMONET Thomas – Tuteur scientifique

Dr RATINIER Maxime – Tuteur pédagogique

Dr BOUHOUE Françoise – Examineur

Dr LEGAY Claire – Rapporteur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr SIMONET Thomas

**Centre de Biotechnologie Cellulaire et Biothèque, Centre de Biologie et Pathologie EST
Hospices Civils de Lyon – 59 boulevard Pinel 69500 BRON**

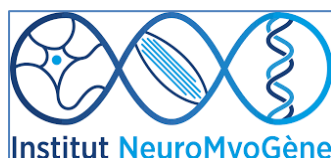
Directeur : Pr SCHAEFFER Laurent

Et de

Dr RATINIER Maxime

**Infections virales et pathologie comparée (IVPC) UMR754 UCBL INRA – Lyon Gerland
EPHE (Science et Vie de la Terre)**

Directeur : Pr ARCHER Fabienne



REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu **Monsieur le Professeur Laurent SCHAEFFER**,

Qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui est à l'origine de ce travail. Merci d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir permis d'entreprendre ce diplôme. Merci également de m'avoir partagé une partie de tes connaissances et d'avoir su développer mon intérêt pour la recherche scientifique. Reçois ici le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Je remercie tout particulièrement **Monsieur le Docteur Thomas SIMONET**,

Qui, durant ses trois années d'encadrement, a su se rendre disponible pour m'orienter dans mon projet et répondre à mes très très très nombreuses questions ! Toujours dans la bonne humeur et l'optimisme, tu m'as permis d'acquérir de nouvelles compétences et de nombreuses connaissances scientifiques en me partageant les tiennes et ce, grâce à tes conseils avisés et précieux. Merci également pour tes nombreuses heures d'écoute et d'avoir su canaliser mon énergie parfois débordante ! Trouve en ces quelques mots l'expression de ma profonde estime.

Je tiens à remercier **Madame le Docteur Isabelle ROUVET**,

Qui m'a permis d'intégrer cette équipe et de réaliser ce diplôme. Merci de m'avoir permis de concilier mon poste de technicienne en parallèle de ce projet, et de m'avoir aidée à le mener à bien. J'ai été ravie de travailler à tes côtés. Sans toi, ce projet ne serait pas ce qu'il est devenu à ce jour.

Je remercie également **Monsieur le Docteur Maxime RATINIER**,

Qui m'a apporté son soutien durant ces trois années et a su me conseiller pour construire mon parcours à l'EPHE. Bien que n'ayant pas eu la chance de le côtoyer plus longtemps, mes pensées se portent vers **Monsieur le Docteur Christophe TERZIAN et ses proches**.

J'adresse mes remerciements aux **membres du jury**,

Madame le Docteur Claire LEGAY, Madame le Docteur Françoise BOUHOIR et Monsieur le Docteur Jean-Marie EXBRAYAT. Merci d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

À toute **l'équipe du CBC** : Clémence, Émilie, Valérie, Viviane, Marie-Christianne, Pénélope, Laetitia et Julien, merci pour votre aide, votre bonne humeur, les fous rires et les coups de gueule... Merci d'avoir rendu ces années aussi studieuses que joyeuses !

Un merci particulier à **Virginie**, pour ton implication dans la mise en place et la réalisation de ce projet, les longs moments de doute et de perplexité, mais aussi de satisfaction et de rire !

À mes parents,

Merci pour votre amour et votre soutien inconditionnel. Sans vous je ne serai pas devenue la personne que je suis aujourd'hui. Merci de votre confiance et de votre aide.

À mon frère,

Je suis tellement fière de toi. Fière de pouvoir nous vanter d'avoir réalisé le même parcours et la même réussite (très prochaine de mon côté) ! Je souhaite que tes projets se concrétisent, sache que je n'ai aucun doute sur ta réussite et ton épanouissement ! Merci d'avoir été et d'être toujours à mes côtés.

À ma mamie,

Merci pour du fond du cœur pour tout ce que tu m'apportes. Merci pour ton amour et ton implication sans limite dans la construction de ma vie. Merci pour ton dévouement envers mes filles et ta confiance sans faille. Notre ange veille sur nous.

À mon papi,

Merci pour ton aide et ta confiance. Je te sais très fière de tes petits et arrière-petits-enfants. Merci de l'amour que tu nous portes.

À Julie, ma meilleure amie,

Merci pour tous ces moments partagés depuis tant d'années, tous ces merveilleux souvenirs. Merci pour ces longues heures à m'écouter, pour ton aide et ton soutien sans limite. Merci de ton implication auprès des filles, j'espère tenir mon rôle de tata et de marraine aussi bien que toi. Merci d'être là, merci d'être toi...

Je tiens à remercier toute ma famille, belle-famille et tous mes amis pour leur aide et leur soutien. Sans vous, la réalisation de ce projet n'aurait pas été possible !

J'adresse une mention spéciale à **Jessica,**

Sans ta précieuse aide, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour ! Je suis heureuse de te compter parmi mes amis et je remercie Cyril d'avoir fait croiser nos chemins. Je te remercie infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi. Je te souhaite beaucoup de bonheur et d'épanouissement dans ta grossesse, tu seras j'en suis sûr, une maman formidable.

À mon mari et mes deux merveilleuses filles,

Olivier, Kélya & Élyna. Je vous remercie infiniment pour tout ce que vous m'apportez. C'est grâce à vous que je suis plus épanouie chaque jour. Merci d'avoir supporté ces heures d'absence et de travail sans lesquelles je n'aurais pas pu réaliser ce projet. Aucun mot ne suffira à exprimer tout l'amour et les sentiments que je vous porte. Je suis tellement fière de vous. Je vous aime.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIÈRES	1
TABLE DES FIGURES	4
TABLE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS	7
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	10
PARTIE A : Généralités sur les muscles et les cellules musculaires.....	11
I. Anatomie	11
II. Fonctionnalité.....	12
III. La myogénèse	13
IV. Organisation subcellulaire	14
PARTIE B : Généralités sur la Jonction Neuromusculaire	16
I. La Jonction Neuromusculaire en condition physiologique	16
1) Structure et anatomie de la Jonction Neuromusculaire.....	16
2) Fonctionnement de la Jonction Neuromusculaire	17
3) Formation de la Jonction Neuromusculaire : la voie agrine-LRP4-MuSK	19
II. Les pathologies de la Jonction Neuromusculaire	20
1) Les syndromes myasthéniques congénitaux	20
2) Le syndrome de Lambert-Eaton.....	21
3) La myasthénie auto-immune	22
PARTIE C : Diagnostic sérologique classique de la myasthénie auto-immune	23
I. Rappels : Mécanismes de l'auto-immunité	23
II. Auto-anticorps « classiques » dans la myasthénie auto-immune.....	25
1) Diagnostic sérologique classique de la myasthénie auto-immune : le dosage radio-immunologique	25
2) Caractéristiques clinico-biologiques des auto-anticorps.....	25
PARTIE D : Nouveaux tests de détection et nouvelles cibles antigéniques	27
I. Détection du récepteur d'acétylcholine sous forme agrégée	27
II. Détection d'autres cibles antigéniques	28
PARTIE E : La qualité.....	30
I. Concept de la qualité	30
1) Définition	30
2) Système de management de la qualité	31

3) Système documentaire	31
II. L'accréditation des laboratoires d'analyses médicales	32
III. La validation de méthode	32
PROBLEMATIQUES	33
MATERIEL ET MÉTHODE	36
I. La sérothèque	37
1) Constitution d'une sérothèque associée à des données cliniques.....	37
2) Préservation des sérums.....	37
II. La culture de cellules	38
1) Obtention des lignées cellulaires.....	38
2) Entretien des cellules	40
3) Cryopréservation des cellules.....	41
4) Culture sur plaque myoscreen de CYTOO.....	41
III. La transfection de cellules	41
1) Les différents plasmides	41
2) La transfection transitoire	42
IV. Immunomarquage	42
1) Références des anticorps primaires.....	42
2) Référence des anticorps secondaires	43
3) Méthode d'immuno-marquage avec perméabilisation des cellules	43
4) Méthode d'immuno-marquage sans perméabilisation des cellules	43
5) Méthode d'immuno-marquage avec clarification des sérums et perméabilisation	44
6) Microscopie épifluorescente	44
V. Validation de la méthode	44
1) L'analyse de risque.....	44
2) Les vérifications bibliographiques	45
3) Les vérifications expérimentales	46
RÉSULTATS.....	47
I. Dosage des anticorps de faible affinité dirigés contre le récepteurs de l'acétylcholine: validation de méthode	48
1) Mise en place du test au Centre de Biotechnologie Cellulaire.....	48
2) La sérothèque	50
3) La validation de méthode	51
4) Les premiers tests en routine	60

II. Dosage d'anticorps dirigés contre d'autres cibles antigéniques de la Jonction en Cell Based Assay.....	63
III. Détection d'anticorps dirigés contre un antigène post-synaptique de la jonction neuromusculaire sur plaque de myoscreen	71
1) Optimisation des conditions de culture pour la différenciation de myoblastes	71
2) Établissement d'une nouvelle lignée de myoblastes humains.....	74
3) Production de RACH sur plaque myoscreen	77
DISCUSSION	80
I. Détection des anticorps anti-RACH de faible affinité en Cell Based Assay au sein d'un service hospitalier	81
1) Adaptation et validation de la méthode.....	81
2) Interprétation du résultat	83
3) Résultats des premiers tests	84
II. Développement d'une nouvelle technique similaire destinée à la recherche d'autres cibles antigéniques impliquées dans la myasthénie	85
III. Mise au d'une technique de détection non spécifique de l'ensemble des auto-anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie	87
CONCLUSION	89
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	92
ANNEXES.....	96

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'anatomie d'un muscle squelettique strié.....	11
Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement de l'activité musculaire	13
Figure 3: Représentation schématique de la myogénèse des cellules satellites.....	14
Figure 4: Schéma en coupe longitudinale de l'architecture d'un sarcomère (à gauche) et image en microscopie électronique (à droite).....	15
Figure 5 : Structure de la Jonction Neuromusculaire.....	17
Figure 6 : Représentation schématique de la composition moléculaire du récepteur d'acétylcholine sous sa forme fœtale et adulte.....	17
Figure 7: Représentation schématique d'une Jonction Neuromusculaire et des principales molécules impliquées dans son fonctionnement.	18
Figure 8 : Représentation schématique des voies d'activation intracellulaires de l'agrine pour la « clusterisation » des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (RACH)	20
Figure 9 : Mécanismes d'actions des anticorps anti-RACH	26
Figure 10 : Mécanisme des auto-anticorps anti-LRP4 et anti-agrine dans la MG.	28
Figure 11 : Récapitulatif des données issues de différentes sources concernant les anticorps anti-LRP4 (Table 1) et agrine (Table 2).....	29
Figure 12 : Représentation schématique de la roue de Deming	30
Figure 13 : Représentation schématique des possibilités de prélèvement, traitement, et envoi des sérums de patients.....	38
Figure 14 : Représentation schématique du diagramme de causes à effets d'Ishikawa.....	45
Figure 15: Immuno-détection par fluorescence sur cellules en culture d'auto anticorps anti-RACH de faible affinité d'un patient séronégatif atteint de myasthénie auto-immune.....	49
Figure 16 : Vérification de l'expression des plasmides agrine ; MuSK ; LRP4.....	63
Figure 17 : Comparaison de la qualité de l'immunomarquage avec et sans clarification des sérums.	64
Figure 18 : Comparaison de la qualité de l'immunomarquage dans les différentes conditions de réalisation de la technique.	65
Figure 19 : Sérum d'un patient triplement positif en agrine (A) MuSK (B) et LRP4 (C)	67
Figure 20 : Caractérisation par immunodétection par fluorescence des myoblastes de deux lignées immortalisées. (A) Lignée n°1 (B) Lignée n°2.....	72

Figure 21 : Confluence du tapis cellulaire des lignées de myoblastes immortalisés cinq jours après ensemencement.....	72
Figure 22 : Comparaison des différenciations de chaque lignée de myoblastes après cinq jours en fonction des quatre conditions de milieux.	73
Figure 23 : Caractérisation par immunofluorescence des myoblastes de la lignée notée V177 purifiée sur colonne. (A) Avant purification (B) Après purification.	74
Figure 24 : Myoblastes de la lignée V177 sept jours après différenciation sur plaque 24 puits avec ou sans coating. Les plaques ont préalablement été traité avec du matrigel (A) ou non (B)	75
Figure 25 : Immunomarquage des RACH à l'alphabungarotoxine de la lignée murine (C2C12) sept jours après différenciation sur plaque 24 puits sans coating au matrigel. (A) ou avec (B) en fonction de la concentration d'agrine.....	76
Figure 26 : Marquage des RACH à l'alphabungarotoxine des lignées primaire (V177.wt), immortalisées (V177.Im) et murines (C2C12) sept jours après différenciation sur plaque 24 puits sans coating au matrigel. (A) ou avec (B)	77
Figure 27 : Schéma représentant un « UFO micropattern ».....	77
Figure 28 : Images des clusters de récepteurs marqués à l'alphabungarotoxine obtenus sur des myoblastes humains cultivés et différenciés en UFO micropattern par CYTOO.....	78
Figure 29 : Myoblastes de la lignée primaire V177.wt (A) et des lignées immortalisées V177.Im (B) et n°1 (C) ensemencées et cultivées sur plaque myoscreen.	78
Figure 30 : Myoblastes de la lignée primaire V177.wt (A) et immortalisées V177.Im (B) ensemencées et cultivées sur plaque myoscreen.....	79

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Principaux modes d'action pathogène des auto-anticorps.....	24
Tableau 2 : Exigences de la norme en termes de management de la qualité et d'exigences techniques	31
Tableau 3 : Table des différents anticorps primaires utilisés	42
Tableau 4 : Table des différents anticorps secondaires utilisés.....	43
Tableau 5 : Analyse de risque : indices critiques élevés de la phase pré-analytique et leur modalité de maîtrise.	53
Tableau 6 : Analyse de risque : indices critiques élevés de la phase analytique et leur modalité de maîtrise.	54
Tableau 7 : Analyse de risque : indices critiques élevés de la phase post-analytique et leur modalité de maîtrise.	55
Tableau 8 : Variation du temps de fixation des cellules au paraformaldéhyde (PFA).	58
Tableau 9 : Variation du temps d'incubation des sérums.....	58
Tableau 10 : Variation du temps d'incubation de l'anticorps secondaire à +4°C.	58
Tableau 11 : Variation de la quantité cellulaire lors de la mise en plaque.	59
Tableau 12 : Variation de la dilution de deux sérums positifs et deux sérums négatifs.	59
Tableau 13 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité par centre prescripteur	61
Tableau 14 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité selon l'âge et le sexe des patients	62
Tableau 15 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité selon les items cliniques des patients	62
Tableau 16 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-agrine/MuSK/LRP4 sur des sérums de patients SNMG	66
Tableau 17 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-agrine/MuSK/LRP4 sur des sérums de patients SNMG et de patients témoins atteints de Sclérose en Plaque (SEP) ou de Neuropathie Dysimmune (NPD).....	68
Tableau 18 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-agrine/MuSK/LRP4 pour la méthode perméabilisée et non perméabilisées	70

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

Acétyl CoA : Acétyl Coenzyme A

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

ADCC : *Antibody Dependant Cell-mediated Cytotoxicity (en français : Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique Complémentaire

AFMG : *American Foundation for Myasthenia Gravis (en français : Fondation Américaine pour la Myasthénie auto-immune)*

Ag : Antigène

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité

APECED : *Auto-immune Polyendocrinopathie Candidiasis Ectodermal Dystrophy (en français : Polyendocrinopathie auto-immune de type 1)*

ATP : Adénosine Triphosphate

BSA : *Bovine Serum Albumine (en français : Sérum albumine bovine)*

CBA : *Cell Based Assay (en français : Dosage à base de cellules)*

CCVD : Canaux Calcique Voltage Dépendant

ChAT : Choline Acétyltransférase

CI : Complexe Immun

COFRAC : Comité Français d'Accréditation

COL-Q : *Acetylcholinesterase associated collagenic tail subunit (en français : Sous unité de la queue collagénique)*

CQI : Contrôle Qualité Interne

CRB : Centre de Ressource Biologique

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DMEM : *Dulbecco Modified Eagle Medium*

DMSO : Diméthyle Sulfoxide

DOK-7 : *Docking protein 7 (en français : Protéine d'ancrage 7)*

EEQ : Évaluation Externe de la Qualité

EMG : Électromyogramme

GFP : *Green Fluorescent Protein (en français : Protéine verte fluorescent)*

HCL : Hospices Civils de Lyon

HEK : *Human Embryonic Kidney (en français : Rein embryonnaire humain)*

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthane sulfonique

HLA : *Human Leucocyte Antigen (en français : Antigène leucocytaire humain)*

HPST : Hôpital Patient Santé Territoire

HS : *Horse Serum (en français : Sérum de cheval)*

Ig : Immunoglobuline

IgG : Immunoglobuline G

INMG : Institut Neuromyogène

IPEX : Immuno-dérégulation Poly-endocrinopathie Entéropathie auto-immune liée au chromosome X

ISO : *International Organisation for Standardisation (en français : Organisation internationale pour la standardisation)*

JNM : Jonction Neuromusculaire

LB : Lymphocyte B

LBMMS : Laboratoire de Biologie Médicale Multi-Site

LEMS : *Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome (en français : Syndrome myasthénique de Lambert-Eaton)*

LRP4 : *Low density Lipo-protein Receptor Related Protein 4 (en français : Protéine liée aux récepteurs de lipoprotéines de basse densité)*

LT : Lymphocyte T

MACS : *Magnetic Activated Cell Storing (en français : Stockage de cellules magnétiques activées)*

MFR : *Muscle Regulatory Factor (en français : Facteur de régulation musculaire)*

MG : *Myasthenia Gravis (en français : Myasthénie auto-immune)*

MuSK : *Muscle Specific Kinase (en français : Kinase spécifique des muscles)*

NGS : *New Generation Sequencing (en français : Nouvelle génération de séquençage)*

NPD : Neuropathie Dysimmune

PBS : *Phosphate Buffered Saline (en français : Tampon phosphate)*

PDCA : *Plan Do Check Act (en français : Planifier Faire Contrôler Agir)*

PFA : Paraformaldéhyde

RACH : Récepteur d'Acétylcholine

RIA : *Radio Immuno Assay (en français : Dosage radio-immunologique)*

RT : *Room Temperature (en français : Température ambiante)*

RTE : Réception Tri Enregistrement

SCLC : *Small Cell Lung Cancer (en français : Cancer du poumon à petite cellule)*

SEP : Sclérose en Plaque

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique

SMC : Syndrome Myasthénique Congénital

SMQ : Système de Management de la Qualité

SNMG : *Seronegative Myasthenia Gravis (en français : Myasthénie auto-immune séronégative)*

SST : *Serum Separating Tube (en français : Tube avec séparateur de sérum)*

SVF : Sérum de Veau Foetal

TNF : *Tumor Necrosis Factor (en français : Facteur de nécrose tumorale)*

TSH : *Thyroid Stimulating Hormon (en français : Thyroïdostimuline)*

UFO : *Unidentified Flying Object (en français : Objet volant non identifié)*

La myasthénie, également appelée *Myasthenia Gravis* est une maladie auto-immune causée par des auto-anticorps. Elle conduit à une altération de la transmission synaptique, au niveau post-synaptique de la jonction neuromusculaire (JNM). Elle se caractérise par une faiblesse musculaire anormale et une fatigabilité excessive. Son diagnostic repose sur le tableau clinique du patient, mais également sur des arguments paracliniques tels que l'étude de son électromyogramme (EMG) ou encore les analyses biologiques pour la détection d'auto-anticorps spécifiques.

Actuellement, il est estimé que 80% des patients myasthéniques possèdent des auto-anticorps dirigés contre le récepteur de l'acétylcholine nicotinique (RACH) et 10% des auto-anticorps dirigés contre la protéine MuSK (*Muscle Specific Kinase*), récepteur tyrosine kinase nécessaire à la formation et au maintien de la JNM. Ces deux types d'anticorps sont détectables en dosage radio-immunologique et leur recherche s'effectue dans plusieurs structures en France en routine. Les 10% de patients restant pour lesquels on ne détecte aucun de ces deux auto-anticorps sont dit « séronégatifs ». En 2008, une équipe à Oxford a démontré que parmi ces 10% de séronégatifs, certains possèdent des auto-anticorps anti-RACH dits de faible affinité, sensibles à la conformation du récepteur, notamment à son recrutement en agrégats membranaires fonctionnel [1].

Suite à ces travaux, l'équipe du Pr SCHAEFFER a mis au point en 2014 un test similaire permettant la détection de tels anticorps [2].

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de recherche EPHE, travail au cours duquel j'ai réalisé l'adaptation et la validation de cette méthode afin de la rendre disponible en tant que diagnostic hospitalier de routine. J'ai également développé d'autres techniques afin de pouvoir détecter différents auto-anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie.

Ces travaux ont été réalisés en parallèle de mon poste de technicienne au sein du Centre de Biotechnologie Cellulaire (CBC).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE A : Généralités sur les muscles et les cellules musculaires

Les muscles représentent environ 40% à 50% du poids total du corps humain. Chez les vertébrés, trois types de tissus musculaires sont décrits : i) les muscles lisses, ii) les muscles striés cardiaques et iii) les muscles striés squelettique. Ces derniers sont insérés sur les os du squelette par le biais de tendons (Figure 1). Ils sont responsables des mouvements volontaires, et sont sous le contrôle du système nerveux cérébro-spinal. Leur rôle est de produire de la force grâce à la contraction musculaire afin de mettre le squelette en mouvement, en réponse aux signaux électriques émis par le cortex moteur du cerveau et relayés par les motoneurones de la moelle épinière. Pour assurer leur fonction contractile et son contrôle par le système nerveux, les cellules musculaires squelettiques sont hautement différenciées et possèdent une structure ainsi qu'une organisation très spécifique.

I. Anatomie

Les muscles squelettiques sont composés de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Chaque fibre musculaire est composée d'une cellule musculaire syncytiale multinucléée, également appelée rhabdomyocyte. Elle est issue de la fusion des progéniteurs musculaires mononucléés d'origine mésodermique au cours de l'embryogénèse. Chacune de ces structures est entourées d'un tissu conjonctif (Figure 1) :

- L'endomysium qui recouvre chaque fibre musculaire ;
- Le périmysium qui entoure les faisceaux de fibres ;
- L'épimysium que l'on retrouve sur l'ensemble du muscle.

Des vaisseaux sanguins et des nerfs parcourent ces différentes couches pour assurer respectivement la vascularisation et l'innervation des fibres musculaires. Chaque fibre musculaire reçoit une terminaison nerveuse au niveau d'une synapse particulière appelée jonction ou encore synapse neuromusculaire.

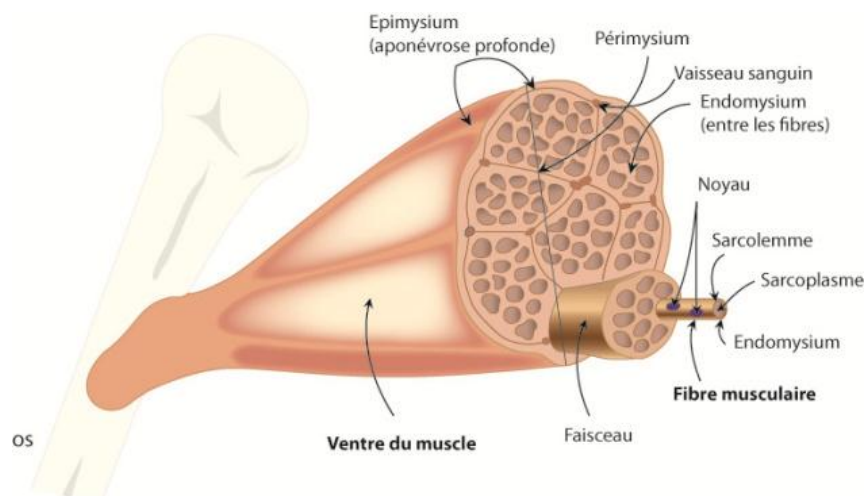


Figure 1 : Représentation schématique de l'anatomie d'un muscle squelettique strié humain (Figure issue de www.campusport.univ-lille2.fr)

II. Fonctionnalité

Le muscle possède différentes propriétés qui lui permettent de remplir sa fonction au sein de l'organisme :

- **Excitabilité** : les fibres musculaires sont capables de générer et de propager des vagues de dépolarisation de la membrane plasmique ou potentiels d'action, en réponse à la libération d'un neurotransmetteur (l'acétylcholine chez les mammifères) par la terminaison nerveuse au niveau la jonction neuromusculaire.
- **Contractilité** : les potentiels d'actions induits par la libération de neurotransmetteur provoquent la contraction des cellules musculaires grâce à un mécanisme appelé couplage excitation-contraction. Le raccourcissement des muscles ainsi généré met le squelette en mouvement.
- **Élasticité** : les fibres musculaires ont la capacité de retrouver leur longueur initiale après une contraction ou un étirement.
- **Extensibilité** : pour s'adapter aux mouvements du squelette, les fibres ont le pouvoir de s'étirer au-delà de leur longueur de repos.
- **Plasticité** : pour s'adapter aux changements physiologiques ou pathologiques de l'organisme, les muscles squelettiques ont la capacité de modifier leur taille, leur métabolisme et leurs propriétés contractiles.

On distingue deux types de fibres musculaires [3] :

- **Fibres de type I** : fibres de faible diamètre à métabolisme oxydatif et à contraction lente également appelées fibres rouges. Cette dénomination est liée à leur couleur conférée par leur forte concentration en myoglobine. Ces fibres génèrent moins de force que les fibres de type II mais sont très endurantes. Elles sont majoritairement présentes dans les muscles des pratiquants de sports d'endurance.
- **Fibres de type II** : fibres de fort diamètre à métabolisme principalement glycolytique. Ces fibres sont plus fatigables que les fibres de type I mais génèrent plus de force. On les retrouve dans les muscles des pratiquants de sport de body building. Elles comprennent les fibres de type IIa, intermédiaires entre le type I et le type II et les fibres de type IIb, à contraction très rapide [4].

La contraction musculaire est contrôlée par le système nerveux central. Les fibres musculaires sont innervées par les motoneurones ou neurones alpha, situés dans les cornes ventrales de la moelle épinière. Chaque motoneurone conduit à un axone qui va cheminer dans un nerf périphérique puis se ramifier dans son muscle cible pour innerver un ensemble de fibres musculaires. L'ensemble des fibres musculaires innervées par le même motoneurone constitue une unité motrice au sein de laquelle les fibres musculaires sont activées de façon synchrone (Figure 2). Le contrôle de la force de contraction et de la finesse du mouvement est directement lié au nombre d'unités motrices sollicitées lors d'une action.

La taille des unités motrices varie en fonction des muscles, du type de fibres et des conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple, dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie neurodégénérative avec atteinte spinale, la perte d'innervation des fibres musculaires liée à la mort des motoneurones est compensée par une augmentation de la taille des unités motrices par les motoneurones survivants qui innervent alors les fibres ayant perdues leur motoneurone.

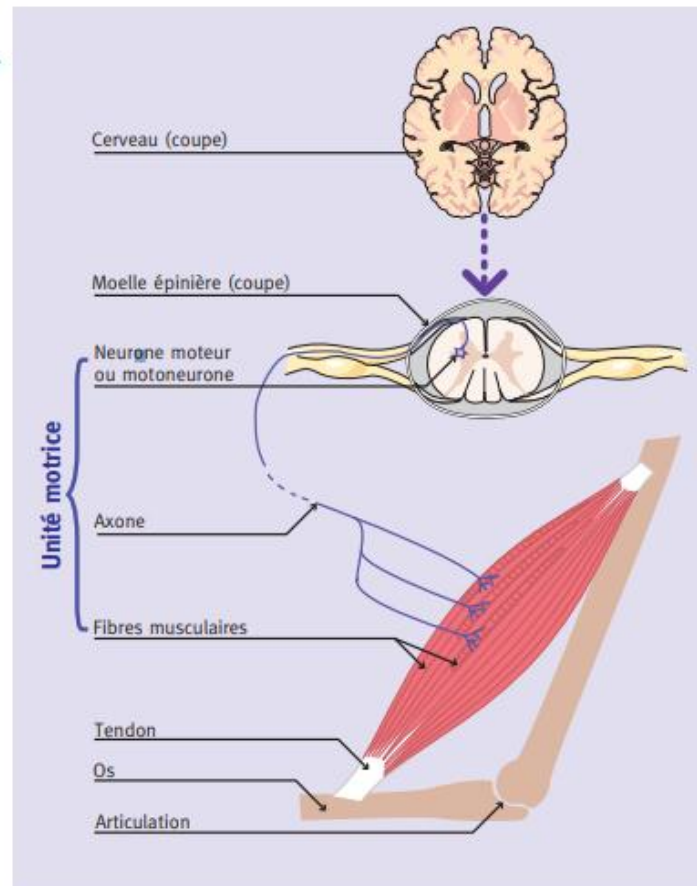


Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement de l'activité musculaire (Figure issue de www.institut-myologie.org)

III. La myogénèse

Les muscles squelettiques ont une origine mésodermique [5]. Ils sont issus des somites réparties le long du tube neural qui sont à l'origine de deux structures :

- Le sclérotome : partie ventrale des somites composée de cellules mésenchymateuses desquelles seront issus la colonne vertébrale, les os de la cage thoracique, les tendons et les méninges.
- Le dermomyotome : structure dorsale des somites, source des précurseurs cellulaires du derme et des muscles squelettiques du tronc et des membres. À noter que les muscles de la face, du larynx et du pharynx ne sont pas issus des somites mais de myoblastes qui se différencient à partir des arcs branchiaux.

La myogénèse des vertébrés est assurée par quatre facteurs de transcription myogéniques (de l'anglais *Muscle regulatory factor*, *MRF*) : MyoD, Myf5, Myogénine et MRF4 [6].

Au stade embryonnaire, durant la myogénèse primaire, les myoblastes commencent à se différencier et à fusionner pour former des myotubes multinucléés (Figure3), appelées fibres primaires. Puis, durant la myogénèse secondaire (stade fœtal), les myoblastes continuent à fusionner entre eux pour former les fibres secondaires et fusionnent également avec les fibres primaires pour permettre leur croissance [7](Figure3).

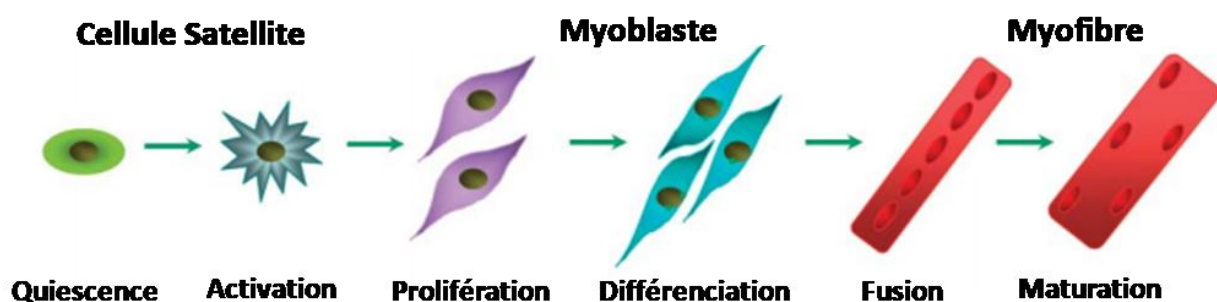


Figure 3: Représentation schématique de la myogénèse des cellules satellites (Figure adaptée de [8]).

Après la naissance, les cellules satellites, qui sont des myoblastes restés à l'état quiescent entre la lame basale et le sarcolemme, permettront la croissance, la réparation et le remplacement des fibres tout au long de la vie [9]–[12].

IV. Organisation subcellulaire

Dans les fibres musculaires squelettiques, les noyaux sont disposés en périphérie contre la membrane plasmique également appelée sarcolemme. On retrouve dans son cytoplasme, qualifié de sarcoplasme, tous les organites indispensables à son fonctionnement. Le sarcoplasme contient aussi les myofibrilles responsables de la contractilité des fibres musculaires. Les myofibrilles sont composées de l'enchaînement d'unités contractiles de base appelées sarcomères.

La microscopie électronique a permis de mettre en évidence la structure répétitive des myofibrilles. Les différents types de filaments qui constituent les sarcomères ont été nommés en fonction de leur aspect au microscope électronique (Figure 4). Dans chaque myofibrille, on retrouve une alternance de bandes foncées (notées bandes A pour Anisotropes) et claires (notées bandes I pour Isotropes).

Au centre des bandes A se trouve une strie claire appelée zone H (pour *hell* qui signifie « clair » en allemand), elle-même séparée en deux par la ligne M (pour *mittelscheibe* qui signifie « tranche/coupe du milieu » en allemand) plus sombre.

Au milieu de la bande I se trouve la strie Z (pour *zusammen* qui signifie « ensemble » en allemand). Un sarcomère correspond à la région d'une myofibrille comprise entre deux stries Z successives, c'est l'unité contractile de base de la fibre musculaire (Figure4). Les stries Z lient les sarcomères successifs entre eux.

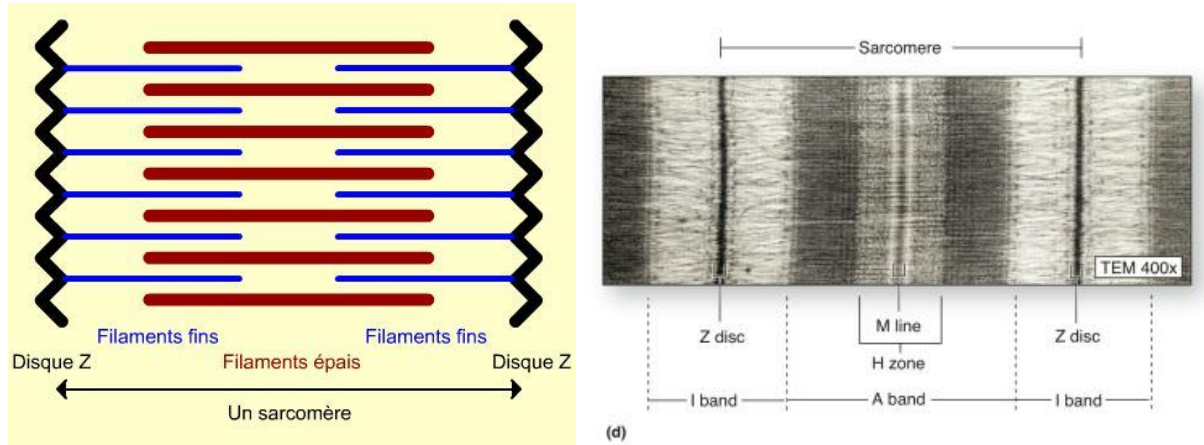


Figure 4: Schéma en coupe longitudinale de l'architecture d'un sarcomère (à gauche) et image en microscopie électronique (à droite) (Figure issue www.planet-vie.ens.fr)

En microscopie électronique on distingue également des filaments fins et épais perpendiculaires aux bandes A et I. Les bandes I ne contiennent que des filaments fins, alors que les bandes A contiennent à la fois des filaments fins et épais [13].

La contraction des sarcomères résulte du glissement de l'actine des filaments fins le long de la myosine des filaments épais. Le glissement des filaments d'actine et de myosine dépend quant à lui des têtes de myosine qui vont lier l'actine. Grâce à l'énergie fournie par hydrolyse d'ATP, les têtes de myosine pivotent, tirant ainsi les filaments d'actine, ce qui provoque le raccourcissement du sarcomère. En l'absence de calcium, l'actine est associée au complexe tropomyosine-troponine qui empêche la liaison des têtes de myosine [14]. Au repos, la majorité du calcium intracellulaire est stocké dans le réticulum sarcoplasmique.

En réponse à un potentiel d'action nerveux, la jonction neuromusculaire initie un potentiel d'action musculaire. La vague de dépolarisation de la membrane musculaire qui en résulte entraîne la libération du calcium retenu dans le réticulum sarcoplasmique, permettant ainsi aux têtes de myosine de se fixer à l'actine et de provoquer la contraction. Ce mécanisme appelé couplage excitation-contraction permet de conditionner la contraction musculaire à la stimulation par les motoneurones [15].

PARTIE B : Généralités sur la Jonction Neuromusculaire

I. La Jonction Neuromusculaire en condition physiologique

1) Structure et anatomie de la Jonction Neuromusculaire

La Jonction Neuromusculaire (JNM) est une synapse périphérique située entre les neurones moteurs et les fibres des muscles squelettiques striés. Elle est composée de trois types cellulaires distincts (Figure 5) [16], [17] :

- La terminaison nerveuse du motoneurone : chez les vertébrés, elle est spécialisée dans la synthèse et la sécrétion d'acétylcholine (ACh). Cette synthèse d'ACh a lieu dans le cytoplasme de la terminaison nerveuse et est issue de l'assemblage d'acétyl-CoA et de choline grâce à une enzyme appelée choline acétyltransférase (ChAT). L'ACh ainsi produite est stockée dans des vésicules synaptiques qui sont libérées dans la fente synaptique en réponse à un potentiel d'action venant de l'axone.
- La cellule de Schwann terminale : il s'agit d'une cellule gliale non myélinisante dérivée des crêtes neurales, qui recouvre la terminaison nerveuse. Elle est nécessaire à la survie des motoneurones, à la croissance et la stabilité de la JNM [18] ainsi qu'à la repousse axonale terminale [19].
- La membrane post-synaptique de la fibre musculaire : elle est caractérisée par les replis que forme la membrane plasmique sous-neurale. Les récepteurs de l'acétylcholine (RACH) sont accumulés au sommet des replis (les crêtes) à l'inverse des canaux sodium dépendants du voltage qui relayent la dépolarisation des crêtes au reste de la fibre musculaire pour générer les potentiels d'action.

La lame basale qui occupe la fente synaptique joue également un rôle central. Elle contient un ensemble de molécules clé pour le fonctionnement des JNM.

Parmi elles on trouve l'acétylcholinestérase (AChE) qui hydrolyse l'acétylcholine libérée par la terminaison nerveuse et qui permet ainsi de limiter la durée de stimulation du muscle après sa libération. On trouve également l'agrine, le protéoglycane sécrété par les motoneurones qui contrôle la différenciation et le maintien de la partie post synaptique de la JNM [20]–[22].

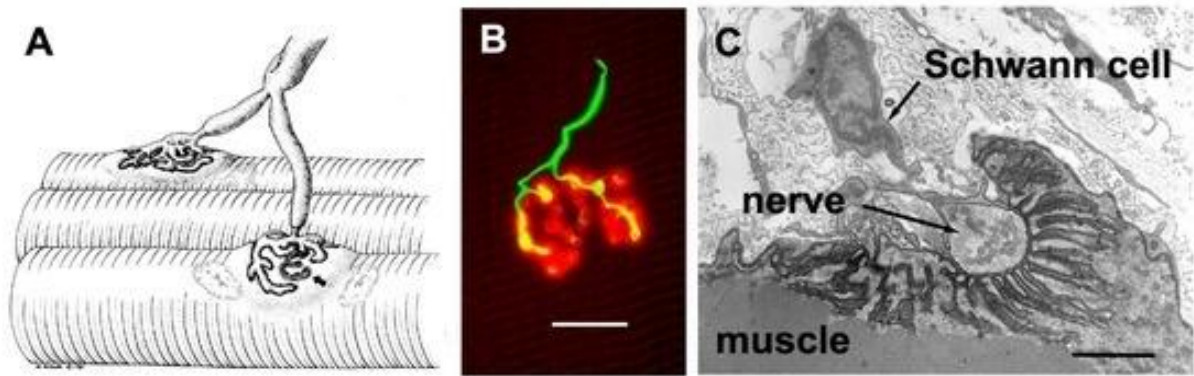


Figure 5 : Structure de la Jonction Neuromusculaire (Figures issues de [21]). (A) Schéma représentant un motoneurone qui se ramifie au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM) pour innervé deux fibres musculaires. (B) Image immunofluorescente représentant la JNM chez l'Homme. La terminaison nerveuse (marquage de la synaptophysine et des protéines des neurofilaments) est représentée en vert, et les récepteurs post-synaptiques de l'acétylcholine (marqués à l'alphabungarotoxine) en rouge. La barre d'échelle correspond à 20µm. (C) Image en microscopie électronique d'une coupe de bouton. La barre d'échelle correspond à 1 µm.

2) Fonctionnement de la Jonction Neuromusculaire

L'arrivée d'un potentiel d'action dans la terminaison nerveuse induit une entrée massive d'ions calcium à travers des canaux calciques dépendants du voltage.

L'augmentation de la concentration de calcium à proximité des vésicules synaptiques induit leur fusion avec la membrane pré-synaptique et ainsi la libération dans la fente synaptique de l'ACh contenue dans les vésicules. Les molécules d'ACh libérées se fixent sur les récepteurs nicotiniques de l'ACh, fortement concentrés au niveau de la membrane post-synaptique des fibres musculaires. Le RACH est un canal sodique dépendant du ligand (l'ACh). Chez l'embryon, le RACH est un hétéropentamère constitué de deux sous-unités α , une sous-unité β , une sous-unité δ ainsi qu'une sous-unité γ . Chez l'Homme, la sous unité γ est progressivement remplacée par une sous unité ϵ vers la 32^{ème} semaine de grossesse (Figure 6).

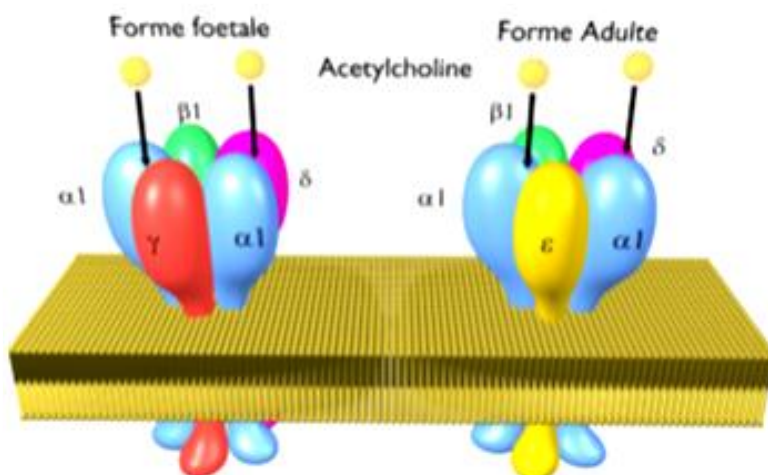


Figure 6 : Représentation schématique de la composition moléculaire du récepteur d'acétylcholine sous sa forme foetale et adulte (Figure issue de [17]). Il est composé de cinq sous-unités (α , β , δ , γ) à l'âge foetal. La sous unité γ sera remplacée par une sous unité ϵ à l'âge adulte.

La liaison de l'ACh à son récepteur induit son ouverture et l'entrée d'ions sodium dans l'élément post-synaptique. L'augmentation de la concentration en ions sodium cause une dépolarisation locale de la membrane musculaire qui active les canaux sodium dépendants du voltage situés au fond des replis de la membrane sous-synaptique (Figure 7). L'activation de ces canaux sodium dépolarise à son tour la membrane musculaire et active les canaux sodium voltage dépendants répartis tout le long de la membrane des fibres musculaires. Ainsi, un potentiel d'action musculaire résulte de l'activation de proche en proche des canaux sodium dépendants du voltage.

L'arrivée du potentiel d'action au niveau des jonctions entre la membrane plasmique et le réticulum sarcoplasmique, appelées triades, induit la libération du calcium stocké dans le réticulum, autorisant ainsi la liaison des filaments d'actine aux têtes de myosine et la contraction des sarcomères [23], [24].

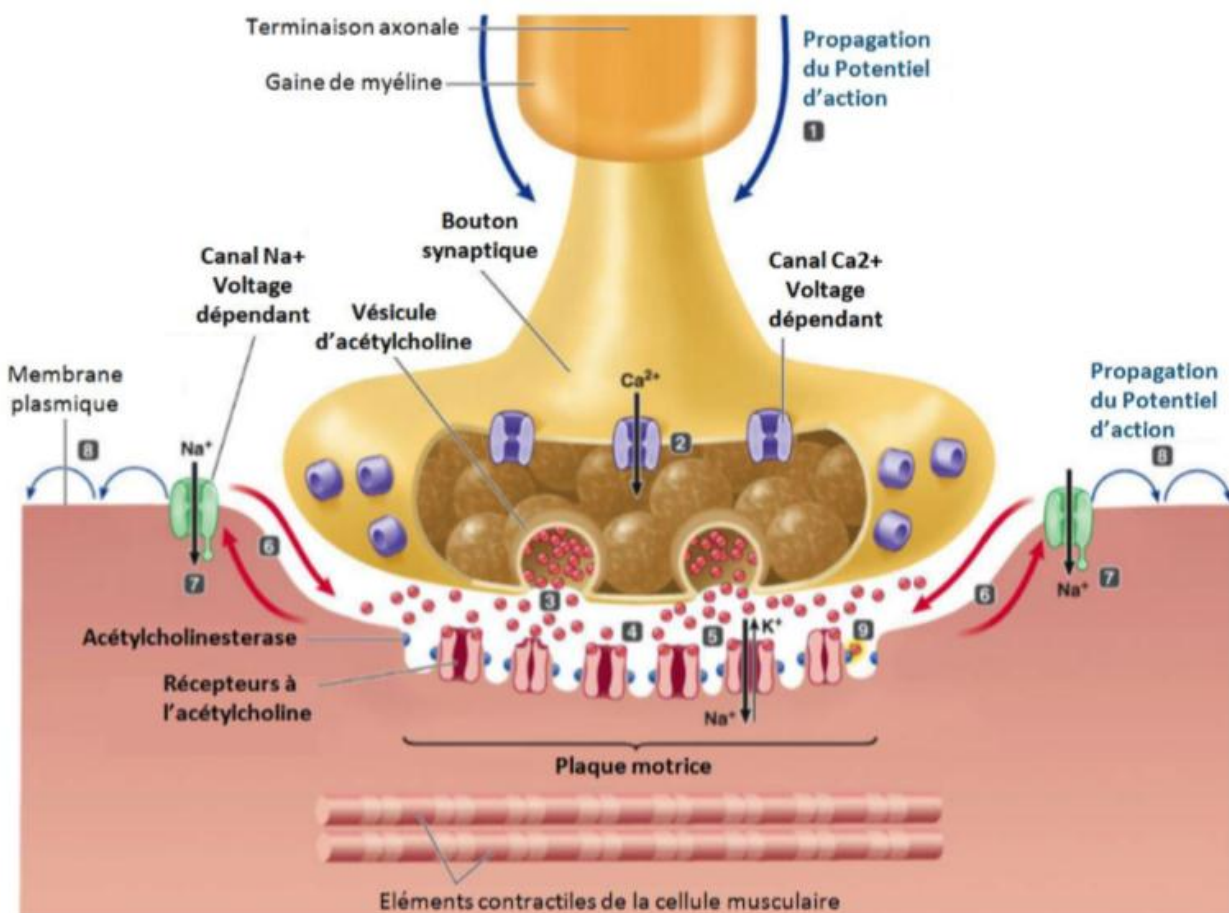


Figure 7 : Représentation schématique d'une Jonction Neuromusculaire et des principales molécules impliquées dans son fonctionnement (Figure issue de la thèse du Dr SEBASTIEN « Mécanismes de formation des triades et d'adressage des protéines du complexe de relâchement du calcium »). L'axone myélinisé du motoneurone permet au potentiel d'action de se répandre jusqu'à la synapse. Ainsi, l'acétylcholine contenue dans les vésicules est relâchée dans la fente synaptique. Cela conduit à l'entrée d'ions sodiums dans la cellule, provoquant un changement du potentiel de membrane et la dépolarisation de celle-ci.

3) Formation de la Jonction Neuromusculaire : la voie agrine-LRP4-MuSK

Pour que la neurotransmission soit efficace, c'est-à-dire que chaque potentiel d'action conduise à une contraction musculaire, la structure de la JNM est extrêmement spécialisée [25]. Cela permet de créer une très forte concentration de RACH en face de la terminaison nerveuse.

Cette très forte concentration en RACH est obtenue grâce à l'action de l'agrine, un héparan-sulfate protéoglycane sécrété par la terminaison nerveuse. L'agrine synthétisée et libérée par la terminaison nerveuse est essentielle pour l'assemblage et le maintien de la structure post-synaptique, via l'activation du récepteur tyrosine kinase MuSK (de l'anglais *Muscle Specific Kinase*) [24]. L'activation de MuSK par l'agrine n'est pas directe.

En effet, elle requiert la liaison de l'agrine à son récepteur LRP4 (de l'anglais *Low density Lipo-protein Receptor related Protein 4*) [26] (Figure 8).

L'activation de la kinase MuSK induit le recrutement d'une série d'effecteurs importants pour l'agrégation et la stabilisation des RACH à la JNM. Parmi ces effecteurs on trouve notamment la protéine rapsyne qui, en pontant les molécules de RACH entre elles, permet la formation des agrégats (clusters en anglais) de RACH à la JNM [27]. La compartimentation du RACH à la JNM résulte également de mécanismes transcriptionnels qui sont contrôlés par l'agrine et l'ACH. En effet, l'arrivée d'une terminaison nerveuse au contact d'une fibre musculaire entraîne deux changements majeurs sur le programme d'expression des gènes dans la fibre musculaire :

- l'agrine neuronale stimule fortement la transcription de gènes spécifiques définis comme "gènes synaptiques" dans les noyaux sous-neuraux. Ces gènes codent pour les constituants de la synapse neuromusculaire et sont préférentiellement exprimés par les noyaux sous-synaptiques.
- le RACH agrégé à la JNM est à l'origine de l'activité électrique de la fibre musculaire. Or cette activité réprime la transcription de la plupart des gènes synaptiques (dont ceux des sous-unités du récepteur de l'acétylcholine) dans les noyaux situés en dehors de la zone synaptique.

Ainsi, dans les fibres innervées, les gènes des sous unités du RACH sont fortement exprimés dans les noyaux sous synaptiques alors que leur expression est réprimée dans les autres noyaux musculaires [28].

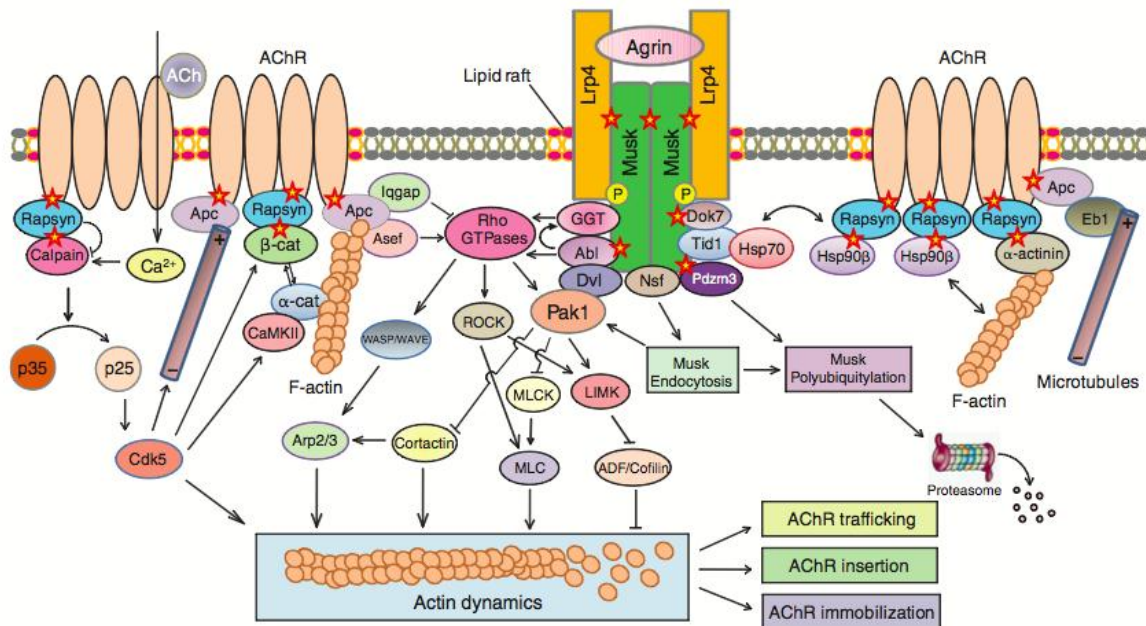


Figure 8 : Représentation schématique des voies d'activation intracellulaires de l'agrine pour la « clusterisation » des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (AChR) (Figure issue de [29])

II. Les pathologies de la Jonction Neuromusculaire

Les dysfonctionnements de la JNM induisent une diminution de la neurotransmission qui se traduit cliniquement par une fatigabilité musculaire appelée myasthénie. Les myasthénies peuvent avoir une origine génétique ou auto-immune.

1) Les syndromes myasthéniques congénitaux

Les syndromes myasthéniques congénitaux (SMC) font partie d'un groupe hétérogène d'affections génétiques causées par des mutations sur des gènes codant pour des protéines essentielles dans la transmission neuromusculaire. Ces syndromes sont rares avec une prévalence estimée à 1 personne sur 500 000 en Europe selon la littérature [30]. Les mutations impliquées dans cette maladie perturbent le bon fonctionnement de la JNM, conduisant à une faiblesse musculaire accentuée par l'effort. Grâce à l'évolution du séquençage, notamment des approches de NGS (de l'anglais *Next Generation Sequencing*), une trentaine de mutations géniques ont été identifiées comme étant responsables de SMC [20], [30], [31].

Bien que les SMC débutent généralement chez les enfants (notamment pendant la période néonatale), ces affections peuvent également se développer à l'âge adulte. Cela complique le diagnostic de ces patients et les SMC sont souvent difficiles à distinguer des myasthénies auto-immunes. Le diagnostic différentiel repose sur i) l'absence d'anticorps spécifiques, ii) un début précoce (naissance, premières années), iii) des antécédents familiaux (bien que le mode de transmission soit généralement récessif), iv) une note myopathique au premier plan et v) les résultats de l'électromyogramme (EMG) [32].

Une fois le gène en cause identifié, les SMC sont classés en fonction de la localisation de l'élément perturbé au niveau de la JNM [33]. On distingue ainsi :

- Les SMC pré-synaptiques qui affectent un composant dans le compartiment neuronal de la JNM. Ils correspondent à 5% des patients SMC. On y trouve les défauts de synthèse d'ACh dus à des mutations du gène *ChAT* (Choline Acétyl-Transférase), et plus rarement des défauts des vésicules synaptiques avec des causes génétiques non identifiées à ce jour.
- Les SMC synaptiques qui affectent un composant de la fente synaptique tel que l'agrine ou l'acétylcholinestérase par exemple. Ils correspondent à 10% des mutations décrites chez les patients SMC. On y trouve les mutations de Col-Q, la queue collagénique qui permet l'ancrage de l'AChE dans la fente synaptique. On y trouve également les mutations de la laminine beta2, un constituant de la lame basale synaptique. Enfin, on y trouve les mutations dans le gène de l'agrine.
- Les SMC post-synaptiques qui affectent un composant musculaire de la JNM. Ce sont de loin les plus fréquents (85% des SMC). On y retrouve notamment les SMC causés par des mutations dans l'une des sous unités du RACH, mais également des mutations dans d'autres protéines post synaptiques telles que la Rapsyne, le canal sodium dépendant du voltage SCN4A, MuSK et Dok7 (un effecteur de MuSK).
- Les SMC liés à des gènes codant des protéines ubiquitaires qui participent à la glycosylation. Le bon fonctionnement de nombreuses protéines de la JNM nécessite leur glycosylation, mais la physiopathologie de ces SMC est encore mal comprise.

2) Le syndrome de Lambert-Eaton

Le syndrome de Lambert-Eaton (LEMS) est une maladie auto-immune acquise qui entraîne un dysfonctionnement de la JNM d'origine pré-synaptique. La prévalence de cette pathologie est estimée entre 1,3-1,7 personnes sur 500 000 [34]. Ce syndrome est provoqué par des auto-anticorps dirigés contre les canaux calciques voltage-dépendants de type P/Q de la membrane pré-synaptique de la terminaison nerveuse. Un déficit de ces canaux diminue la libération d'ACh en réponse à un potentiel d'action. D'un point de vue clinique, cela se traduit par une faiblesse musculaire caractéristique. Dans 50% des cas, le LEMS est une manifestation paranéoplasique, le plus souvent associé à un carcinome pulmonaire à petites cellules (*Small Cell Lung Cancer, SCLC*) dont les cellules expriment également des canaux calciques voltage-dépendants. Plus rarement le développement d'un LEMS peut être associé une autre maladie auto-immune [35], [36]. Quel que soit les formes du LEMS, le diagnostic repose sur la détection d'anticorps anti-CCVD (Canaux Calciques Voltages Dépendant) en dosage radio-immunologique (RIA) et/ou de détection d'anomalies typiques du test de stimulation nerveuse répétitive.

3) La myasthénie auto-immune

Également appelée « *myasthenia gravis* » (MG), il s'agit d'une maladie auto-immune à médiation humorale dépendante des lymphocytes T (LT). Ces derniers reconnaissent par erreur un élément du soi comme étant étranger et déclenchent la synthèse d'auto-anticorps spécifiques circulants, responsables d'un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire au niveau de la JNM. Du point de vue fonctionnel et clinique la MG est caractérisée par une faiblesse et une fatigabilité musculaire excessive. La prévalence est estimée à 1 personne 10 000 [37]. Bien qu'elle puisse débuter à tout âge, la MG survient le plus souvent chez de jeunes adultes de moins de 40 ans, majoritairement féminins (60% des cas). Les premiers symptômes de la myasthénie sont dans la moitié des cas purement oculaires (ptosis/diplopie), puis s'étendent le plus souvent à d'autres muscles (pharyngo-laryngés, muscles des membres et muscles respiratoires).

Dans 80 à 90% des cas la myasthénie est dite généralisée parce qu'elle touche la plupart des territoires musculaires. La sévérité des symptômes est étroitement liée à l'atteinte des muscles respiratoires et de la déglutition. Lorsque ces groupes musculaires sont atteints on parle de forme grave pouvant altérer le pronostic vital, qui est généralement bon dans cette pathologie. Ces formes graves concernent 20 à 30% des patients. L'évolution de la maladie est imprévisible.

Elle se fait par poussées successives, éventuellement entrecoupées de phases de rémission, avec une tendance à l'aggravation dans les premières années. Dans 20% des cas, la myasthénie est associée à un thymome, c'est-à-dire une tumeur bénigne (67% sans franchissement de la barrière thymique) ou maligne du thymus. Enfin, plusieurs types de maladies auto-immunes peuvent s'associer à la myasthénie, au premier rang desquelles une dysthyroïdie [27], [38], [39]. Afin d'établir un « score » de gravité, la communauté médicale et scientifique utilisent la classification internationale de la « Myasthenia Gravis Foundation of America » (MGFA).

Le diagnostic de la myasthénie est difficile et repose sur une série d'arguments cliniques et paracliniques. En premier lieu, la présence de signes et symptômes évocateurs sont recherchés tels que : diplopie, ptosis, troubles bulbaires, faiblesse et fatigue des membres et/ou des muscles cervicaux ; une nature exclusivement musculaire ; une aggravation des symptômes à l'effort ; une chronologie spécifique avec variabilité des symptômes et des poussées correspondant à une aggravation de la maladie. Dans un second temps, une réponse favorable à un traitement d'épreuve par anticholinestérasiques est recherchée. En inhibant l'AChE, ces molécules empêchent la dégradation de l'acétylcholine libérée et augmentent sa disponibilité dans la fente synaptique. En parallèle, les tests paracliniques comprennent : i) un EMG qui peut révéler des signes de dysfonctionnement de la JNM (décrément de réponse musculaire lors d'une stimulation répétée du nerf), ii) la recherche d'auto-anticorps dirigés contre des cibles spécifiques de la JNM et iii) un scanner thoracique à la recherche d'anomalies thymiques.

Néanmoins, dans la mesure où cette maladie est évolutive, la négativité d'un bilan n'élimine pas pour autant le diagnostic d'une myasthénie. Il est donc important d'opérer un suivi assidu du patient (visite dès qu'un symptôme apparaît et dosage des anticorps renouvelé plusieurs fois).

Le traitement de la myasthénie a plusieurs objectifs : réduire les symptômes et leur impact sur la qualité de vie du patient, prendre en charge les complications graves impliquant les fonctions vitales, et limiter l'évolution de la maladie. En première intention, les anticholinestérasiques (bromure de Pyridostigmine et chlorure d'Ambénonium) sont utilisés. Si la symptomatologie reste invalidante pour le patient, un plan d'immunothérapie au long cours est mis en place soit par corticothérapie, soit par immunosuppresseurs, voire les deux simultanément. Dans le cas où les traitements précédents n'auraient pas permis d'améliorer la symptomatologie ou tout au moins de la stabiliser, des traitements dits de seconde ligne sont envisagés (comme par exemple le Rituximab, anticorps monoclonal anti-CD20). Un plan d'immunothérapie à court terme peut également être envisagé (échange plasmatique et/ou administration intraveineuse d'immunoglobulines). Enfin, une thymectomie est systématiquement effectuée en cas de thymome, quelle que soit la sévérité de la myasthénie. Actuellement, le bénéfice de cette chirurgie n'a pas été démontré chez les patients myasthéniques ne présentant pas de thymome.

PARTIE C : Diagnostic sérologique classique de la myasthénie auto-immune

I. Rappels : Mécanismes de l'auto-immunité

La tolérance au soi s'établit principalement pendant la vie fœtale dans le thymus. En effet, la différenciation et la maturation intra-thymique des LT conduit à l'élimination par apoptose de la majorité des cellules T auto-réactives : ce mécanisme est appelé « sélection négative ». L'auto-immunité est un état pathologique dans lequel le patient doit lutter contre ses propres défenses immunitaires. Le système immunitaire est dit « défaillant » lorsqu'il déclenche une réponse inflammatoire contre des antigènes du soi, d'où le terme de maladie auto-immune. Ces affections évoluent chroniquement tout au long de la vie du patient, avec des phases de poussée (apparition ou aggravation de symptômes) et de rémissions (amélioration temporaire ou pérenne de symptômes).

Selon le type de maladie auto-immune, les lésions peuvent relever d'un ou plusieurs des mécanismes pathologiques suivants :

- Les mécanismes liés aux LT auto-réactifs : ils induisent des lésions cellulaires par différents mécanismes de toxicité (libération de molécules nocives pour les cellules, induction directe de la mort de la cellule cible...). L'identification de l'auto-antigène ciblé par le système immunitaire est alors cruciale pour la compréhension du mécanisme de la maladie auto-immune étudiée.

- Les mécanismes liés aux auto-anticorps : produits par les lymphocytes B (LB) ces derniers peuvent, en cas de défaillance du système immunitaire, avoir une action pathogène. On observe par exemple une toxicité vis-à-vis des globules rouges dans les anémies hémolytiques auto-immunes, la formation de complexes immuns en cas de néphropathies glomérulaires du lupus, ou encore des interactions avec des récepteurs cellulaires comme dans le cas de la myasthénie (anticorps anti-récepteur de l'acétylcholine) ou dans l'hyperthyroïdie (anticorps anti-récepteur de la TSH). Des auto-anticorps dirigés contre les phospholipides peuvent également interférer avec des facteurs de la coagulation sanguine. Enfin, certains auto-anticorps peuvent être transmis de la femme enceinte à son enfant via le placenta. C'est le cas des anticorps dirigés contre le RACH dans la myasthénie. À la naissance, l'enfant présente alors les symptômes de la maladie qui disparaîtront lorsque les anticorps maternels seront éliminés au cours des premières semaines de vie. Il existe trois types de mécanismes pathogènes des auto-anticorps dans les maladies auto-immunes, détaillés dans le tableau 1.

Tableau 1: Principaux modes d'action pathogène des auto-anticorps

Mécanismes	Exemples
Action directe sur la cellule cible	- Liaison directe à la membrane cellulaire (via les récepteurs ou les antigènes exprimés) - Destruction par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (de l'anglais <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> : ADCC) - Formation d'un complexe immunitaire <i>in situ</i> et cytolyse par activation du complément
Action directe sur l'antigène cible	- Blocage de la fonction d'un récepteur (fixation des ligands, blocage du canal ionique) - Inhibition de l'activité d'une enzyme
Action des Complexes Immuns (CI)	- Formation de CI solubles avec l'antigène (Ag) - Activation du complément - Réaction inflammatoire (cytokines) - Dépôt des CI sur la cellule cible - Cytolyse par activation du complément <i>in situ</i>

- Les mécanismes liés aux cytokines : la sécrétion anormale de cytokines joue aussi un rôle, en favorisant l'inflammation et la dérégulation de l'immunité. Il peut notamment s'agir de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 ou du facteur TNF alpha (*tumor necrosis factor*). Tous les deux sont impliqués dans la polyarthrite rhumatoïde.

Il existe de nombreux cas familiaux de maladies auto-immunes, ce qui indique que le terrain génétique joue également un rôle important.

Plusieurs gènes sont impliqués dans le fonctionnement du système immunitaire (c'est le cas par exemple des gènes HLA). Le plus souvent, les maladies auto-immunes d'origine génétique sont liées à l'association de plusieurs particularités génétiques et les cas dont la survenue est liée à la mutation d'un seul gène sont très rares. Néanmoins, c'est le cas de la polyendocrinopathie auto-immune de type 1 (APECED) ou de l'entéropathie auto-immune de type 1 (IPEX).

Dans le cas de la myasthénie auto-immune, la physiopathologie s'articule autour de trois acteurs essentiels : le thymus où s'effectue la maturation des LT et le couple auto-anticorps pathogènes/LB.

II. Auto-anticorps « classiques » dans la myasthénie auto-immune

1) Diagnostic sérologique classique de la myasthénie auto-immune : le dosage radio-immunologique

On estime actuellement que 80% des patients myasthéniques possèdent des auto-anticorps dirigés contre le RACH [40], [41], et environ 10% présentent des auto-anticorps dirigés contre une autre protéine de la JNM telle que MuSK [42], [43]. La recherche d'auto-anticorps chez les patients débute donc par la recherche d'anti-RACH, puis d'anti-MuSK en cas de négativité. La technique de détection repose sur un dosage quantitatif par RIA (abrégié de l'anglais Radio Immuno Assay, traduit par dosage radio-immunologique en français). Cette technique utilise des extraits de cellules TE671 issues de rhabdomyosarcome (tumeur mésenchymateuse maligne), exprimant le RACH. Les extraits sont incubés avec de l'alphabungarotoxine radioactive marquée à l'iode 125. Les éventuels complexes antigène-anticorps sont précipités par des anti-IgG et la radioactivité des précipités est mesurée [44].

2) Caractéristiques clinico-biologiques des auto-anticorps

a. *Les anticorps anti-RACH*

La majorité des patients myasthéniques possèdent des auto-anticorps anti-RACH, principalement de la sous-classe d'immunoglobulines (Ig) IgG1 et IgG3. Ils sont directement pathogènes comme le montre l'injection chez le rat ou la souris d'Ig purifiées à partir de sérums de patients myasthéniques. En effet, Les animaux inoculés présentent des symptômes caractéristiques de ceux retrouvés chez les patients, associés à des décréments typiques à l'EMG. Ce protocole d'inoculation est appelé transfert passif. Les auto-anticorps humains reconnaissent le RACH des rongeurs et induisent une réduction du nombre de récepteur et donc une perte de transmission neuromusculaire. Trois modes d'action ont été mis en évidence : i) le blocage du site de fixation de l'ACH, ii) la dégradation accélérée des RACH membranaires et enfin iii) la destruction de la membrane post-synaptique par le complément (Figure 9). Aucune corrélation entre la sévérité des symptômes et le titre d'anticorps mesuré en RIA n'a été démontrée [27], [45].

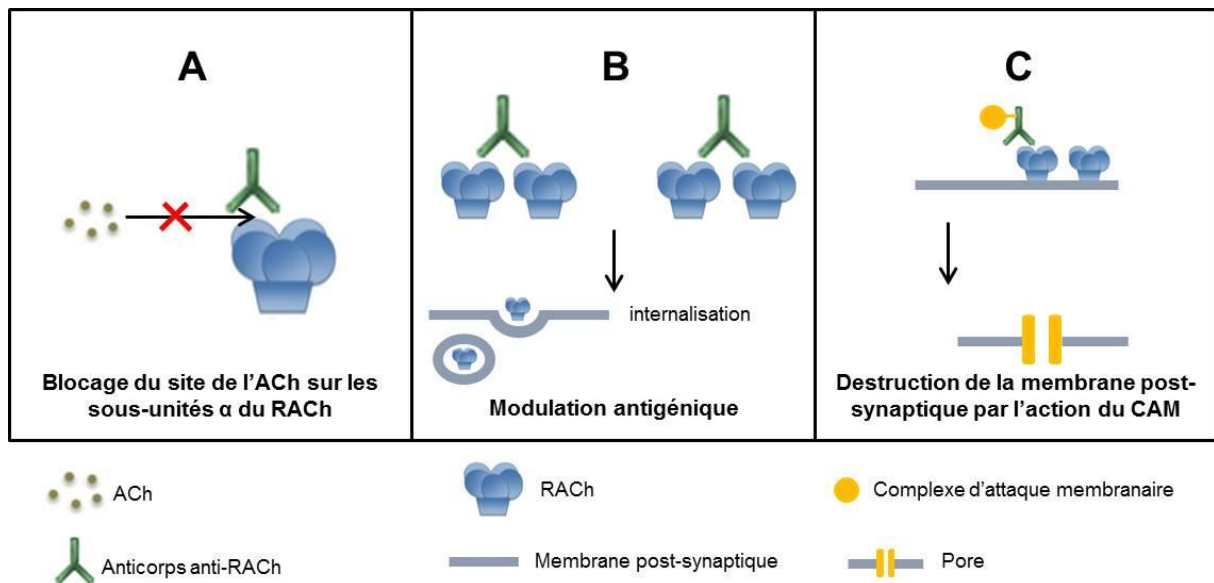


Figure 9 : Mécanismes d'actions des anticorps anti-RACH. (A) Blocage du site de fixation de l'acétylcholine par les auto-anticorps (effet de type curare). (B) Dégradation accélérée du RACH membranaire suite à un pontage de molécules adjacentes par les anticorps qui sont divalents (modulation antigénique) (C) Destruction de la membrane post-synaptique par le complexe d'attaque membranaire du complément C5b-9.

b. Les anticorps anti-MuSK

Les anticorps anti-MuSK s'observent essentiellement dans des formes généralisées sévères de myasthénie. Ils représentent environ 40% des cas sans anti-RACH mis en évidence, avec une bonne corrélation entre la sévérité et le titre d'anticorps mesuré en RIA. Les auto-anticorps anti-MuSK retrouvés chez la majorité des patients sont de la sous classe d'immunoglobulines IgG4. Ces anticorps ne permettent pas de liaison au complément. *In vitro*, ils empêchent la liaison de LRP4 à MuSK et interfèrent avec l'activation de l'activité kinase de MuSK par l'agrine. Tout comme les anti-RACH, ils sont directement pathogènes puisque leur transfert passif chez la souris cause une faiblesse musculaire et des anomalies morphologiques des JNM [27], [45].

Ce test appliqué en routine permet de poser un diagnostic dans environ 90% des cas. Néanmoins, il reste une part importante de patients pour lesquels on ne peut pas statuer, en raison de la négativité de leurs dosages : cette fraction est ainsi appelée SNMG pour Sero Negative Myasthenia Gravis. Ce terme est trompeur dans la mesure où la plupart des patients séronégatifs ont bien une myasthénie auto-immune mais possèdent des auto-anticorps dirigés contre d'autres antigènes que RACH ou MuSK tels que détectés en RIA.

PARTIE D : Nouveaux tests de détection et nouvelles cibles antigéniques

I. Détection du récepteur d'acétylcholine sous forme agrégée

En 2008, l'équipe du Docteur Angela VINCENT à Oxford a démontré que parmi les patients SNMG, certains possèdent des anticorps anti-RACH qui ne se lient au RACH que lorsqu'il est sous forme agrégée. Ils sont mis en évidence par une technique d'immunofluorescence sur cellules en culture appelée test cellulaire ou Cell Based Assays (CBA) [1].

La méthode CBA consiste à transfecter des cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney), avec un ensemble de plasmides permettant d'exprimer les quatre sous-unités (α , β , δ , ϵ) du RACH (Figure 6). Afin d'agréger les molécules de RACH à la membrane, un vecteur d'expression pour la Rapsyne est co-transfecté. En présence de Rapsyne, les molécules de RACH forment des agrégats membranaires (clusters). Les cellules transfectées sont ensuite mises en contact avec les sérums de patients. Après lavage et fixation des cellules, la liaison d'anticorps aux agrégats membranaires de RACH est visualisée par immunofluorescence avec un anticorps secondaire anti-IgG humain et de l'alphabungarotoxine couplée à un fluorophore.

Contrairement à la technique de détection par RIA dans laquelle les molécules de RACH sont solubilisées, ce test permet de détecter les RACH dans un environnement membranaire plus proche de la physiologie. De plus, le fait que les cellules soient vivantes lors de l'incubation avec les sérums, donc non perméabilisées, permet de s'assurer que les anticorps aient uniquement accès aux protéines membranaires, ce qui diminue le risque de faux négatifs et les problèmes de bruits de fond [1], [46].

Les anticorps spécifiques des formes agrégées du RACH identifiés jusqu'à présent sont des IgG1 capables d'activer le complément par voie classique. Ils sont aussi directement pathogènes, puisqu'un transfert passif chez la souris cause un défaut de la transmission neuromusculaire [47].

Jusqu'à récemment, ce test n'était pas disponible en France, et la fréquence des patients SNMG français possédant des anticorps spécifiques des formes agrégées du RACH n'était pas connue. Pour répondre à cette question, l'équipe du Pr SCHAEFFER a développé en 2014 un test cellulaire pour la détection de ces auto-anticorps particuliers [2]. Cette étude a montré que 16% des patients français SNMG testés possèdent des anticorps anti-RACH de faible affinité [2].

II. Détection d'autres cibles antigéniques

Depuis la description du CBA par le groupe du Dr Angela VINCENT en 2008, cette méthode a été appliquée à la détection d'autres auto-anticorps [1] :

- Les anticorps anti-LRP4 : sont retrouvés en fréquence très variable selon les publications (1,4-53,8%), en fonction des protocoles d'immunofluorescence et les cohortes étudiées. Leur pathogénicité a été démontrée par immunisation de souris avec le domaine extracellulaire de LRP4, mais pas par transfert passif des IgG des patients. On retrouve une activation du complément, et *in vitro*, une inhibition de l'interaction agrine-LRP4 [26], [48]–[52] (Figures 10 et 11).
- Les anticorps anti-agrine : ils ont également une fréquence très variable selon les publications (15 à 50%), là aussi en raison de la diversité des techniques de détection employées. Leur rôle pathogène n'a pas été démontré *in vivo*, mais *in vitro* les anticorps empêchent la phosphorylation de MuSK dépendante de l'agrine, et le regroupement des RACH en *clusters* [51], [53]–[55] (Figures 10 et 11).
- Les anticorps anti-COL-Q : le collagène Q est une sous-unité de la queue collagénique de l'AChE. Son ancrage se fait grâce à MuSK. L'aspect pathogène de cette cible est relatif puisqu'il est associé à MuSK. En effet, les anticorps anti-MuSK bloquent la liaison de COL-Q à la JNM. Un transfert passif chez la souris a montré une réduction de la taille et de la densité de COL-Q de 10% [53], [56], [57].

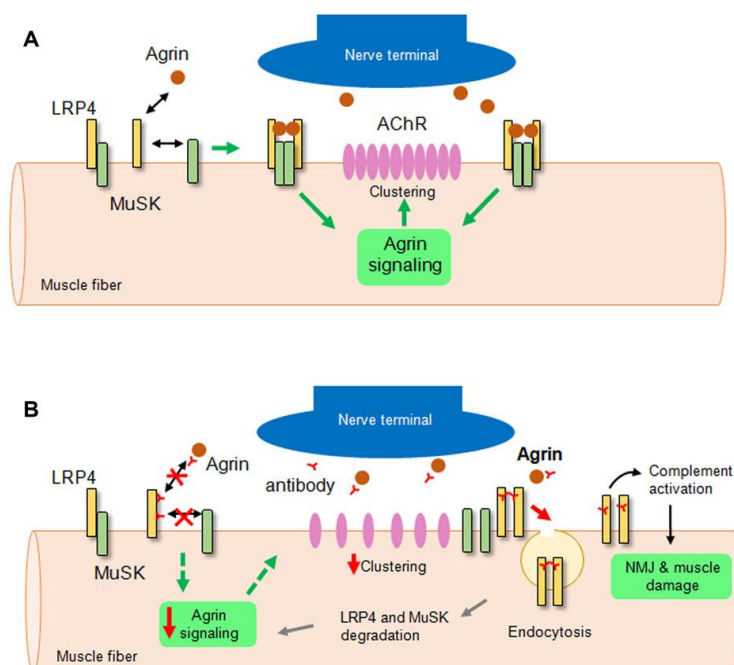


Figure 10 : Mécanisme des auto-anticorps anti-LRP4 et anti-agrine dans la MG (Figure issue de [51]). (A) Voie de signalisation de l'agrine. (B) Mécanisme pathogène des auto-anticorps anti-LRP4 et anti-agrine. Les anticorps peuvent compromettre les interactions agrine-LRP4 et/ou LRP4-MuSK, et réduire les niveaux de surface de LRP4. La signalisation de l'agrine est donc réduite. Les anticorps peuvent provoquer une activation du complément ce qui endommage la JNM et les membranes musculaires.

Table 1. LRP4 antibody-positive MG

Reference	Assay	Cutoff	AChR ab ⁺	AChR ab ⁻ , MuSK ab ⁺	DNMG	Generalized MG	Thymoma	Cohort
52	LUCIP	Mean + 4 SD	0% (0/100)	11% (3/28)	2.2% (6/272)	Yes	No	Japan
51	CBA				53.8% (6/13)	Yes	No	Germany
50	ELISA	Mean + 4 SD	0% (0/61)	2.8% (1/36)	9.2% (11/120)	Yes	No	United States and Greece
54	CBA				8.2% (6/73)	Yes	No	Norway, Italy, the Netherlands, United States, and Japan
64	CBA		7.5% (8/107)	14.9% (10/67)	18.7% (119/635)	Yes	No	Europe and Israel
62	FACS	Mean + 2.5 SD	13% (3/23)	13% (3/23)	14.5% (8/55)	Yes	1	Italy
66	CBA				1.4% (2/145)	Yes	No	United Kingdom
65	CBA				4% (2/50)	Yes	/	China
63	CBA				10.3% (6/58)	Yes	No	China

Abbreviations: LECIP, luciferase-reporter immunoprecipitation; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; CBA, cell-based assay; FACS, fluorescence-activated cell sorting; ab, antibody.

Table 2. Agrin antibody-positive MG

Reference	Assay	Cutoff	AChR ab ⁺	AChR ab ⁻ , MuSK ab ⁺	DNMG	Generalized MG	Thymoma	Cohort
55	ELISA	Mean + 4 SD	11.1% (1/9)	26.7% (4/15)		Yes	/	Germany
53	ELISA	Mean + 3 SD	6% (5/83)	0/6	50% (2/4)	Yes	/	United States
54	CBA				15% (11/73)	Yes	/	Norway, Italy, Netherlands, United States, and Japan

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; CBA, cell-based assay; ab, antibody.

Figure 11 : Récapitulatif des données issues de différentes sources concernant les anticorps anti-LRP4 (Table 1) et agrine (Table 2) (Figure issue de [51])

D'autre part, l'association d'auto-anticorps anti-RACH avec d'autres auto-anticorps a été décrite. On retrouve classiquement des anticorps anti-Titine et anti-RyR. Toutefois leur pathogénicité n'a pas été clairement mise en évidence. Cependant, la détection de ces anticorps peut avoir un intérêt pour le diagnostic. En effet, la présence d'anticorps anti-Titine est souvent associée à un thymome et à des formes sévères de la maladie [58], [59].

À l'heure actuelle, les tests cellulaires réalisés se font en utilisant des cellules non musculaires transfectées avec des vecteurs codant pour une cible auto-immune donnée.

Aucun test cellulaire pour les myasthénies n'étant disponible en France, mon travail au cours de mon diplôme EPHE a consisté à développer des tests de diagnostic dans un cadre hospitalier. J'ai dans un premier temps travaillé à la validation du test de détection des anticorps spécifiques du RACH agrégé pour une utilisation à visée diagnostic. La démarche actuelle des laboratoires de biologie médicale des Hospices Civils de Lyon (HCL) est d'obtenir une accréditation sur l'ensemble de leurs activités. Dans ce contexte, la validation d'un nouveau test pour le diagnostic nécessite entre autres de l'inscrire dans une démarche qualité.

PARTIE E : La qualité

Le laboratoire dans lequel je travaille est certifié selon la norme NFS96-900 (2011) (démarche volontaire) et est engagé dans une démarche d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189 (démarche obligatoire des laboratoires de biologie médicale, selon l'ordonnance de la Biologie du 13 janvier 2010). Cela implique la mise en place et le respect de règles de qualité strictes qui ont été définies par les autorités compétentes.

I. Concept de la qualité

1) Définition

La qualité est l'aptitude d'un produit ou service à satisfaire les exigences spécifiées. L'assurance qualité quant à elle, permet de garantir au client le respect de ces exigences, tout en s'assurant que l'organisation de la structure est conforme à une politique qualité clairement définie. La norme NF EN ISO 9001 définit les exigences concernant l'organisation d'un système de gestion de la qualité. Cette dernière permet aux structures de mettre en place un système qualité fiable et ainsi, garantir la conformité d'un produit ou d'un service par rapport aux exigences préétablies. Un des outils les plus utilisés permettant une bonne gestion de la qualité et l'objectif d'amélioration continue est « la roue de Deming » encore appelé « plan-do-check-act » (Figure 12).

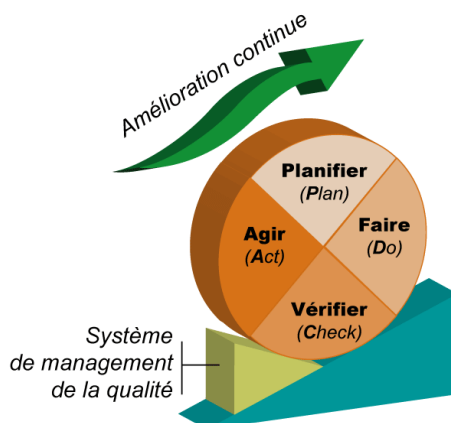


Figure 12 : Représentation schématique de la roue de Deming (Figure issue de « www.kaizen-skills.ma »)

Cela consiste à repérer les quatre étapes à mettre en œuvre pour améliorer la qualité dans une organisation :

- *Planifier ce que l'on va réaliser...* Identifier le problème ou le processus à améliorer. Des causes et des solutions possibles sont ensuite recherchées ce qui correspond à l'établissement d'un cahier des charges. Enfin, un planning pour résoudre le problème est défini et mis en place.
- *Faire...* Développer et réaliser les solutions selon le cahier des charges et le planning.

- *Vérifier...* Contrôler si les solutions établies sont efficaces, notamment grâce à des indicateurs de performance.
- *Agir...* Analyser et améliorer ce qui a été réalisé.

2) Système de management de la qualité

Dans le contexte d'accréditation, le laboratoire de biologie médicale doit mettre en place un système de management de la qualité (SMQ) afin de permettre l'application de pratiques analytiques efficaces. Le SMQ est l'ensemble des activités par lesquelles l'organisme définit, met en œuvre et revoit sa politique et ses objectifs qualité conformément à sa stratégie. Il est donc constitué de processus corrélés et interactifs utilisant des ressources pour atteindre les résultats visés.

Tableau 2: Exigences de la norme en termes de management de la qualité et d'exigences techniques

Management de la qualité	Exigences techniques
1- Organisation et management	1- Personnel
2- Système de management de la qualité	2- Locaux et conditions environnementales
3- Maîtrise des documents	3- Matériel de laboratoire
4- Contrats de prestations	4- Processus pré analytique
5- Examens transmis à des laboratoires sous-traitants	5- Processus analytique
6- Services externes et approvisionnement	6- Garantie de qualité des résultats
7- Prestation de conseil	7- Processus post analytique
8- Traitement des réclamations	8- Compte rendu des résultats
9- Identification et maîtrise des non conformités	9- Diffusion des résultats
10- Actions correctives	10- Gestion des informations de laboratoire
11- Actions préventives	
12- Amélioration continue	
13- Maîtrise des enregistrements	
14- Audits internes	
15- Revue de direction	

3) Système documentaire

En parallèle du SMQ, un système documentaire doit également être mis en place. La documentation intervient à tous les niveaux et ses intérêts sont multiples : elle facilite la communication et l'évaluation de l'efficacité du système établi par l'organisme, tout en assurant la cohérence des actions menées, ainsi que la traçabilité.

Les quatre principes pour une documentation qualité sont : i) Prévoir... écrire ce que l'on va faire ; ii) Pratiquer... faire ce que l'on a écrit ; iii) Prouver... écrire ce que l'on a fait ; et iv) Progresser... revoir ce que l'on a fait.

Ces règles reprennent le principe de « la roue de Deming » (Figure12).

II. L'accréditation des laboratoires d'analyses médicales

La loi Hôpital Patient Santé Territoire (HPST) votée le 21 juillet 2009 a permis au système de soin français de mieux adapter les institutions et structures au besoin des populations (Ministère de la santé et des sports. La loi HPST à l'hôpital, les clés pour comprendre. Novembre 2012 : 64-9). Ce texte se compose de quatre parties regroupant 133 articles faisant de la qualité un objectif primordial. Par exemple, l'article 69 porte sur la biologie médicale dont l'une des missions est de garantir la qualité des examens de biologie, notamment par une procédure d'accréditation des laboratoires. Cet article est suivi de l'ordonnance du 13 janvier 2010, dans lequel est explicité entre autres :

- L'article L6222-4 du Code de la Santé Publique, qui précise qu'un établissement public de santé ne peut compter en son sein qu'un seul laboratoire de biologie médicale (pour les HCL, c'est le Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites, LBMMS) ;
- L'article L6221-1, qui rend obligatoire l'accréditation de l'ensemble des activités des laboratoires de biologie médicale. Cette accréditation se fera d'après les normes NF EN ISO 15189 et NF EN ISO 22870, qui définissent les exigences générales concernant la qualité et la compétence des laboratoires de biologie médicale et des laboratoires d'essai, d'après l'arrêté du 5 août 2010.

Seul le Comité Français d'Accréditation(COFRAC) est habilité à accorder une accréditation en France. Le processus d'accréditation du LBMMS a commencé depuis 2015 et doit être complet d'ici octobre 2020. Dans ce contexte, la mise en place d'un nouvel acte de biologie médicale en routine dans un service hospitalier nécessite une validation de méthode qui sera inspectée par le COFRAC.

III. La validation de méthode

La validation ou vérification de méthode consiste à évaluer, dans l'environnement propre au laboratoire, les performances des techniques mises en œuvre et à vérifier leur conformité aux limites d'acceptabilité fixées afin de répondre à l'utilisation prévue. Toutes les données et résultats du dossier de validation doivent être renseignés dans un formulaire fourni par le COFRAC : le SH-FORM-43. Chaque item doit être complété de manière claire et cohérente en respectant la mise en forme du dossier. Cette étape est obligatoire pour l'accréditation du test concerné. C'est pourquoi, nous avons réalisé une validation de méthode pour le protocole de détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité.

PROBLEMATIQUES

La myasthénie est une maladie auto-immune rare, affectant environ 10 personnes sur 10⁶ par an en France. Le diagnostic de cette pathologie est complexe. En effet, il repose sur une série d'arguments cliniques et paracliniques, dont la recherche d'auto-anticorps spécifiques de la JNM. Dans 80% des cas les auto-anticorps sont dirigés contre la sous-unité $\alpha 1$ des RACH et dans 10% des cas contre la sous-unité MuSK du récepteur de l'agrine, tous deux identifiés par un test classique de RIA. Les 10% de patients restant sont donc séronégatifs et restent pour l'heure sans diagnostic.

Dans ce contexte, l'objectif principal de mon travail dans le cadre du diplôme de l'EPHE a été de développer et mettre en place des outils et des techniques, afin d'améliorer et d'accélérer le diagnostic des patients SNMG. Pour ce faire, mon projet a été divisé en trois parties à savoir i) développer et mettre en place un test innovant de détection des auto-anticorps anti-RACH au sein d'un service hospitalier, ii) étendre ce test à la recherche d'autres cibles antigéniques impliquées dans la myasthénie et iii) mettre au point une technique de détection non spécifique de l'ensemble des auto-anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie.

Plus précisément, le premier objectif fixé dans le cadre de mon EPHE est de mettre en place en routine un test de détection auto-anticorps anti-RACH de faible affinité. Il a été mis en évidence par une technique alternative d'immunofluorescence sur cellules en culture (technique en CBA), que parmi les 10% de patients SNMG, certains possèdent des anticorps anti-RACH dits de faible affinité. Ces derniers sont sensibles à la conformation du récepteur, notamment à son recrutement en agrégats membranaires fonctionnels, regroupement causé par la protéine rapsyne. Ces anticorps échappent à la détection par les méthodes couramment utilisées. Dans ce contexte, l'équipe du Pr SCHAEFFER a mis au point un test de détection de tels anticorps [2]. Ce test a été validé sur une cohorte nationale de patients myasthéniques séronégatifs, grâce à la collecte des sérums de ces derniers auprès des principaux CHU français, par l'intermédiaire de la sérothèque Neurobiotec [2]. Néanmoins, cette technique est toujours cantonnée au domaine de la recherche. Afin que ce test devienne disponible en routine, je l'ai adapté et validé pour répondre au fonctionnement, aux équipements, ainsi qu'aux exigences liées à l'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189. La mise en place de ce test de diagnostic au sein d'un service hospitalier a permis de rendre un résultat fiable à une partie des patients SNMG que l'on a pu tester.

La deuxième partie de mon travail étudie la possibilité d'étendre ce test sérologique cellulaire à la recherche d'autres cibles antigéniques potentiellement responsables de myasthénies, comme certaines études récentes le suggèrent. Le récepteur musculaire de l'agrine, LRP4, a récemment été montré comme étant une cible privilégiée chez certains patients séronégatifs [49]. Selon ce principe, d'autres protéines connues comme constituants structuraux de la JNM pourraient également représenter des candidats antigéniques intéressant chez certains patients.

L'objectif est donc d'adapter la technique en CBA mise en place pour la détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité, afin de détecter dans les sérums de patients des anticorps dirigés contre d'autres protéines impliquées dans le fonctionnement de la JNM. Initialement, nous nous sommes intéressés à l'agrine, MuSK et LRP4. À plus long terme, il faudrait envisager d'étendre cette recherche à d'autres protéines.

Le troisième axe de mon travail est de développer une approche différente pour le diagnostic des patients myasthéniques. Jusqu'à présent, les stratégies développées utilisent des cellules non musculaires auxquelles on fait exprimer un des constituants de la JNM connus comme étant un antigène impliqué dans la myasthénie. Ces techniques sont longues à mettre en œuvre et il n'est actuellement pas possible de réaliser le screening de toutes les cibles antigéniques potentielles. L'objectif de cette nouvelle approche est donc à court terme d'affirmer au patient qu'il est atteint ou non de myasthénie, sans forcément connaître la cible antigénique que visent ses auto-anticorps. Il s'agit d'une recherche dite globale et non spécifique des anticorps dirigés contre la structure post-synaptique de la JNM. Concrètement, il a fallu recréer *in vitro* des JNM, à partir de myoblastes humains, primaires ou immortalisés, différenciés en myotubes. Puis, les amener à développer des JNM par l'ajout d'agrine recombinante, et par l'utilisation de contraintes mécaniques, grâce au système dit de culture en « micropattern ».

MATERIEL ET MÉTHODE

I. La sérothèque

1) Constitution d'une sérothèque associée à des données cliniques

L'amélioration du diagnostic de la myasthénie a nécessité l'utilisation de sérums de patients SNMG, de patients séropositifs pour les auto-anticorps anti-RACH en RIA, de patients atteints de différentes pathologies auto-immunes (à titre de contrôle positif), et de sérums de patients sains (à titre de contrôle négatif). La constitution d'une sérothèque a donc été l'une de mes missions. Les premiers sérums inclus résultent de la cohorte de patients réalisée par le Dr DEVIC et le Dr SIMONET. Ces échantillons ont été analysés dans les travaux portant sur la méthode en CBA de détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité [2]. Cette cohorte regroupe des sérums issus de patients SNMG, séropositifs anti-RACH et anti-MuSK, et atteints de neuropathies dysimmunes (NPD) ou de sclérose en plaque (SEP). Les sérums inclus par la suite dans la sérothèque résultent de la prescription des cliniciens pour le diagnostic des auto-anticorps anti-RACH. Afin de pouvoir gérer l'arrivée et le traitement de ces sérums, et pouvoir également corréler par la suite les données cliniques des patients avec les résultats des tests sérologiques, j'ai créé des tableaux de données sous Excel regroupant toutes ces informations.

Ces données ont été difficiles à rassembler pour les sérums que nous possédions déjà, ou encore pour les nouveaux. C'est pourquoi, j'ai créé des documents types : i) fiche de liaison, ii) fiche de données cliniques (réalisée en collaboration avec le Dr DEVIC et validée par le Dr PETIOT) et iii) consentement éclairé au prélèvement et à la conservation (Annexe 1 (A) (B) (C)). Ces documents sont à remplir par les cliniciens au moment du prélèvement du sérum. Ils offrent l'avantage de répertorier tous les renseignements indispensables à la bonne gestion de la sérothèque, et de pouvoir *in fine* comparer l'aspect clinique des patients à leurs résultats de dosages sérologiques.

2) Préservation des sérums

Dans la mesure où les sérums ont été prélevés sur l'ensemble du territoire, des règles de prélèvement et d'acheminement ont été établies et spécifiées aux cliniciens. L'objectif est de préserver l'intégrité de l'échantillon et de rendre un diagnostic fiable à chaque patient dans les meilleurs délais.

Ces recommandations ont été consignées sur Biobook (catalogue des examens de biologie réalisés au LBMMS des HCL, disponible pour tous via internet) et sur une fiche de liaison.

Différentes étapes de prétraitement sont réalisées. Le sang doit être prélevé sur Tube Sec (bouchon de couleur rouge, référence : BD 366880) ou sur Tube SST avec accélérateur de coagulation et gel séparateur (bouchon de couleur or, référence : BD 367957). Le préleveur a ensuite plusieurs choix possibles en termes de gestion du prélèvement (Figure 13).

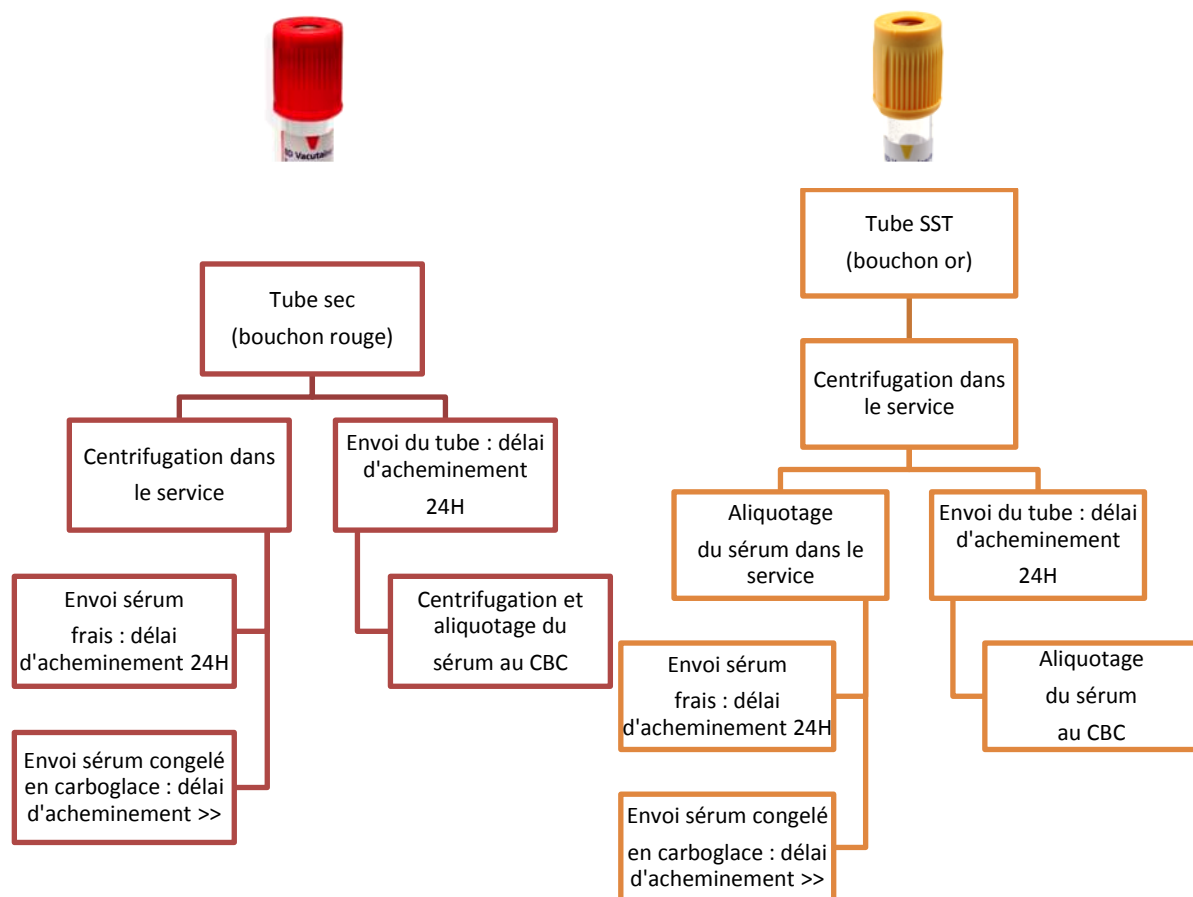


Figure 13 : Représentation schématique des possibilités de prélèvement, traitement, et envoi des sérums de patients

Une fois arrivés au CBC et enregistrés selon nos procédures dans notre système de traçabilité, les sérums sont stockés et conservés dans une enceinte à -80°C . Cette température permet de garantir la stabilité des échantillons.

II. La culture de cellules

1) Obtention des lignées cellulaires

La lignée de cellules HEK 293 ainsi que la lignée de cellules C2C12 (myoblastes murins) proviennent du laboratoire du Pr SCHAEFFER à l'Institut NeuroMyoGène (INMG). Les lignées de myoblastes humains immortalisées n°1 et 2 ont été données par le Dr LEBLANC de l'INMG. La lignée de myoblastes primaire V177 a quant à elle été obtenue par mise en culture d'une biopsie musculaire.

a. Mise en culture

Une biopsie du quadriceps gauche d'un jeune patient masculin a été réalisée en 2013 par le Dr STREICHENBERGER. Ensuite, la mise en culture de cette dernière a été faite au CBC. Dans un premier temps, la biopsie a été triée sous loupe binoculaire dans du NaCl 0,9%, afin de retirer tous les éléments non striés (essentiellement de l'aponévrose, du tissu adipeux et du sang). Dans un second temps, après avoir été dissociée mécaniquement, la biopsie a été placée dans une solution de digestion enzymatique composée de Trypsine (LONZA référence : BE17-160E) diluée au $1/10^{\text{ème}}$ et de collagénase de type I (Life Technologies référence : 17100-017) utilisée à 2mg/mL, et incubée 1h à 37°C-5%-CO₂ sous agitation. Après avoir été centrifugées 10mn à 500g, les cellules ont été récupérées et mises en culture dans une flasques T25 préalablement recouverts d'une solution de collagène de type I (BD BioCoat TM référence : 356484) avec 4mL de milieu CHANG D (CLINISCIENCE référence T105-500). Les cellules ont été observées et le milieu a été changé deux fois par semaine jusqu'à l'obtention d'une quantité cellulaire suffisante pour un premier repiquage.

b. Tri magnétique

Après plusieurs repiquages dans le but d'obtenir deux flasques T75 possédant une confluence d'environ 60%, la suspension cellulaire a été triée afin d'éliminer les cellules de types non myogénique (en majeure partie des fibroblastes). Ce tri a été effectué grâce à la technologie MACS (de l'anglais Magnetic Activated Cell Storing). Les cellules décollées à l'aide de trypsine ont été reprises dans 5mL de milieu de prolifération composé de : $\frac{3}{4}$ de HAM F10 (EUROBIO référence CM1H1000-1) supplémenté de 20% de SVF et $\frac{1}{4}$ de CHANG D (CLINISCIENCE référence T105-500). Un volume de 100µL de cette suspension a été mis en culture dans le puits d'une LabTek 4 chambres en verre (D.Dutscher référence : 055074) avec 900µL de milieu de prolifération, en vue d'un marquage ultérieur. Le reste de la suspension a été centrifugé pendant 10mn à 500g. Après une reprise douce du culot cellulaire dans 50µL de tampon PBS-BSA0,5%, 20µL d'anticorps anti-CD56 (CD56 Micro Beads MILTENY BIOTEC référence : 130-050-401) ont été ajoutés. La suspension a été incubée durant 15mn à +4°C. Puis, 2mL de tampon PBS-BSA0,5% ont été ajoutés de façon lente, et la suspension a de nouveau été centrifugée 10mn à 500g. Pendant ce temps, une colonne de tri et un tube de récupération ont été placés sur un aimant MACS (Colonne MILTENY BIOTEC référence : 130-042-201), et la colonne a été conditionnée avec 500µL de tampon PBS-BSA0,5%. À la fin de la centrifugation, le culot a été repris dans 500µL de tampon PBS-BSA0,5%. Cette suspension a été rincée trois fois avec 500µL de tampon PBS-BSA0,5% afin d'éluer les cellules non myogéniques. Enfin, la colonne a été placée sur un tube propre et les cellules myogéniques ont été éluées grâce au piston fourni avec la colonne et ce dans mL de tampon PBS-BSA0,5%. 50µL de cette suspension ont été mis en culture dans le second puits de la Lab Tek en présence de 900µL de milieu de prolifération, le reste a été mis en culture dans deux flasques T25 coatées au collagène I avec 4mL de milieu de prolifération dans chaque, afin de les amplifier et de les cryopréserver. Le marquage à la desmine des cellules cultivées sur la Lab Tek a permis d'apprécier la quantité de cellules myogéniques avant et après le tri.

NB : En vue d'utilisation ultérieure, cette lignée a également été immortalisée. Cette étape a été réalisée par le Dr LEBLANC à l'INMG. Concrètement, après les premiers repiquages, les cellules ont été ensemencées sur une plaque 12 puits à raison de 70'000 cellules/puits et incubées 24H à 37°C-5%-CO₂. Elles ont ensuite été mises en contact avec le virus contenant les séquences Htert-CDK4 en présence de polybrène. Puis, les cellules ont été sélectionnées grâce à l'antibiotique puromycine jusqu'à la mort des cellules non transduites par le virus (approximativement quatre jours). Les cellules restantes ainsi immortalisées ont été amplifiées et cryoconservées.

2) Entretien des cellules

a. **Lignée cellulaire HEK 293**

Les cellules HEK 293, ont été choisies pour plusieurs raisons : i) largement décrites dans la littérature (par exemple leur technique de culture et leur réponse à la transfection sont bien connues), ii) simplicité de culture, iii) stabilité dans le temps, iv) fort taux de transfection par rapport aux autres cellules et v) capacité à exprimer les protéines d'intérêt (telles que les RACH ou encore MuSK).

Elles ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium ; LONZA référence : BE12-604F) enrichi par 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et 100 Unités/mL de pénicilline G et streptomycine (P/S) (LONZA référence : DE17-602E) sous atmosphère à 37°C-5%-CO₂. Une fois par semaine, les cellules sont repiquées à l'aide de trypsine (dissociation enzymatique) et maintenues en culture dans deux flasques T75 (BD Falcon TM référence : 353024). Une flasque avec une dilution au 1/100^{ème} et la seconde avec une dilution au 1/200^{ème}, chacune contenant 16mL de DMEM-10%SVF-P/S.

b. **Lignée cellulaire de myoblastes humains**

Les myoblastes humains, qu'ils soient primaires ou immortalisés, sont cultivés dans des flasques T75 préalablement recouverts d'une solution de collagène de type I (BD BioCoat TM référence : 356485), dans un milieu de prolifération. Ils sont repiqués à l'aide de trypsine et dilués une fois par semaine afin de ne pas dépasser 60% de confluence.

c. **Lignée cellulaire de myoblastes murins**

Les myoblastes murins sont cultivés dans des flasques T75 avec du milieu DMEM enrichi par 10% de SVF et 100 Unités/mL de P/S sous atmosphère à 37°C-5%-CO₂. De la même façon que les myoblastes humains, ils sont repiqués à l'aide de trypsine et dilués une fois par semaine afin de ne pas dépasser 60% de confluence.

3) Cryopréservation des cellules

La congélation des cellules a été réalisée, à partir d'une flasque T75 par cryotube (soit environ 1×10^6 cellules). Après l'arrêt de l'action de la trypsine et centrifugation (10mn à 500g), le culot cellulaire est repris dans 1mL de solution de cryopréservation composée de milieu HAM F10 (Eurobio référence : cm1h1000-01) et 4% de DMSO (Diméthyl Sulfoxyde), agent cryoprotecteur (Sigma référence : 018234). Rapidement, les cellules en suspension ont été placées dans les vapeurs d'azote, afin d'assurer une descente en température progressive à raison de 1°C par minute, durant 3h. Les cryotubes ont ensuite été transférées en azote liquide à -196 °C.

4) Culture sur plaque myoscreen de CYTOO

Afin de pouvoir observer des structures post-synaptiques de la jonction similaire à celles retrouvées *in vivo*, il a fallu mettre au point un protocole de culture de myoblastes humains primaires, contraints à fusionner mécaniquement et à exprimer les éléments de la JNM par ajout d'agrine *in vitro*. Les plaques utilisées pour ce test sont commercialisées par la société CYTOO. Ce sont des plaques 96 puits en verre dont les micropatterns ont été réalisés par traitement UV, et traités à la fibronectine (20µg/mL). Le protocole d'utilisation de ces plaques afin de produire des agrégats de RACH sur des myoblastes en culture est confidentiel. Brièvement, les cellules ont étéensemencées dans du milieu de prolifération et incubées 24H à 37°C-5%-CO₂. Le lendemain (J+1), le milieu de prolifération des cellules a été changé par un milieu de différenciation. Après cela, les plaques ont été incubées environ sept jours à 37°C-5%-CO₂. À J+7, de l'agrine a été au milieu et la plaque de nouveau incubée pour 24H à 37°C-5%-CO₂. À J+8, les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% (SIGMA référence : F8775-25ML), lavées puis marquées selon la méthode décrite ci-dessous (paragraphe IV.2 page 48) avec différents anticorps primaires et secondaires définis selon les cibles à étudier (cf. liste des anticorps page 48).

III. La transfection de cellules

1) Les différents plasmides

- Les plasmides permettant l'expression des sous-unités du RACH ont été fournis au laboratoire de recherche du Pr SCHAEFFER par le Dr GRAILHE, de l'institut Pasteur de Séoul, Corée. Il s'agit des ADN complémentaires (ADNc) des gènes humains CHRNA1, CHRNB1, CHRND et CHRNE, insérés chacun dans un vecteur pCDNA3 (Invitrogen), sous contrôle du promoteur CMV [1], [60].
- Pour l'expression de la rapsyne couplée à la GFP, le vecteur a été fourni par le laboratoire du Pr SCHAEFFER. Il s'agit du plasmide pCDNA3 dans lequel a été inséré l'ADNc du gène murin RAPSN, fusionné en 3' en respectant le cadre de lecture avec la séquence codante de la GFP. Son activité d'agrégation des RACH humains a été vérifiée en immunofluorescence avant mon arrivée dans ce projet [1], [61].

- L'ADNc du gène LRP4 humain est inclus dans le plasmide pMES, en aval du promoteur de la bêta-Actine, et en amont d'une séquence IRES (*international ribosome entry site*) et de la séquence codante de l'EGFP, permettant l'expression conjointe des protéines LRP4 et GFP non fusionnées. Ce vecteur est un don du Dr KROGER (Munich, Allemagne).
- Pour l'Agrine, l'ADNc du gène humain AGRN, fusionné en 3' en respectant le cadre de lecture avec l'ADNc de la GFP, est inséré dans le plasmide pCDNA3. Ce vecteur nous a été fourni par l'équipe du Dr VINCENT (Oxford, Royaume-Uni).
- L'ADNc du gène MuSK humain (NM_001166280.1), obtenu de Source BioScience Life Sciences dans le vecteur Gateway pENTR221, a été cloné dans pCDNA3 en amont du tag HA (hémagglutinine), dans l'équipe du Pr SCHAEFFER.
- Pour l'expression de la GFP seule, nous avons utilisé le plasmide pRNAT (Genscript).

2) La transfection transitoire

L'introduction du matériel génétique exogène dans les cellules a été réalisée à l'aide d'une transfection transitoire par chlorure de calcium (technique décrite dans la littérature [2], [62]). En vue d'être transfectées, les cellules ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 15'000 cellules/puits dans du DMEM-10%SVF-P/S, et incubées 24H à 37°C-5%-CO₂ pour obtention le lendemain d'une confluence de 30-40%. Les différents plasmides ont été ajoutés à une concentration finale comprise entre 1 – 1,2µg/mL d'ADN par puits. Le mix final composé d'un mélange volume/volume de CaCl₂ et de 2XHeBS (impérativement ajouté goutte à goutte sous agitation afin de permettre la précipitation), et d'ADN, a été incubé 1H à température ambiante (RT) avant d'être déposé sur les cellules directement dans le milieu présent. Puis, les cellules ont été incubées 48H sous atmosphère à 37°C-5%-CO₂.

IV. Immunomarquage

1) Références des anticorps primaires

Tableau 3 : Table des différents anticorps primaires utilisés

Dénomination	Description	Fournisseur et Référence	Dilution d'utilisation
Anti-agrine	Ac polyclonal de lapin	Don du Dr KROGER (Munich, Allemagne)	1/2000 ^{ème}
Anti-LRP4	Ac polyclonal de lapin	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY référence : sc-98775	1/500 ^{ème}
Anti-desmine	Ac monoclonal de souris	AGILENT référence : M076029	1/200 ^{ème}
Anti-myosine	Ac monoclonal de souris	DSHB référence : A4.1025	1/1000 ^{ème}
Anti-HA	Ac polyclonal de lapin	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY référence : sc-805	1/500 ^{ème}

2) Référence des anticorps secondaires

Tableau 4 : Table des différents anticorps secondaires utilisés

Dénomination	Description	Fournisseur et Référence	Dilution d'utilisation
Anti-IgG humaine	Ac de chèvre anti-IgG humaines (H&L), couplé à la Rhodamine Red TM -X	Jackson Immuno-Research Laboratories référence : 109-295-003	1/750 ^{ème}
Anti-IgG de souris VERT	Ac de mouton anti-IgG de souris (H&L), conjuguée au FITC	ABCAM référence : ab6804	1/500 ^{ème}
Anti-IgG de souris ROUGE	Ac de chèvre anti-IgG de souris (fragment F(ab')), couplé au DyLight549	Jackson Immuno-Research Laboratories référence : 115-506-072	1/500 ^{ème}
Anti-IgG de lapin ROUGE	Ac d'âne anti-IgG de lapin (H&L), conjugué au TRITC	Jackson Immuno-Research Laboratories référence : 711-025-152	1/500 ^{ème}
Alphabungarotoxine	Conjuguée à l'Alexa Fluor TM 488	Life Technologie, référence : B13422	1/1000 ^{ème}

3) Méthode d'immuno-marquage avec perméabilisation des cellules

Environ 48H après transfection, les cellules ont été lavées trois fois dans du PBS. Elles ont ensuite été fixées dans une solution de PFA à 4% (SIGMA référence : F8775-25ML) durant 10 minutes et ont été une nouvelle fois lavées avec : i) du PBS, ii) une solution de PBS-Glycine 0,1M (SIGMA référence G7126-500G) et iii) une solution de PBS-Triton 0,25% (SIGMA référence T9284-100ML). Une étape de blocage des sites non spécifiques est réalisée grâce à une solution contenant de la BSA (utilisée à 1%, SIGMA référence : A9647-50G) diluée en PBS-T0,25%, durant 30mn à RT. Les cellules sont incubées en présence d'un anticorps primaire ou des sérums de patient dilués, sur la nuit à +4°C. Après trois lavages avec du PBS-T0,25%, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire sur la nuit à +4°C. Le lendemain, la coloration des noyaux est réalisée grâce au DAPI (SIGMA référence : D9542-10MG) dilué dans du PBS-T0,25% durant 5mn à RT. Enfin, les cellules ont été rincées trois fois, et maintenu en PBS jusqu'à utilisation.

4) Méthode d'immuno-marquage sans perméabilisation des cellules

La méthode est la même que celle avec perméabilisation décrite précédemment (paragraphe IV.2 page 47), à la différence que l'anticorps primaire ou les sérums de patients sont incubés sur les cellules avant leur fixation, environ 48H après transfection. La durée d'incubation varie entre 1 à 3 heures à RT selon la nature de l'anticorps primaire. Les cellules ont par la suite été traitées avec des solutions contenant 0,1% de triton.

5) Méthode d'immuno-marquage avec clarification des sérums et perméabilisation

La méthode est la même que celle décrite précédemment (paragraphe IV.2 page 47), à la différence que les sérums subissent un prétraitement de clarification pour éliminer les éléments non spécifiques contenus dans les sérums. Pour cela, les cellules HEK 293 ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 150'000 cellules/puits dans du DMEM-10%SVF-P/S, et incubées 24H pour obtention d'une confluence de 80-90%. À J+1, après fixation des cellules, les sérums dilués au 1/200^{ème} ont été déposés et incubés sur la nuit à +4°C. Ces sérums clarifiés ont ensuite été utilisés dans les conditions classiques du protocole.

6) Microscopie épifluorescente

Les cellules sont examinées sur un microscope à fluorescence inversé NIKON ECLIPSE (TE-2000-U) équipé d'une caméra couleur (SONY SSCC-M388CE). Les images sont acquises grâce au logiciel Leica NIS F 2.21, et traitées sur le logiciel ImageJ.

V. Validation de la méthode

Dans cette étude, le champ d'application de la validation correspond à un examen de type **qualitatif**. Cela signifie que le résultat est issu de données non numériques et apporte uniquement des informations sur la présence ou l'absence de l'analyte. La **portée est de type B**, ce qui indique que la méthode a été adaptée ou développée en interne par le laboratoire (et non une méthode commercialisée par un fournisseur).

1) L'analyse de risque

Cette analyse permet d'identifier les facteurs susceptibles d'influencer le résultat de la méthode. Elle s'effectue sur les phases pré-analytique / analytique / post-analytique.

Elle s'effectue grâce à deux outils : i) la méthode des 5M (également appelé « diagramme de causes à effets d'Ishikawa ») présenté dans la figure 14 et ii) la méthode de l'analyse des modes de défaillance, de leurs effets et de leur criticité (AMDEC). Cette approche permet d'identifier les facteurs critiques et d'indiquer les moyens de les maîtriser. Pour chaque risque identifié, il s'agit d'estimer :

- **sa fréquence** (1 = très peu fréquent ; 3 = peu fréquent ; 6 = fréquent ; 10 = très fréquent)
- **sa gravité** (1 = pas d'impact sur le résultat ; 3 = peu d'impact ; 6 = résultat impossible à donner ; 10= résultat erroné)
- **sa détectabilité** (1 = toujours détecté ; 3 = facilement détecté ; 6 = détection possible non infaillible ; 10= indétectable)

Le produit de ces trois indices donne la criticité d'un mode de défaillance. Ainsi, on remarque que le seuil d'acceptabilité de ce dernier est fixé par la structure qui réalise l'étude (dans notre cas il est fixé à ≤ 30). Plus le score est élevé, plus la maîtrise des risques devra être réalisée de manière approfondie. C'est notamment suite à cette analyse de risque (complétée par l'analyse bibliographique) que découlent les vérifications expérimentales.

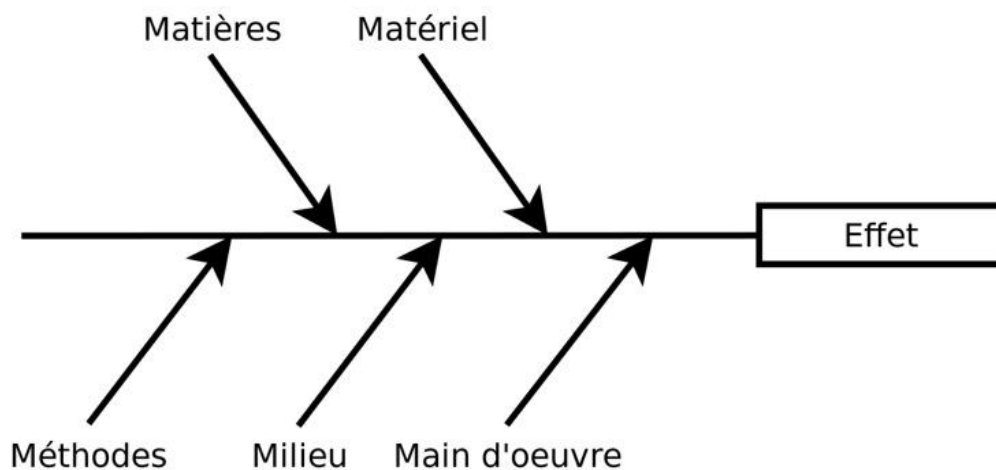


Figure 14 : Représentation schématique du diagramme de causes à effets d'Ishikawa (méthode des 5M)

2) Les vérifications bibliographiques

Lors de cette étude, nous avons pu, grâce aux données de la littérature, argumenter pour les exigences suivantes, sans avoir besoin de réaliser des vérifications expérimentales :

- La répétabilité
- La sensibilité et la spécificité analytique
- La limite de détection
- Les interférences
- La stabilité des réactifs

En ce qui concerne : i) la fidélité intermédiaire ii) l'incertitude et l'étendue de mesure et iii) les intervalles de référence, ces points n'ont pas été vérifiés expérimentalement car il s'agit d'une méthode qualitative (donc sans données numériques).

Pour la justesse et l'exactitude, aucun CIQ (contrôle interne de qualité) ou EEQ (évaluation externe de qualité) n'existe puisqu'il s'agit d'une méthode innovante et que pour l'heure seul le CBC va pratiquer ce test en France. De façon similaire, il n'est pas possible d'effectuer une comparaison de méthode.

3) Les vérifications expérimentales

a. ***Contamination inter-échantillon***

La contamination inter-échantillon est normalement vérifiée pour les systèmes automatisés, afin d'étudier l'effet d'un échantillon sur le suivant. Bien que cette technique soit entièrement manuelle, nous avons tout de même vérifié qu'un échantillon négatif placé à côté d'un échantillon positif ne se trouve pas faussement positif. Pour cela, le protocole a été appliqué tel qu'il est décrit en annexe 2. Ce paramètre a été vérifié avec deux sérums positifs pour les auto-anticorps anti-RACH de faible affinité et deux sérums négatifs. Ces sérums sont issus de la cohorte de publication du test [2], ils ont été disposés sur la plaque de manière à alterner les positifs et négatifs.

b. ***Variabilité inter-opérateur***

Les tests de variabilité inter-opérateur permettent de démontrer que les résultats de la méthode ne sont pas influencés par la personne qui réalise les expériences.

Cet item est très important étant donné que cette technique est entièrement manuelle. C'est suite ma formation initiale sur cette technique que nous avons réalisé cette vérification. En effet, une fois maîtrisée, nous avons réalisé la méthode en doublon avec mon tuteur scientifique le Dr SIMONET sur trois dosages distincts en passant différents sérums positifs et négatifs.

c. ***Robustesse***

La robustesse consiste à évaluer la capacité de la méthode à ne pas être influencée par des facteurs extérieurs. Cela permet de fournir une indication sur la fiabilité de celle-ci dans des conditions normales d'utilisation. Le choix des paramètres à tester découle de l'analyse de risque et la décision finale reste de la responsabilité du biologiste.

Dans notre cas, plusieurs paramètres jugés critiques ont été testés afin d'étudier l'impact de leur variabilité sur le résultat final, à savoir :

- La quantité de cellules plantées
- Le temps d'incubation des sérums
- La dilution des sérums
- Le temps de fixation des cellules au PFA
- Le temps et la température d'incubation de l'anticorps secondaire

Ils ont été vérifiés sur deux sérums connus comme étant positifs et eux sérums contrôles négatifs.

RÉSULTATS

I. Dosage des anticorps de faible affinité dirigés contre le récepteurs de l'acétylcholine: validation de méthode

1) Mise en place du test au Centre de Biotechnologie Cellulaire

J'ai commencé par reproduire au sein du CBC la technique telle qu'elle a été développée par le Dr SIMONET. Il s'agit de la méthode décrite dans la littérature par le Dr DEVIC [2] où quelques modifications ont été apportées :

- Les cellules sont cultivées sur une plaque plastique 24 puits et non sur lamelles de verre. Ce changement a permis d'une part d'augmenter le rendement (24 tests possibles par plaque contre un sur une lamelle) et d'autre part, de limiter les contraintes techniques liées à la fragilité du verre tout en augmentant l'adhérence des cellules.
- Pour chaque sérum, deux transfections sont réalisées. La première est réalisée avec les cinq plasmides codant respectivement pour les quatre sous-unités du RACH et pour une protéine de fusion rapsyne-GFP. La seconde est réalisée avec la rapsyne-GFP seule (en guise contrôle négatif), contrairement à ce qui était réalisé auparavant (à savoir une transfection avec les sous-unités du RACH sans la rapsyne. Ceci permettait d'observer la présence d'Ac anti-RACH « classiques » c'est à dire non sensibles à sa conformation. Néanmoins, cela ne procurait pas de vrai contrôle négatif, à savoir l'absence de fixation des anticorps sur les cellules exprimant la protéine de fusion-GFP).
- L'interprétation des résultats a également été simplifiée pour être adapté au cadre hospitalier. En effet, nous sommes passés de l'interprétation du résultat grâce l'élaboration d'un score à quatre échelons (technique utilisée dans la publication de la méthode) [2], à une interprétation qualitative où seule la présence ou l'absence des anticorps est notifiée. Un résultat est considéré comme positif lorsque l'observation au grossissement X20 montre un signal correspondant au marquage des IgG du sérum, et qu'au grossissement X40 on identifie au moins trois évènements de co-localisation sur au moins trois cellules différentes (Figure 15). Si l'on ne peut mettre en évidence qu'une ou deux co-localisation, le résultat est considéré comme douteux et l'échantillon doit être testé à nouveau. Ce résultat n'est évidemment validé qu'en absence de marquage des cellules non transfectées et en absence de co-localisation avec la GFP dans le puits où la rapsyne est transfectée seule (deux modes de contrôle négatif).

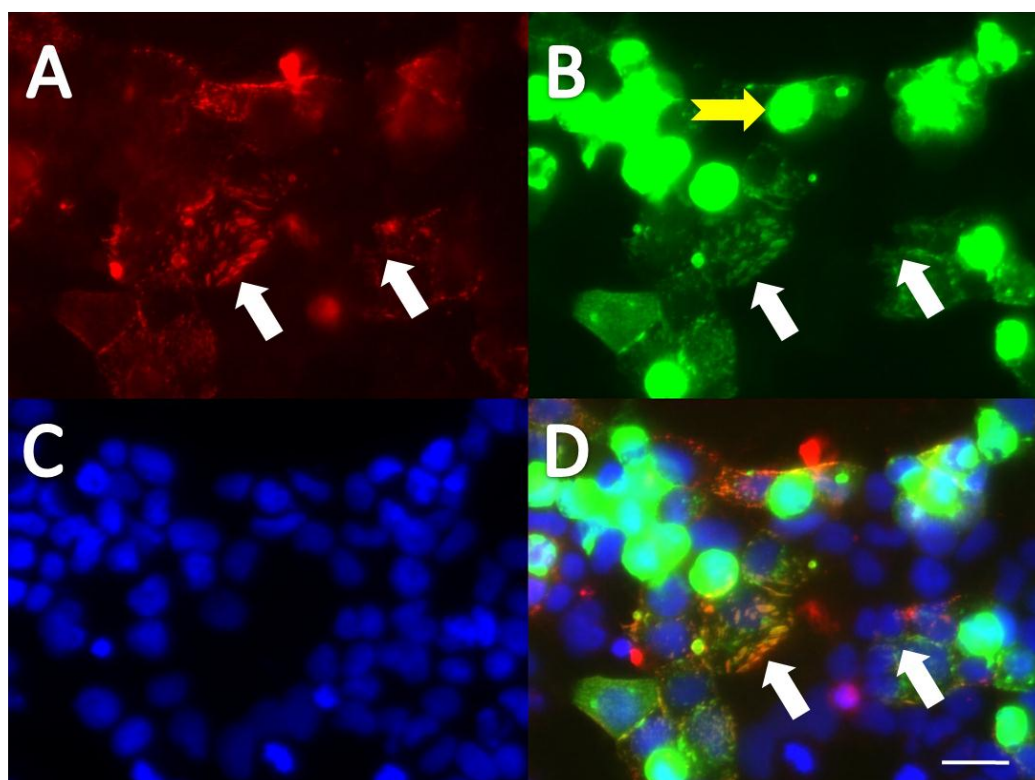


Figure 15: Immuno-détection par fluorescence sur cellules en culture d'auto anticorps anti-RACH de faible affinité d'un patient séronégatif atteint de myasthénie auto-immune. (A) En rouge : le signal correspondant au marquage des IgG du sérum. Les flèches soulignent la présence d'auto anticorps anti-RACH de faible affinité fixés au récepteur (B) En vert : le signal de la Green Fluorescent Protein (GFP) fusionnée à la rapsyne. La flèche jaune indique la présence de cellules transfectées ayant surexprimées la protéine ce qui a abouti à un stockage intracellulaire de cette dernière (C) En bleu : le marquage des noyaux au DAPI. (D) Superposition : montage permettant de visualiser la co-localisation entre le signal rouge et le signal vert. La barre d'échelle correspond à 50µm.

Afin d'évaluer précisément les moyens nécessaires à la mise en place de cette technique, je me suis appuyée sur la méthode des 5M décrite précédemment (Figure 14):

- **Matières :** Durant la phase de formation, l'ensemble des réactifs et consommables (milieux, plasmides et anticorps) nécessaires à la réalisation du test a été fourni par le laboratoire du Pr SCHAEFFER (INMG). Par la suite, j'ai listé tous les réactifs nécessaires afin qu'ils soient répertoriés dans le système de commande du service et disponibles en permanence.
- **Matériel :** De la même manière que les matières, les équipements indispensables à la réalisation du test ont été listés que ce soit en termes de petit matériel de laboratoire (pipettes, plaques, gants...), de gros équipements (hottes, incubateur, microscope à fluorescence inversé...), ou encore de logiciels (acquisition et traitement des photos). Le CBC réalisant déjà des immunomarquages, l'ensemble du matériel nécessaire était déjà disponible.

- **Main d'œuvre** : J'ai rapidement pu constater que ce test est long et fastidieux à mettre en œuvre ainsi qu'à interpréter, puisqu'il s'étend sur une semaine. Il a donc fallu prendre en compte cet élément temps/moyens humains et l'intégrer dans le planning des techniciens du laboratoire, sans oublier la période de formation qui s'étend sur plusieurs mois.
- **Méthodes** : Une fois la méthode adaptée au CBC, j'ai rédigé un protocole selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189 pour l'accréditation et selon les exigences de notre système qualité (Annexe 2). Ce dernier contient tous les éléments nécessaires à la bonne réalisation de la technique, et comporte une version détaillée et une seconde version simplifiée.
- **Milieu** : L'environnement dans lequel va être effectué le test, correspond aux exigences de celui-ci. En effet, le CBC est un service de culture cellulaire, et possède donc les locaux et équipements adéquats (pièces de culture à atmosphère contrôlée, suivi des températures, ...).

2) La sérothèque

En parallèle de la validation et de la mise en place du test au sein du CBC, j'ai contribué à constituer et alimenter la sérothèque d'échantillons provenant de patients dits SNMG grâce, notamment, à notre participation à des congrès, nous avons réussi à faire connaître notre test et à obtenir une visibilité nationale.

Le CBC étant le seul service hospitalier à proposer ce test en France, nous recevons régulièrement des sérums de patients SNMG de tout le territoire, dans le but de réaliser le dosage des anticorps anti-RACH de faible affinité. Afin de pouvoir gérer l'arrivée, le traitement et l'inclusion de ces sérums dans la sérothèque, et être capable de corréler les données cliniques des patients avec les résultats des tests sérologiques, j'ai créé des tableaux de données regroupant l'ensemble de ces informations.

Au moment de l'étude de DEVIC *et al.* en 2014, la collection de sérums de patients SNMG contenait 16 échantillons [2]. Grâce au transfert de la technique au CBC et de la réception des sérums de toute la France, au 31 août 2018 la sérothèque comptait les sérums de 475 patients présentant un tableau clinique en faveur d'une myasthénie, et négatifs pour les dosages des anticorps anti-RACH et anti-MuSK en RIA.

Une fois la technique et la gestion des prélèvements maîtrisées, j'ai pu démarrer la validation de la méthode.

3) La validation de méthode

La validation de la méthode consiste à évaluer les performances de la technique mise en œuvre et à vérifier sa conformité aux limites d'acceptabilité préalablement fixées. Toutes les données et résultats issus de cette validation ont été consignés conformément à la norme NF EN ISO 15189 dans le formulaire SH-FORM-43. Ce dossier sera présenté au COFRAC lors de la demande d'accréditation de la méthode.

a. Description de la méthode

La validation de la méthode (portée B) repose sur l'étude d'un analyte, constituant d'un échantillon, possédant une propriété mesurable. Dans notre cas, l'analyte s'avère être les auto-anticorps anti-RACH de faible affinité contenus dans le sérum des patients. Le sérum est obtenu à partir d'un échantillon primaire sanguin. Cela nécessite donc un pré-traitement du sang pour produire le sérum. Le principe de cette méthode qualitative, repose sur la détection des anticorps contenus dans le sérum par immunomarquage sur cellules en culture. L'interprétation des résultats repose sur la présence ou l'absence des anticorps, ce qui permet de dire si le patient est positif ou négatif pour la présence d'auto-anticorps dirigés contre le RACH.

b. Analyse de risque

L'analyse de risque, conformément aux exigences de la norme NF EN ISO 15189, a été réalisée sur les trois types de processus à savoir : i) le pré-analytique, ii) l'analytique et iii) le post-analytique.

NB : L'intégralité de cette analyse a été renseignée dans un tableau lui-même renseigné dans le dossier d'analyse de risque (Annexe 3), seuls les critères dont l'indice de criticité est supérieur ou égal à 30 sont présentés dans cette partie.

La phase pré-analytique

La phase pré-analytique comprend toutes les étapes depuis la prescription par le clinicien jusqu'à l'obtention de l'échantillon prêt à être analysé. Les étapes de cette phase ont été analysées afin d'en évaluer les points critiques. La gravité, la fréquence et la détectabilité de chacun de ces points ont été évaluées, le produit des trois donnant sa criticité. Une solution de maîtrise a dû être apportée pour chaque risque identifié. Au total, 19 points ont été analysés et sont répertoriés en annexe (Annexe 3). Seuls les sept points dont l'indice de criticité est supérieur ou égale à 30 sont décrits dans le tableau 5.

Plus l'indice de criticité est élevé, plus les modalités de maîtrise des risques doivent être précises et réalisées rapidement. Néanmoins, le laboratoire n'intervient pas directement au niveau des étapes pré-analytiques. C'est pourquoi, afin de maîtriser les risques liés au transport par exemple, les consignes devront être données aux personnes concernées.

La phase analytique

La phase analytique comprend les étapes allant de l'échantillon prêt à être analysé jusqu'au résultat d'analyse prêt à être interprété et validé. Dans notre projet, cela revient à la réalisation de la méthode. Un total de 18 points a été analysé et répertorié en annexe (Annexe 3). Les trois points dont l'indice de criticité est élevé sont représentés dans le tableau 6. Les risques les plus importants concernent l'échantillon, le stockage des réactifs et le suivi des performances de la méthode. Il faut donc mettre en place des modalités de maîtrise fiables. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser les vérifications expérimentales suivantes : variabilité inter-opérateur, contamination inter-échantillon et robustesse.

D'après le tableau 6, on remarque que les risques concernent majoritairement la réalisation du test, par conséquent, cela implique les compétences du personnel. La modalité de maîtrise de ces risques rentre donc dans le cadre de la formation et de la gestion du maintien de compétences du personnel du laboratoire et, contrairement à la phase pré-analytique, nous pouvons intervenir pour la maîtrise des risques de cette étape.

La phase post-analytique

Enfin, la phase post-analytique comprend les étapes d'interprétation, de validation et de rendu des résultats (Tableau 7). L'ensemble des 15 points critiques sont consignés dans l'annexe 3, et les six points à indice critique supérieur ou égal à 30 sont présentés dans le tableau 7. De même que pour l'étape pré-analytique, les risques ont des modalités de maîtrise facilement applicables.

Les risques les plus importants constatés pour cette phase concernent principalement l'interprétation des résultats et l'élimination des déchets. Une des perspectives sera donc d'être vigilant sur la formation et l'habilitation du personnel concerné par ces items.

Tableau 5 : Analyse de risque : indices critiques élevés de la phase pré-analytique et leur modalité de maîtrise

ETAPES Pré-analytiques	5M	Points critiques	Gravité	Fréquence	Détection	Indice de criticité	Modalité de maîtrise du/des risque(s)
Prélèvement	Méthode	Procédure	3	3	3	54	Catalogue des analyses (Biobook), manuel de prélèvement, formation et information des préleveurs
Transport des prélèvements	Main d'œuvre	Transport des prélèvements (délai, température...)	6	3	3	54	Contrat avec un transporteur habilité au transport "d'échantillons biologiques" et assurant la traçabilité de la livraison et de la température + Gestion des non-conformités (RTE : MU-SMQ-PG-001-04 CBC : M3-P1-I2)
	Milieu	Conditions de transport	3	3	10	90	Procédure "Conditions de transport des prélèvements pour analyse sérologique" + Contrat avec le transporteur + Gestion des non-conformités (RTE : MU-SMQ-PG-001-04 CBC : M3-P1-I2) (Délai et température de transport)
	Méthode	Conditions de transport	3	3	6	54	Contrat avec le transporteur + Fiche de suivi des prélèvements + Bon de transport
Réception et enregistrement des prélèvements	Main d'œuvre	Réception et enregistrement	6	6	1	36	Formation et habilitation du personnel RTE : MU-RH-DE-052-01 CBC secrétariat (instruction d'enregistrement des prélèvements) : R1-P2-I1 + Maintien des habilitations
	Matière	Intégrité et état du prélèvement	6	1	6	36	Formation et habilitation du personnel RTE : MU-RH-DE-052-01 CBC secrétariat (instruction d'enregistrement des prélèvements) : R1-P2-I1 + Maintien des habilitations
	Milieu	Température conservation	3	3	6	54	Suivi des enceintes et des températures de stockage

Tableau 6 : Analyse de risque : indices critiques élevés de la phase analytique et leur modalité de maîtrise

ETAPE Analytique	5M	Points critiques	Gravité	Fréquence	Détection	Indice de criticité	Modalité de maîtrise du/des risque(s)
Réalisation du test	Main d'œuvre	Réalisation d'une méthode d'immunomarquage sur cellules en culture, lecture de résultats, validation technique	10	3	1	30	Habilitations des techniciens pour cette technique Fiche de suivi des habilitations et formations : S1-P1-ST3 Tableau des habilitations et matrice de compétences : S1-P1-ST2 + Utilisation d'au moins un sérum de patient positif à chaque passage comme contrôle positif
	Méthode	Suivi des performances de la méthode	6	3	3	54	Utilisation d'au moins un sérum de patient positif à chaque passage comme contrôle positif (Pas de contrôles qualité interne (CQI)).
		Validation technique et saisi des résultats	10	3	1	30	Définition des critères de validation technique et des procédures

Tableau 7 : Analyse de risque : indices critiques élevés de la phase post-analytique et leur modalité de maîtrise

ETAPES Post-analytiques	5M	Points critiques	Gravité	Fréquence	Détection	Indice de criticité	Modalité de maîtrise du/des risque(s)
Validation	Main d'œuvre	Validation des résultats	10	1	3	30	Procédure de validation biologique des résultats MU-PostA-PG-002-02 et MU-PostA-PG-001-03, formation continue, double lecture en aveugle des résultats
	Matière	Feuille de résultats	10	1	3	30	Procédure de validation biologique des résultats MU-PostA-PG-002-02 et MU-PostA-PG-001-03, formation continue, double lecture en aveugle des résultats
	Méthode	Logiciels de validation et de saisie des résultats (GLIMS)	6	3	3	54	Double lecture des résultats + Procédure et habilitation à la maîtrise des logiciels + Compte rendu résultats
Élimination des déchets	Main d'œuvre	Personnel compétent	10	1	6	60	Formation à la gestion et à l'élimination des déchets de type DASRI : déchet d'activité de soins à risque infectieux (fûts, sacs, et poubelles spéciaux), chimiques (hotte chimique + bidons spéciaux), et courants
	Matière	Déchets DASRI, chimiques et courants	6	3	3	54	Procédure et habilitation à la gestion des déchets : S4-P1-I2
	Méthode	Procédures	3	3	6	54	

c. Résultats bibliographiques

L'analyse de risque nous a amené à réaliser un certain nombre de vérifications en accord avec les spécifications de la norme NF EN ISO 15189 et afin de renseigner le dossier de validation, nous avons travaillé sur l'argumentation des items bibliographiques suivants.

i. La répétabilité

S'agissant d'une technique qualitative, les calculs de répétabilité ne sont pas applicables (car aucune donnée numérique n'est issue de cette analyse). Néanmoins, de nombreuses images ont été analysées : au minimum 100 cellules comptées par champs et trois champs par puits. La méthode est considérée comme répétable dans la mesure où deux sérums positifs ont été utilisés pour les vérifications expérimentales liées à la validation de méthode et ces derniers se sont avérés positifs de la même manière à chaque fois. De plus, deux autres sérums sont utilisés à titre de contrôle positif à chaque passage pour les tests en routine, et ont été trouvés positifs à chaque essai.

ii. Sensibilité et spécificité analytique

La sensibilité est définie comme étant la probabilité qu'un test donne un résultat positif en présence de la caractéristique cible, en d'autres termes elle quantifie le risque d'obtenir des faux négatifs. La spécificité analytique, quant à elle, démontre la capacité du test à fournir un résultat négatif en l'absence de la caractéristique cible, autrement dit d'avoir le moins de faux positifs. Ces paramètres se mesurent par comparaison des résultats des tests avec une méthode de référence. Dans notre cas, en l'absence de méthode de référence permettant de détecter des anticorps anti-RACH de faible affinité et de contrôles qualité, ce point ne peut être évalué.

iii. Limite de détection

Ce paramètre n'a pas été vérifié expérimentalement. En effet, il s'agit d'une analyse qualitative pour laquelle on ne dose pas la quantité de l'analyte, et où l'on indique seulement sa présence ou son absence. De plus, on ne dispose pas, là encore, de technique de référence permettant de réaliser une mesure indépendante de la quantité de ces auto-anticorps. Enfin, cette limite déterminée pour un anticorps précis ne serait pas valable pour un autre, chacun pouvant avoir des épitopes différents parmi les sites disponibles sur les RACH et pouvant avoir des affinités différentes pour un même épitope.

iv. Interférences

Lorsqu'on utilise des sérums, les interférences liées à l'hémolyse, la turbidité et la bilirubine interviennent principalement dans les mécanismes optiques et les mécanismes chimiques des dosages. Dans notre cas, il s'agit d'une méthode qualitative de détection des auto-anticorps sur cellules en culture, par une réaction antigène-anticorps, révélée par immunofluorescence. De plus, l'analyse est effectuée sur un sérum dilué au 1/20^{ème}.

Les éventuelles interférences liées aux paramètres cités ci-dessus n'impactent donc pas la détection de l'analyte recherché. Néanmoins, l'aspect du sérum pouvant intervenir sur la qualité de la fluorescence, les sérums hémolytiques, ictériques et à turbidité élevée sont répertoriés. La mise en place des non conformités liés à ces interférences est en cours, et à terme des tests de surcharge devront être effectués.

v. Stabilité des réactifs

S'agissant d'une technique manuelle, la stabilité des réactifs revient à respecter les spécifications des fournisseurs (température de conservation, conditions d'utilisation et dates limites d'utilisation) en ce qui concerne les anticorps et les milieux de culture. Les numéros de lots sont suivis et contrôlés. Concernant les tampons utilisés pour cette technique, ils sont réalisés extemporanément pour chaque analyse.

d. **Résultats expérimentaux**

Toujours selon les spécifications de la norme NF EN ISO 15189 et afin de renseigner le dossier de validation, nous avons travaillé sur l'interprétation des vérifications expérimentales suivantes.

i. Contamination inter-échantillon

D'après les résultats issus du test réalisé avec deux sérums positifs témoins (SERUM ZA3-40 & ZA3-09) et deux sérums négatifs (SER NEG-1 & SER NEG-2), nous pouvons dire que la méthode est conforme aux exigences. En effet, aucune contamination inter échantillon n'a été observée. Les échantillons négatifs sont trouvés négatifs malgré la présence de contrôles positifs dans les puits voisins.

ii. Variabilité inter-opérateurs

D'après les résultats issus des trois tests distincts réalisés en doublon avec deux sérums connus comme étant positifs et deux sérums négatifs, nous pouvons dire que la méthode est conforme aux exigences du laboratoire. En effet, le seuil maximum de discordance était fixé à 5%. Aucune variation inter-opérateur n'a été détectée puisque les résultats des dosages sont identiques pour les deux opérateurs soit 0% de discordance : les six sérums positifs sont retrouvés positifs pour chaque opérateur, il en va de même pour les négatifs.

iii. Robustesse

Tous les tests mis en œuvre afin d'évaluer la robustesse de la technique ont également été réalisés avec deux sérums positifs témoins (SERUM ZA3-40 & ZA3-09) et deux sérums négatifs (SER NEG-1 & SER NEG-2). Les vérifications expérimentales pour évaluer la robustesse découlent de l'identification des paramètres critiques de la méthode. Ces paramètres sont : la fixation des cellules au PFA, le temps d'incubation des sérums et de l'anticorps secondaire, la quantité de cellulesensemencées et la dilution des sérums.

Premièrement, différents temps de fixation des cellules ont été testés (Tableau 8).

Tableau 8 : Variation du temps de fixation des cellules au paraformaldéhyde (PFA)

Temps de fixation au PFA	Sérums positifs		Sérums négatifs	
	SER ZA3-40	SER ZA3-09	SER NEG-1	SER NEG-2
5minutes	+	+	-	-
10minutes	+	+	-	-
15minutes	+	+	-	-

Nous constatons que quel que soit le temps de fixation des cellules au PFA (5,10 et 15 minutes), les sérums positifs (ZA3-40 et ZA3-09) sont trouvés positifs et les témoins négatifs (SER NEG-1 et SER NEG-2) sont trouvés négatifs. On peut donc conclure que dans la limite des durées évaluées, le temps de fixation n'impacte pas le résultat final.

Nous avons ensuite, fait varier le temps d'incubation des sérums (Tableau 9).

Tableau 9 : Variation du temps d'incubation des sérums

Temps d'incubation des sérums	Sérums positifs		Sérums négatifs	
	SER ZA3-40	SER ZA3-09	SER NEG-1	SER NEG-2
30minutes	+	+	-	-
1 heure	+	+	-	-
2 heures	+	+	-	-

Les essais concernant le temps d'incubation de l'anticorps primaire ont permis de confirmer la détection des sérums positifs (ZA3-40 et ZA3-09) bien que celui soit diminué ou augmenté (30 minutes, 1 heure ou 2 heures). De la même manière, les témoins négatifs (SER NEG-1 et SER NEG-2) sont trouvés négatifs. Notons que l'augmentation du temps d'incubation de l'anticorps primaire n'altère pas la qualité du marquage (*résultat non montré*).

De la même façon, nous avons ensuite fait varier le temps d'incubation de l'anticorps secondaire (Tableau 10).

Tableau 10 : Variation du temps d'incubation de l'anticorps secondaire à +4°C

Temps d'incubation de l'anticorps secondaire	Sérums positifs		Sérums négatifs	
	SER ZA3-40	SER ZA3-09	SER NEG-1	SER NEG-2
15 heures	+	+	-	-
20 heures	+	+	-	-

Aucun impact sur le résultat n'est constaté quel que soit le temps d'incubation de l'anticorps secondaire, dans la mesure où les témoins positifs (ZA3-40 et ZA3-09) sont bien retrouvés positifs et que l'intensité de fluorescence reste la même. Néanmoins, lorsque l'anticorps secondaire est incubé 20H à +4°C, l'apparition d'agrégats fluorescents est observée. Cela peut être gênant pour la lecture du test. L'anticorps secondaire ne doit donc pas rester en contact sur les cellules plus de 15 heures.

Puis, nous avons testé différentes quantités cellulaires afin de déterminer si cela avait un impact sur le résultat (Tableau 11).

Tableau 11 : Variation de la quantité cellulaire lors de la mise en plaque

Quantité de cellules ensemencées	Cellules / cm2	Sérums positifs		Sérums négatifs	
		SER ZA3-40	SER ZA3-09	SER NEG-1	SER NEG-2
10'000 cellules / puits	environ 5100	+	+	-	-
15'000 cellules / puits	environ 7700	+	+	-	-
20'000 cellules / puits	environ 10'300	+	+	-	-

Quelle que soit la quantité cellulaire testée (10'000, 15'000 et 20'000 cellules par puits), les sérums positifs sont trouvés positifs et les témoins négatifs sont trouvés négatifs. Ainsi, la densité cellulaire sur les plaques n'influence pas le résultat final.

Néanmoins, lorsque la quantité de cellule est trop importante, l'interprétation du résultat est moins confortable du fait de la densité du tapis cellulaire. De plus, le rendement de transfection est moins bon et les cellules expriment moins bien le récepteur. C'est pourquoi la densité à 15'000 cellules / puits a été retenue, et qu'il est important que ce paramètre varie peu.

Enfin, nous avons testé différentes dilutions du sérum dans le tampon PBS-Triton-BSA (Tableau 12).

Tableau 12 : Variation de la dilution de deux sérums positifs et deux sérums négatifs

Dilution des sérums	Sérums positifs		Sérums négatifs	
	SER ZA3-40	SER ZA3-09	SER NEG-1	SER NEG-2
Pure	+	+	-	-
1/20 ^{ème}	+	+	-	-
1/100 ^{ème}	+	+	-	-
1/200 ^{ème}	+	+	-	-

Les tests de dilution des sérums ont permis de déterminer la dilution optimale en termes d'analyse d'image. Une diminution de l'intensité du signal de fluorescence a été notée avec la dilution au 1/100^{ème} et 1/200^{ème}. L'utilisation du sérum non dilué ne s'est pas avérée plus avantageuse que la dilution au 1/20^{ème} qui a été retenue.

Une fois l'analyse de risques, les vérifications bibliographiques et les vérifications expérimentales terminées, les résultats ont été renseignés, selon les exigences de la norme NF EN ISO 15189, dans le dossier de validation SH-FORM-43 (Annexe 3).

La réalisation de cette validation de méthode nous a permis de prouver sa fiabilité et sa reproductibilité. La déclaration d'aptitude de cette technique a ainsi pu être établie le 05 septembre 2016 par le Dr SIMONET (désigné comme biologiste responsable).

4) Les premiers tests en routine

Depuis la mise en place de la technique au sein du laboratoire, deux des techniciens du CBC sur les six de l'équipe ont été formés.

Cette période de formation a été relativement longue (environ cinq semaines). En effet, après avoir observé deux tests, les techniciens doivent en réaliser trois afin de valider leur formation. Rappelons que la réalisation du test s'étend sur une semaine et que la lecture des résultats, qui prend plusieurs heures, est réalisée en doublons et à l'aveugle avec le biologiste responsable.

Actuellement, nous avons testé 453 sérums de patients SNMG pour lesquels une myasthénie était suspectée. Au total, 40 se sont avérés être positifs pour la présence d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité, soit 8,8%. Nous avons analysé ces résultats dans le but d'apprécier si cette cohorte de patients possédant ce type d'anticorps est significativement différente d'un point de vue clinique des patients myasthéniques possédant d'autres anticorps (anti-RACH « classiques » et anti-MuSK), et également différente des cohortes de patients positifs aux anticorps anti-RACH de faible affinité étudiées par d'autres équipes. Cela pourrait permettre à long terme d'établir des critères de pronostic.

Dans la population étudiée par l'équipe d'A.VINCENT 10 à 60% des patients testés sont positifs à ce type d'anticorps [47], [49], dans la population étudiée par l'équipe de P.DEVIC 16% des patients testés sont positifs [2]. Cette différence de résultats peut potentiellement provenir des critères de recrutement des patients. Nous avons donc classé les résultats de dosages en fonction des centres prescripteurs (Tableau 13). Afin que cette analyse soit exploitable, les centres pour lesquels moins de cinq sérums ont été reçus n'ont pas été inclus dans l'analyse et ont été rassemblés dans la ligne « autre » du tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité par centre prescripteur

	Nombre de sérums reçus et testés	Nombre de sérums trouvés positifs aux anti-RACH	Pourcentage de sérums trouvés positifs aux anti-RACH
ANGERS	29	0	0%
BESANCON	7	1	14%
BREST	8	0	0%
LORIENT	11	1	9%
LYON	30	6	20%
MARSEILLE	11	1	9%
NANTES	20	4	20%
NICE	9	1	11%
PARIS	251	16	6%
RENNES	5	0	0%
SAINT ETIENNE	8	0	0%
STRASBOURG	43	6	14%
AUTRES	21	4	19%
Total	453	40	

L'analyse des résultats de dosage par centre prescripteur nous permet de noter que les centres nous envoyant de nombreux sérums (par exemple Angers ou Paris) ne sont pas forcément ceux ayant le pourcentage de patients positifs le plus élevé (comme Lyon ou Nantes), probablement en raison de critères diagnostic plus ou moins stringent. En effet, il ne s'agit pas ici d'une étude clinique avec des conditions d'inclusion strictes, mais seulement d'une analyse rétrospective de l'ensemble des sérums reçus. Ceci explique peut être aussi le faible pourcentage de sérums positifs dans notre étude, 8,8%, contre 50% dans la publication originale d'A.VINCENT [1].

Par la suite, nous avons classé les résultats de dosage en fonction du sexe et de l'âge des patients (Tableau 14), ainsi qu'en fonction de leurs caractéristiques cliniques (Tableau 15). Ces données épidémiologiques et cliniques ont été difficiles à rassembler et nous ne les possédons que pour la moitié de la sérothèque (223 fiches retournées avec le prélèvement sur les 453 sérums, sachant qu'une grande partie des fiches n'est pas renseignée entièrement).

Tableau 14 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité selon l'âge et le sexe des patients

		Nombre de sérums reçus et testés	Nombre de sérums trouvés positifs aux anti-RACH	Pourcentage de sérums trouvés positifs aux anti-RACH
SEXE	HOMME	112	20	18%
	FEMME	219	10	5%
ÂGE	<40ANS	106	15	14%
	>40ANS	267	20	7%

Tableau 15 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité selon les items cliniques des patients

		Nombre de sérums reçus et testés	Nombre de sérums trouvés positifs aux anti-RACH	Pourcentage de sérums trouvés positifs aux anti-RACH
Type de myasthénie	Oculaire pure	59	6	10,2%
	Généralisée	121	12	9,9%
Traitement aux anticholinestérasiques	Réponse favorable	125	16	12,8%
	Pas de réponse	35	3	8,6%
Traitement aux immunosuppresseurs	Réponse favorable	61	9	14,8%
	Pas de réponse	31	2	6,5%

Concernant l'âge des patients, on note une part un peu plus importante de patients positifs de plus de 40 ans (20 patients positifs contre 15 chez les moins de quarante ans) ce qui n'est pas décrit dans l'article de l'équipe du Dr LEITE puisqu'ils se sont concentrés sur les myasthénies d'apparition précoce [63]. En terme de présentation clinique, le ratio de patients positifs aux RACH de faible affinité atteints de myasthénie oculaire pure est sensiblement égal à celui des patients positifs atteints de myasthénie généralisée ce qui était déjà mentionné dans la littérature [63]. Il en est de même concernant les réponses aux différents traitements. Le fait sans doute le plus étonnant est la plus grande proportion d'hommes atteints, deux fois plus, ou quatre fois plus si l'on rapporte le résultat au nombre de sérums testés. Ceci contraste avec les données épidémiologiques concernant la myasthénie séropositive (anticorps anti-RACH « classiques »), qui touche les femmes quatre fois plus souvent.

On peut supposer que si les femmes sont plus souvent touchées, elles le sont aussi de façon plus sévère, et présentent donc plus souvent des anticorps détectable en RIA. Inversement, si les hommes sont plus souvent atteints de formes atténuées, ceci se reflète dans la nature de leurs anticorps qui sont donc plus souvent de faible affinité. Ces résultats d'analyse de données ne permettent pas pour l'heure d'établir un profil type de patient, néanmoins, quelques éléments sont notables.

Le dosage des anticorps anti-RACH ainsi effectué en routine suite à la validation de la méthode, nous avons concentré nos recherches sur le développement d'autres méthodes.

II. Dosage d'anticorps dirigés contre d'autres cibles antigéniques de la Jonction en Cell Based Assay

Au total 91,2% des patients SNMG restent négatifs après le test de détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité. Il est donc important de pouvoir apporter une réponse à ces patients. Pour cela, nous avons utilisé une méthode similaire d'immuno-détection des auto-anticorps sur cellules transfectées avec d'autres cibles antigéniques potentielles, pour tenter de mettre en évidence d'autres auto-anticorps (Figure 18). Le choix des autres cibles antigéniques de la JNM à tester a reposé sur l'étude des données bibliographiques, et s'est porté dans un premier temps sur les protéines de l'axe Agrine-LRP4-MuSK. En effet, l'implication de MuSK dans la MG est bien connue, et l'existence d'anticorps anti-agrine et anti-LRP4 a également été décrite.

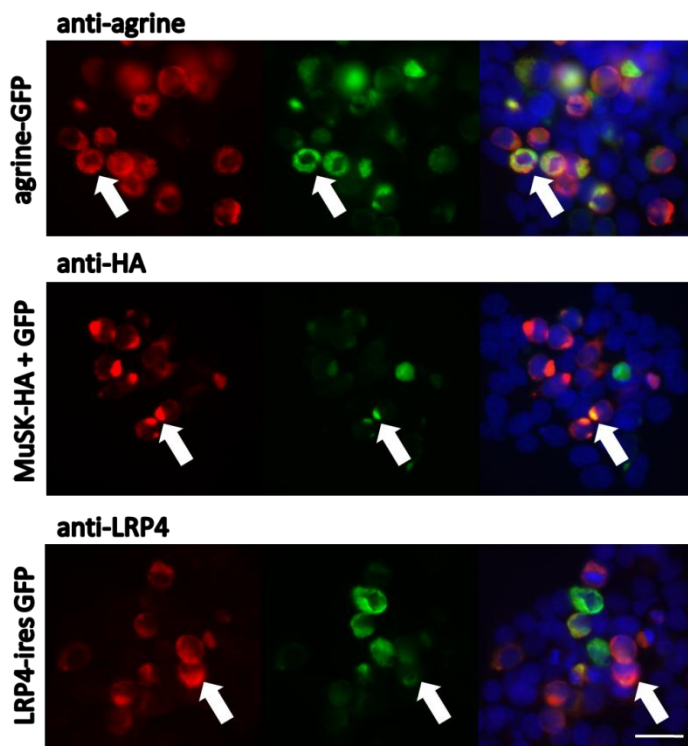


Figure 16 : Vérification de l'expression des plasmides agrine ; MuSK ; LRP4. En rouge : le signal des anti-agrine ou anti-MuSK ou anti-LRP4 ; En vert : Le signal de transfection des cellules avec agrine-GFP ou MuSK-HA+GFP ou LRP4-iresGFP ; En bleu : le marquage des noyaux au DAPI ; La superposition montre la co-localisation entre le signal rouge et le signal vert. Les flèches indiquent la présence des anticorps sur les différentes cibles marquées à la Green Fluorescent Protein (GFP). La barre d'échelle correspond à 50µm.

Nous avons, dans un premier temps, utilisé la même technique que pour la détection des anti-RACH de faible affinité : méthode CBA sans perméabilisation des cellules, technique qui minimise le bruit de fond et les réactions croisées. Nous avons transfecté les cellules avec un mélange équimolaire de plasmides afin qu'elles co-expriment agrine-GFP, MuSK-HA et LRP4-iresGFP.

L'objectif était de retenir l'agrine à la surface des cellules en la co-exprimant avec ses récepteurs membranaires LRP4 et MuSK. Aucun des 12 patients SNMG testés n'a été trouvé positif.

Afin d'augmenter la sensibilité du test, nous avons décidé de perméabiliser les cellules, ce qui permet d'augmenter la quantité d'antigènes accessibles aux anticorps. Cette modification du protocole a entraîné plusieurs problèmes.

Tout d'abord, le bruit de fond très important engendré par la perméabilisation limitait fortement la lecture du test. Pour pallier à ce phénomène, nous avons dilué les sérums dans une solution de PBS-Triton-BSA. Différentes dilutions ont été testées : 1/200^{ème}, 1/1000^{ème} et 1/2000^{ème}. Cette étape nous a permis de diminuer le signal mais n'a pas permis de révéler de sérum positif. Ce bruit de fond étant causé par des anticorps non spécifiques, nous avons décidé par la suite de réaliser une étape de clarification des sérums, par pré-incubation des sérums dilués au 1/200^{ème} sur des cellules HEK perméabilisées mais non transfectées. Cette étape a permis de réduire le bruit de fond de manière significative, les anticorps non spécifiques se liant aux cellules non transfectées et étant donc absents pour la suite du protocole (Figure 19). Nous avons ainsi pu mettre en évidence un sérum positif pour la présence d'anticorps anti-agrine, mais pas anti-LRP4.

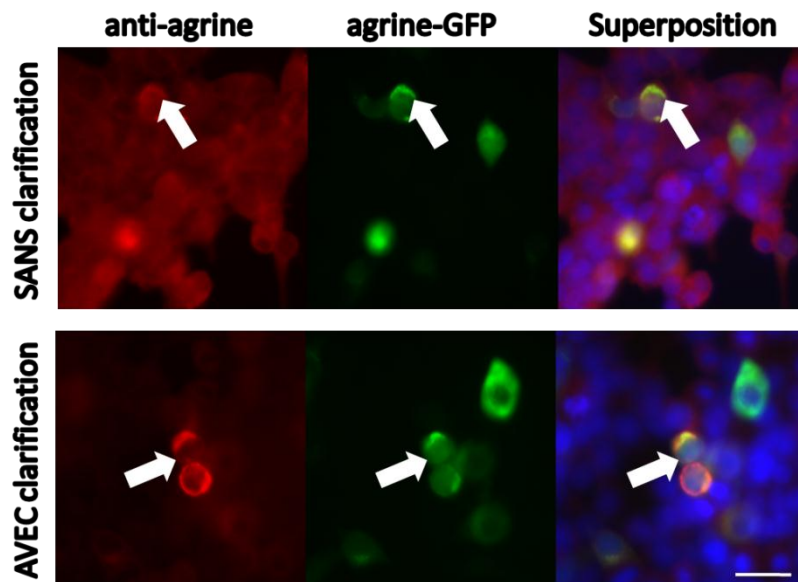


Figure 17 : Comparaison de la qualité de l'immunomarquage avec et sans clarification des sérums. En rouge : le signal correspondant au marquage des anti-agrine. En vert : le signal des cellules transfectées avec agrine-GFP. En bleu : le marquage des noyaux au DAPI. La superposition montre la co-localisation entre le signal rouge et le signal vert. Les flèches indiquent la présence des anticorps sur les différentes cibles marquées à la GFP. La barre d'échelle correspond à 50µm.

Néanmoins, il persistait sur les images des agrégats fluorescents qui limitaient également la lecture de la fluorescence. Après avoir fait varier plusieurs paramètres à savoir : i) la clarification des sérums, ii) le temps d'incubation de l'anticorps secondaire, iii) la présence/absence de BSA à différents stades de la technique et iv) la présence/absence de sérum humain, nous avons pu identifier l'étape de la méthode responsable de la présence de ces agrégats (Figure 20).

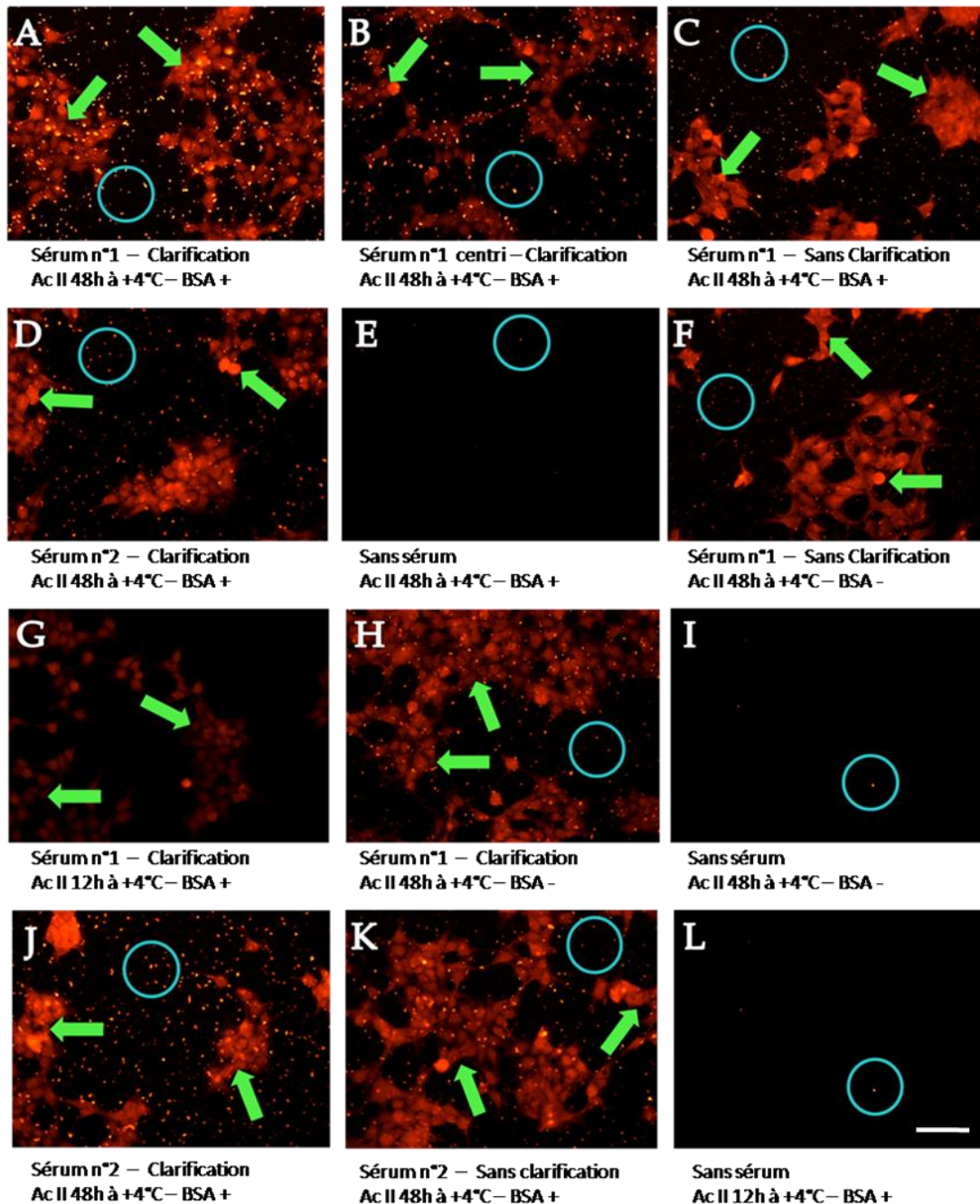


Figure 18 : Comparaison de la qualité de l'immunomarquage dans les différentes conditions de réalisation de la technique. En rouge : le signal correspondant à l'anticorps secondaire. Les flèches vertes indiquent la présence de bruit de fond sur les cellules. Les cercles bleus indiquent la présence d'agrégats fluorescents. Les différentes conditions de réalisation de la technique (de A à L) sont détaillées en dessous de chaque image. La barre d'échelle correspond à 100µm.

La condition A est la condition de base de la technique à savoir la présence de sérum clarifié, de BSA et d'Anticorps secondaire incubé 48H à +4°C. D'un point de vue qualitatif, les agrégats sont retrouvés en nombre moins importants lorsque le temps d'incubation de l'anticorps secondaire est plus court à savoir 12H à +4°C (condition G) plutôt que 48H à +4°C (Figure 19). En effet, la méthode se déroulant sur plus d'une semaine et pour une question d'organisation, l'Anticorps secondaire était déposé le vendredi à 17H et était laissé à +4°C jusqu'au lundi matin. Les plaques ont donc été mises en attente sur le week-end en PBS et l'Ac secondaire a été déposé le lundi à 17H et incubé sur la nuit à +4°C. Le problème de lecture lié à la présence d'agrégats a donc été résolu. Néanmoins, un délai d'attente supplémentaire est ajouté sur une technique déjà longue.

Les problèmes de bruit de fond ainsi résolus, nous avons testés à nouveau les 12 sérums de patients SNMG utilisés précédemment, sur des cellules perméabilisées et transfectées avec le mix agrine/MuSK/LRP4. De façon équivalente aux études précédentes, aucun sérum n'a été trouvé positif pour LRP4.

Nous avons donc décidé de ne transfecter qu'un plasmide à la fois, pour tenter d'augmenter la quantité de protéine produite par les cellules. En effet, nous avons émis l'hypothèse qu'en transfectant un seul vecteur d'expression, la production de protéine serait plus importante qu'avec une co-transfection. Ceci nous a permis d'identifier des sérums positifs pour l'agrine, MuSK et LRP4. Le critère de co-localisation des anti-IgG et du signal GFP ne comptait que pour la transfection avec agrine-GFP puisque, dans le cas de LRP4 la séquence IRES générerait deux protéines séparées et dans le cas de MuSK, il s'agissait de deux plasmides différents (Figure 21 et Tableau 16).

Tableau 16 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-agrine/MuSK/LRP4 sur des sérums de patients SNMG

Sérums testés	Nombre de cas positifs pour les différentes cibles testées		
	AGRINE	MUSK	LRP4
SNMG n = 12	2	1	1

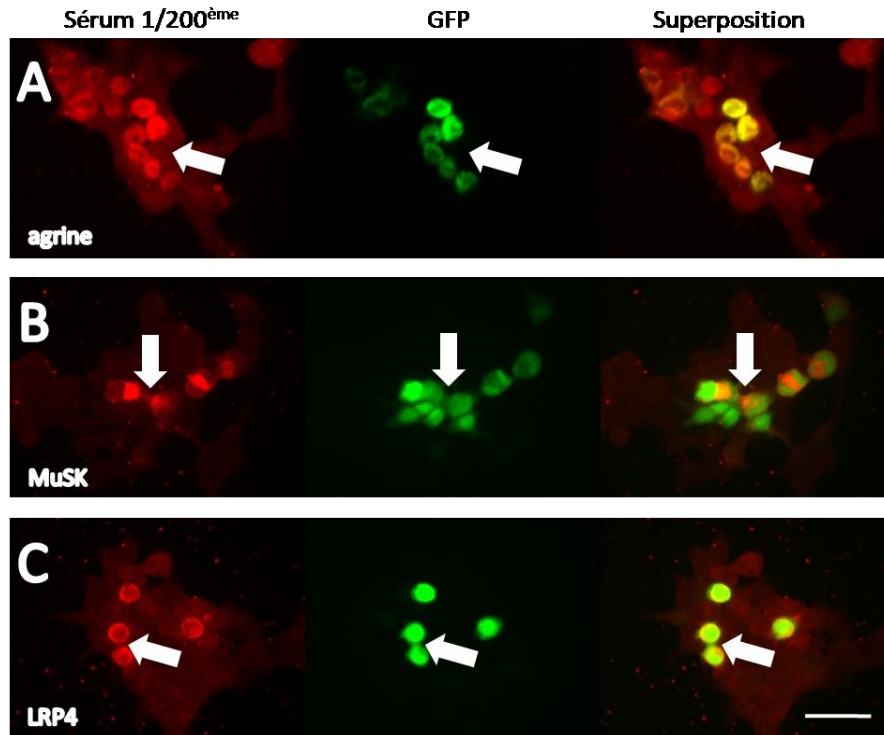


Figure 19 : Sérum d'un patient triplement positif en agrine (A) MuSK (B) et LRP4 (C). En rouge les anticorps secondaires après liaison des IgG du sérum retenues sur les cellules ; en vert le signal de la Green Fluorescent Protein (GFP) (couplée à la protéine d'intérêt). Les flèches blanches indiquent pour l'image la plus à gauche le signal correspondant aux IgG du sérum fixés à la protéine d'intérêt, pour l'image du centre le signal correspondant à la transfection de la protéine d'intérêt et pour l'image la plus à droite la co-localisation entre le signal rouge et le signal vert. La barre d'échelle correspond à 50µm.

Nous avons par la suite testé 42 sérums SNMG, sur les trois cibles antigéniques (agrine, MuSK et LRP4).

De façon intéressante, certains sérums ont été trouvés positifs pour deux voire les trois cibles testées (Tableau 17). En parallèle, afin de valider la spécificité du test, nous avons analysé la même cohorte de témoins négatifs que celle utilisée dans l'étude de 2014 du laboratoire pour les auto-anticorps anti-RACH de faible affinité[2]. Cette cohorte se compose de sérums de patients atteints de pathologies neurologiques auto-immunes autres que la myasthénie : la sclérose en plaque (SEP) ou la neuropathie dysimmune (NPD).

Tableau 17: Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-agrine/MuSK/LRP4 sur des sérums de patients SNMG et de patients témoins atteints de Sclérose en Plaque (SEP) ou de Neuropathie Dysimmune (NPD)

		Nombre de cas positifs pour les différentes cibles testées					
		AGRINE		MUSK		LRP4	
SNMG n = 42	15 (36%)	AGRINE seul : 11	7 (17%)	MUSK seul : 3	6 (14%)	LRP4 seul : 2	
		AGRINE + MUSK : 2		AGRINE + MUSK : 2		MUSK + LRP4 : 1	
		AGRINE + LRP4 : 1		MUSK + LRP4 : 1		AGRINE + LRP4 : 1	
		AGRINE+MUSK+LRP4 : 1		AGRINE+MUSK+LRP4 : 1		AGRINE+MUSK+LRP4 : 1	
						LRP4 + RACH : 1	
SEP / NPD n = 16	4 (25%)		3 (19%)		3 (19%)		

Parmi ces patients, certains se sont révélés positifs en agrine, MuSK et LRP4 avec une fréquence similaire aux SNMG, remettant en cause la méthode et la fiabilité des résultats (Tableau 17).

Face aux résultats obtenus avec les sérums témoins négatifs, nous avons remis en cause la spécificité de la méthode perméabilisée. Néanmoins, ces sérums sont issus de patients présentant une maladie auto-immune (SEP et NPD) et donc contenant des auto-anticorps liés à leur pathologie. Afin de vérifier que le biais de spécificité n'était pas seulement dû au fait que ces patients contrôles testés sont atteints d'une maladie auto-immune, nous avons constitué une sérothèque de témoins négatifs « vrais ». Ces sérums ont été prélevés sur le personnel du CBC (huit au total) ne possédant aucune pathologie auto-immune (connue à ce jour) et ayant signé un consentement éclairé nous donnant le droit d'utiliser leurs sérums à des fins de recherche. Nous avons testé ces huit sérums ainsi que les sérums de patients atteints de NPD et SEP trouvés comme positifs et six sérums positifs en agrine MuSK ou LRP4 utilisés précédemment. Il s'avère qu'aucun des huit témoins négatifs « vrais » n'ont révélés de réactivité contre les antigènes testés, tandis que les sérums de patients SEP, NPD et SNMG se sont à nouveau avérés positifs.

Pour essayer d'augmenter la spécificité de nos tests, nous avons essayé de travailler sur la perméabilisation des cellules. En effet, la perméabilisation des membranes rend le contenu cellulaire accessible aux anticorps, tandis qu'*in vivo*, il est probable que seuls les épitopes extracellulaires soient reconnus par les auto-anticorps. Étant donné que seules les cellules transfectées sont marquées par les anti-IgG, la liaison des anticorps est certainement liée à la surexpression des antigènes testés. Cependant, on peut imaginer qu'ils ne réagissent pas forcément avec l'antigène surexprimé, mais par exemple avec une protéine exprimée en réponse à la transfection: via une régulation transcriptionnelle indirecte due à l'expression de l'antigène, voire à cause des processus de transfection ou de surexpression en eux-mêmes (protéines de stress).

Pour évaluer si le fait de limiter la détection aux antigènes situés à la surface des cellules permet une meilleure spécificité, nous avons réalisé deux tests en parallèle : l'un avec perméabilisations des cellules et l'autre sans. Nous avons utilisé pour ce test deux sérums positifs pour chaque cible (agrine, MuSK et LRP4), deux sérums SNMG, et quatre sérums positifs dans la cohorte de témoins négatifs (Tableau 18). Pour rappel : SEP1= LRP4 positif ; SEP2= agrine positif et NPD1= agrine positif ; NPD2= MuSK positif.

Tableau 18 : Résultats des dosages d'auto-anticorps anti-agrine/MuSK/LRP4 pour la méthode perméabilisée et non perméabilisées.

Méthode non perméabilisée									
	Sérum agrine pos	Sérum MuSK pos	Sérum LRP4 pos	SNMG 1	SNMG 2	NPD 1 agrine pos	NPD 2 MuSK pos	SEP 1 LRP4 pos	SEP 2 agrine pos
agrine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MuSK	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LRP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Méthode perméabilisée									
	Sérum agrine pos	Sérum MuSK pos	Sérum LRP4 pos	SNMG 1	SNMG 2	NPD 1 agrine pos	NPD 2 MuSK pos	SEP 1 LRP4 pos	SEP 2 agrine pos
agrine	+	-	-	-	-	+	-	-	+
MuSK	-	+	-	-	-	-	+	-	-
LRP4	-	-	+	-	-	-	-	+	-

Les résultats montrent que quel que soit le sérum testé aucun signal n'est retrouvé lorsque les cellules ne sont pas perméabilisées. Inversement, lorsque les cellules sont perméabilisées, il y a la présence d'un signal pour les sérums SNMG trouvés positifs précédemment et les témoins négatifs SEP et NPD.

Ceci suggère que les antigènes surexprimés ne sont pas présents à la surface des cellules, ou en trop faible quantité pour être détectés. L'agrine étant une protéine sécrétée se liant à LRP4, il est probable qu'en l'absence de LRP4 à la membrane, elle ne soit pas retenue à la surface des cellules et diffuse dans le milieu de culture.

À la jonction neuromusculaire, MuSK et LRP4 constituent une unité fonctionnelle membranaire de réponse à l'agrine. Bien que cela ne soit pas formellement démontré, il est possible que l'adressage de ces deux récepteurs à la membrane ne se fasse correctement que si le complexe MuSK-LRP4 est déjà assemblé dans les vésicules post-golgiennes.

Nous avons donc répété la comparaison des méthodes perméabilisées ou non, en transfectant les cellules soit avec le vecteur d'expression de LRP4 seul comme précédemment, soit avec les plasmides MuSK et LRP4, soit avec les plasmides agrine MuSK et LRP4. De plus, cette fois-ci, nous avons utilisé un anticorps anti-LRP4 comme anticorps primaire, puisque nous n'avons pas la certitude qu'un des sérums de patients testés contienne effectivement des anticorps anti-LRP4. Aucun signal n'a été retrouvé en l'absence de perméabilisation, ce qui effectivement, remet en cause la présence de LRP4 à la membrane.

Les résultats obtenus jusqu'ici montrent donc que i) la méthode en CBA non perméabilisée telle qu'elle est réalisée, ne permet pas la détection d'anticorps anti-agrine, anti-MuSK ou anti-LRP4 et ii) la version perméabilisée de cette méthode permet effectivement de détecter des anticorps pour les différentes cibles. Néanmoins les résultats ne permettent pas d'affirmer la spécificité de cette technique.

III. Détection d'anticorps dirigés contre un antigène post-synaptique de la jonction neuromusculaire sur plaque de myoscreen

La grande majorité des auto-anticorps dans les myasthénies auto-immunes ciblent des antigènes post synaptiques de la JNM. Il serait très utile de disposer d'une méthode qui permette de déterminer en un seul test si un sérum contient des anticorps dirigés contre un tel antigène.

En parallèle de l'approche décrite dans la seconde partie du mémoire qui consistait à faire exprimer à des cellules des antigènes candidats pour identifier un type d'auto-anticorps dans un sérum de patient, nous avons essayé une autre méthode. Il s'agit d'induire *in vitro* la formation de structures post synaptiques dans des cellules musculaires humaines afin de produire un test permettant de détecter la présence d'un anticorps dirigé contre un antigène post synaptique quel qu'il soit. En cas de positivité, l'identification de la cible antigénique pourrait ensuite se faire grâce aux approches décrites précédemment.

1) Optimisation des conditions de culture pour la différenciation de myoblastes

a. *Caractérisation*

Initialement, nous avons cherché à caractériser les conditions optimales de différenciation de myoblastes. Pour cela nous avons utilisé deux lignées de myoblastes humains immortalisées fournies par le Dr LEBLANC. Afin d'évaluer la pureté de ces lignées nous les avons caractérisées par le biais d'un marquage de la desmine. En effet, cette protéine est un constituant des filaments intermédiaires spécifique des cellules musculaires (Figure 22).

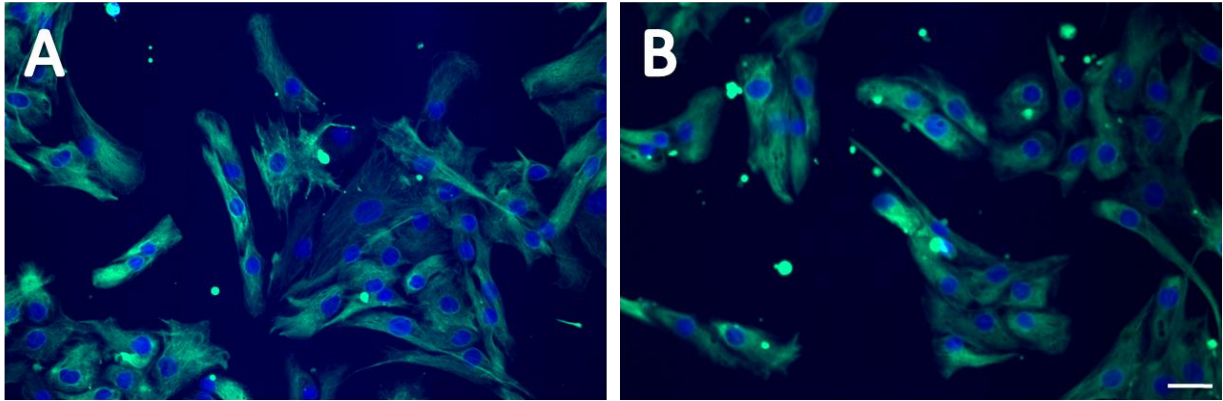


Figure 20 : Caractérisation par immunodétection par fluorescence des myoblastes de deux lignées immortalisées. (A) Lignée n°1 (B) Lignée n°2. Le signal vert correspond à la myosine des myotubes, le signal bleu correspond au marquage des noyaux au DAPI. La barre d'échelle correspond à 50µm.

Cette étape préliminaire de caractérisation nous a permis de valider que chacune des deux lignées était composée exclusivement de myoblastes.

b. Différenciation

Nous avons ensuite comparé ces lignées de myoblastes en les cultivant avec plusieurs milieux de différenciation afin de déterminer lequel nous permettait d'obtenir les myotubes les plus différenciés.

Après ensemencement des lignées sur des plaques 24 puits, à raison de 15'000 cellules par puits, les lignées ont été maintenues en cultures durant cinq jours afin d'obtenir un tapis cellulaire atteignant environ 90% de confluence soit durant cinq jours (Figure 23).

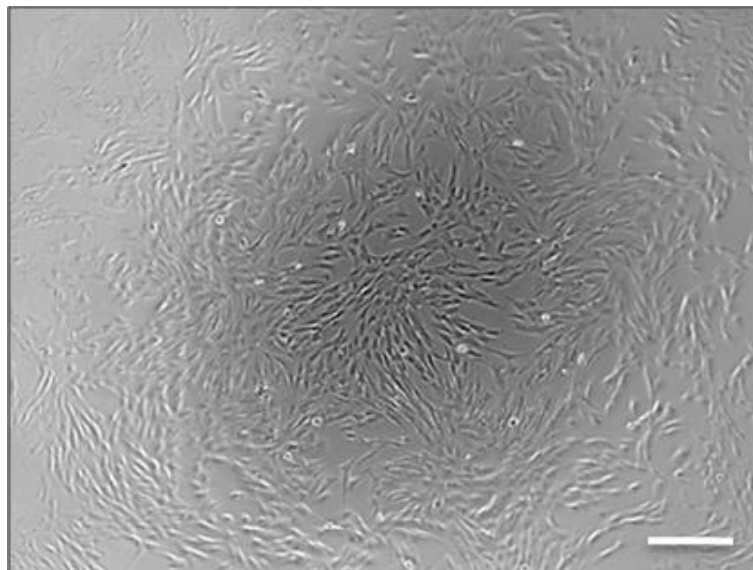


Figure 21 : Confluence du tapis cellulaire des lignées de myoblastes immortalisés cinq jours après ensemencement. La barre d'échelle correspond à 100µm.

Une fois la confluence optimale atteinte, quatre milieux de différenciation ont été testés sur chaque lignée. Après sept jours de différenciation, chaque lignée a été observée en contraste de phase. Puis, les cellules ont été marquées à la myosine et au DAPI afin de pouvoir apprécier leur degré de fusion et de différenciation (Figure 24).

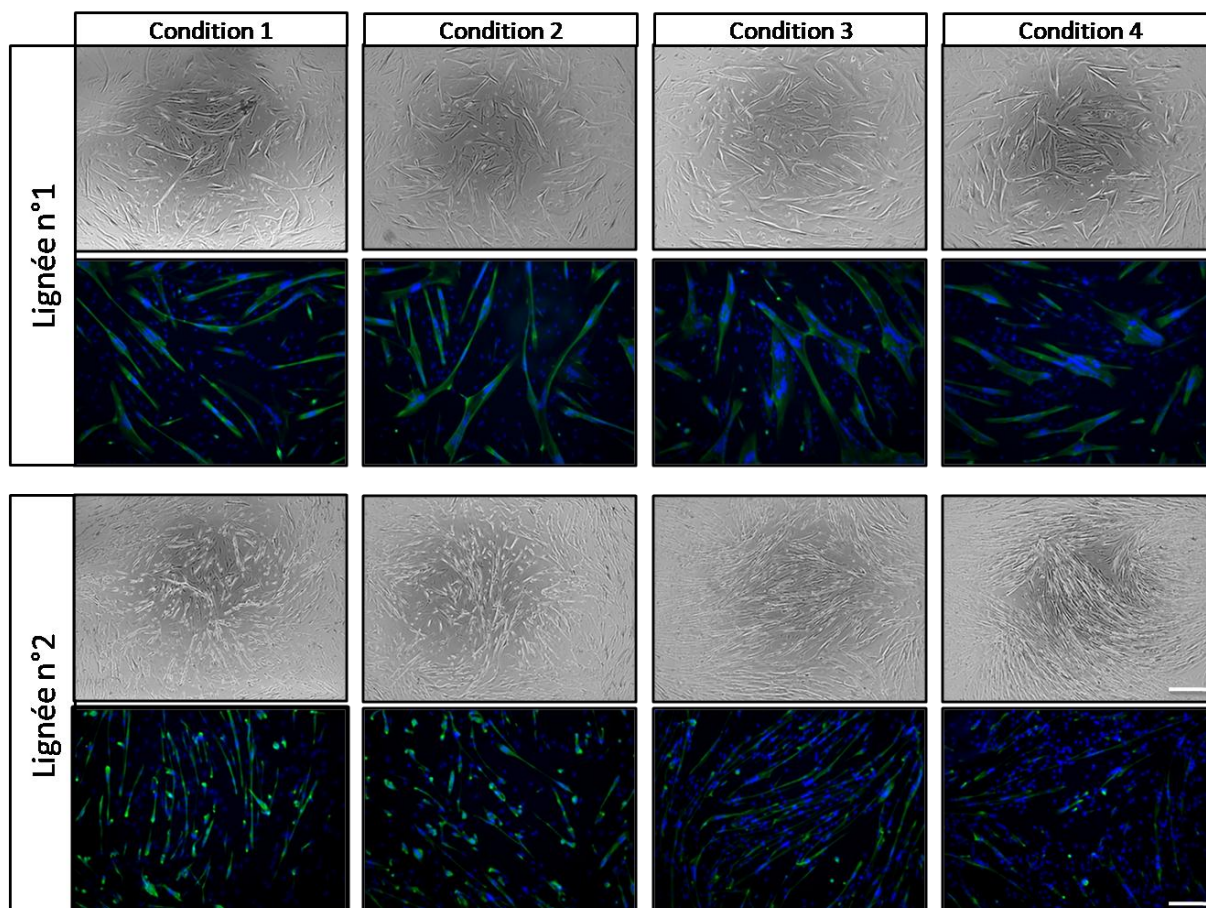


Figure 22 : Comparaison des différenciations de chaque lignée de myoblastes après cinq jours en fonction des quatre conditions de milieux. Condition 1 = milieu DMEM pur ; Condition 2 = milieu DMEM + Insuline 10 μ g/mL ; Condition 3 = milieu DMEM + 2% sérum de cheval ; Condition 4 = milieu DMEM + 2% sérum de cheval + Insuline 10 μ g/mL. Les lignées de myoblastes immortalisés n°1 et n°2 sont observés à la lumière blanche et en fluorescence. Le signal vert correspond à la myosine des myotubes, le signal bleu correspond au marquage des noyaux au DAPI. Les barres d'échelle correspondent à 100 μ m.

La lignée n°1 permet d'obtenir des myotubes de taille plus importante que la lignée n°2. On peut également observer que le milieu le plus optimal est le n°4 qui contient à la fois du sérum de cheval et de l'insuline. En effet, pour les deux lignées cellulaires le nombre et la qualité des myotubes dans cette condition est bien plus importante qu'avec les trois autres milieux testés.

Les conditions de culture et de différenciation ainsi testées et déterminées, nous avons essayé d'observer des agrégats RACH.

2) Établissement d'une nouvelle lignée de myoblastes humains

Avant d'aller plus loin dans les essais, nous avons décidé d'utiliser notre propre lignée de myoblastes, primaire ou immortalisée. En effet, le CBC propose, en parallèle de son activité diagnostique, une activité de biobanking au sein de son Centre de Ressource Biologique (CRB). Le CRB du CBC constitue des collections de lignées cellulaires. L'une de ces collections, alimentée et gérée le Dr STREICHENBERGER, est constituée de myoblastes issus de biopsies musculaires de patients, réalisées dans le cadre du diagnostic de diverses myopathies. Dans notre cas, le choix de la lignée de myoblastes (numéro d'anonymisation : V177) s'est porté sur un patient pour lequel l'anatomopathologie a conclu à l'absence de pathologie musculaire.

c. *Purification*

Les cultures primaires de myoblastes contiennent toujours une proportion importante de fibroblastes. C'est pourquoi après décongélation les myoblastes ont été purifiés sur colonne. Le principe de ce tri consiste à marquer les myoblastes avec des anticorps anti-CD56 (glycoprotéine qui s'exprime à la surface des cellules des muscles squelettiques) couplés à des microbilles aimantées. La suspension cellulaire est ensuite passée sur une colonne de tri préalablement fixée sur un aimant. Les myoblastes marqués sont ainsi retenus sur la colonne grâce aux microbilles aimantées, tandis que les autres cellules (fibroblastes) sont éluées. Afin d'évaluer la pureté de la culture avant et après purification un marquage desmine a été effectué (Figure 25).

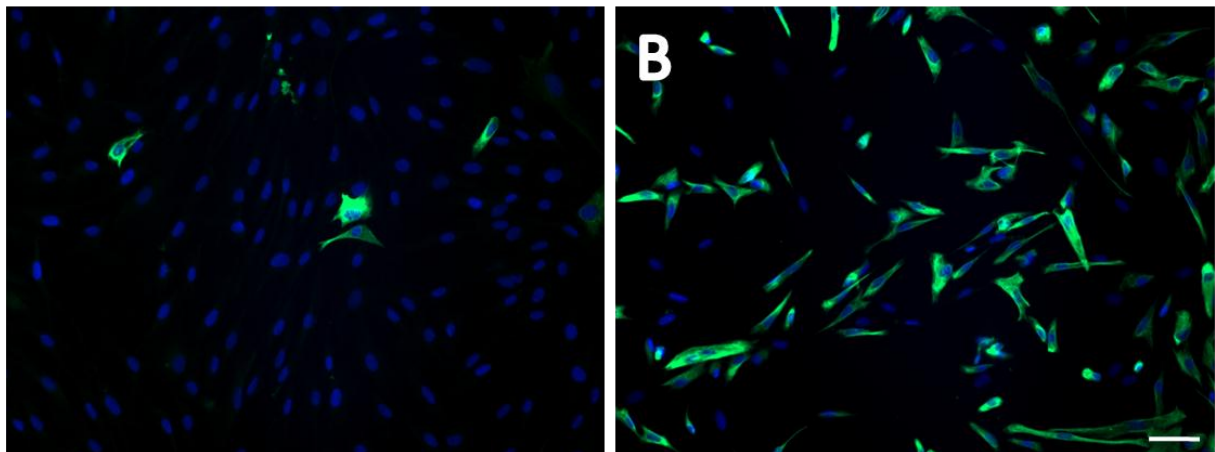


Figure 23 : Caractérisation par immunofluorescence des myoblastes de la lignée notée V177 purifiée sur colonne. (A) Avant purification (B) Après purification. En vert le signal associé à la myosine ; En bleu le signal associé au marquage des noyaux au DAPI. La barre d'échelle correspond à 50µm.

On estime grâce au comptage des champs, le taux de myoblastes avant purification à 4%. Après purification, le taux de myoblastes est estimé à 74%. Ces pourcentages ont été établis en comptant cinq champs au total contenant environ une centaine de cellules chacun puis une moyenne a été réalisée.

La lignée ainsi purifiée, a ensuite été amplifiée. Une partie des cellules a été cryoconservée en vue d'une utilisation ultérieure, une autre partie a été maintenue en culture afin de réaliser les tests et une troisième partie a été confiée au Dr LEBLANC afin qu'il réalise l'immortalisation de cette lignée.

d. Essai de production d'agrégation des RCh

Nous avons lancé un test sur une plaque 24 puits afin de visualiser des RCh sur cette lignée primaire (V177.wt), et sur sa version immortalisée (V77.Im), ainsi que sur une lignée contrôle (C2C12) de myoblastes murins connues pour former des agrégats de RCh.

In vivo et dans les cellules C2C12 l'agrine neuronale induit l'agrégation des RCh. Nous avons donc ajouté de l'agrine humaine purifiée au milieu de culture. Celle-ci nous a été fournie par le Dr RISSON de l'INMG. D'autre part, la matrice extracellulaire est un facteur important pour la différenciation des cellules musculaires [64]. Nous avons donc pré-traité la moitié des puits de la plaque avec du matrigel avant de déposer les cellules. Après ensemencement, les cellules ont été cultivées durant sept jours dans le milieu de différenciations précédemment sélectionné. (Figure 26).

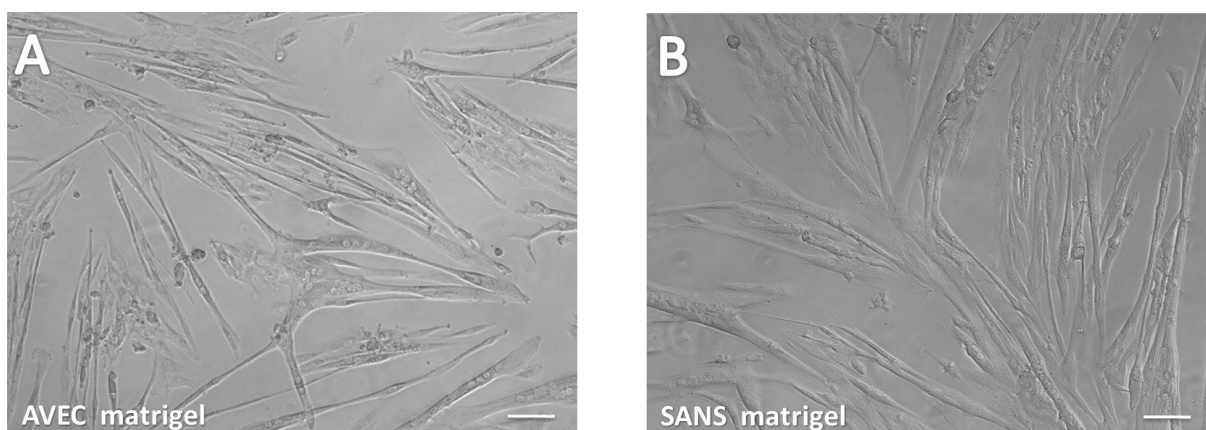


Figure 24 : Myoblastes de la lignée V177 sept jours après différenciation sur plaque 24 puits avec ou sans coating. Les plaques ont préalablement été traitée avec du matrigel (A) ou non (B). Les barres d'échelle correspondent à 50µm.

Contrairement à la lignée immortalisée n°1, nous remarquons que les myotubes de la lignée V177 sont plus grands, plus épais et nous visualisons également l'alignement des noyaux.

Pour induire l'agrégation des RCh, les myotubes ont ensuite été placés en présence de différentes concentrations d'agrine durant 24H. Après cela, les cellules ont été fixées au PFA puis marquées par un anticorps dirigé contre la chaîne lourde de la myosine, par de l'alphabungarotoxine couplée à un fluorochrome et par du DAPI. Sur les cellules C2C12, le signal correspondant aux agrégats de RCh semble maximum en présence de 10 ng/mL d'agrine, lorsque les cellules sont cultivées en présence de matrigel (Figure 27).

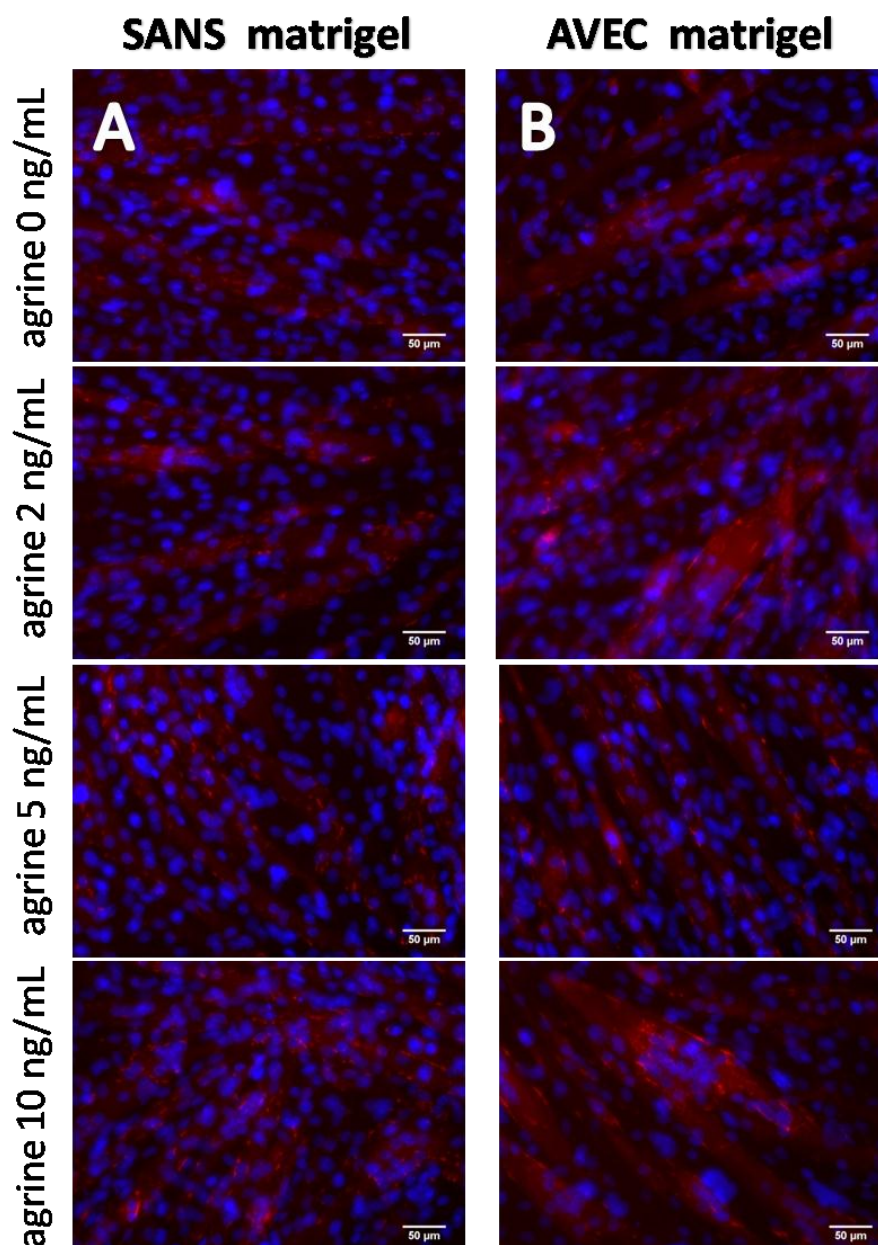


Figure 25 : Immunomarquage des RACH à l'alphabungarotoxine de la lignée murine (C2C12) sept jours après différenciation sur plaque 24 puits sans coating au matrigel. (A) ou avec (B) en fonction de la concentration d'agrine. En rouge le signal correspondant à l'alphabungarotoxine liée aux RACH ; en bleu le signal correspondant au marquage des noyaux au DAPI. Les barres d'échelle correspondent à 50μm.

Néanmoins, il n'apparaît pas de structures similaires sur les myotubes dérivés de myoblastes humains, qu'ils soient primaires ou immortalisés. Un signal cellulaire diffus dans la longueur d'onde correspondant au fluorochrome couplé à l'alphabungarotoxine semble plus important en présence de matrigel, et pourrait correspondre à une expression augmentée de RACH mais sans agrégation (Figures 28).

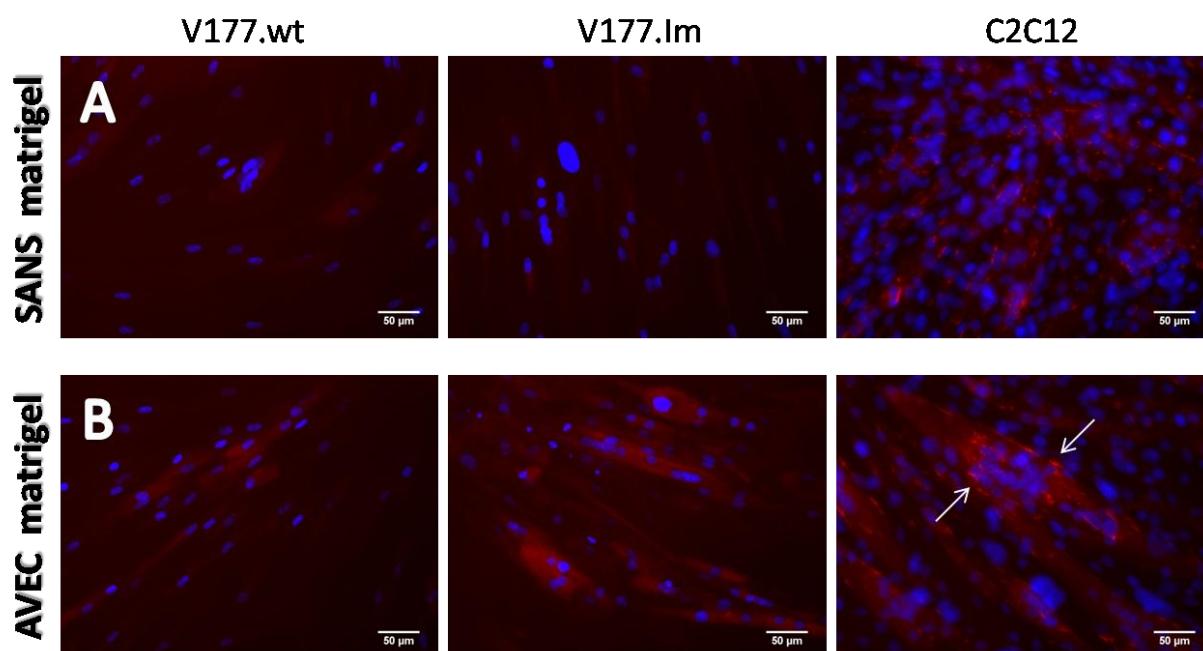


Figure 26 : Marquage des RACH à l'alphabungarotoxine des lignées primaire (V177.wt), immortalisées (V177.lm) et murines (C2C12) sept jours après différenciation sur plaque 24 puits sans coating au matrigel. (A) ou avec (B). En rouge le signal correspondant à l'alphabungarotoxine liée aux RACH ; en bleu le signal correspondant au marquage des noyaux au DAPI. Les flèches indiquent les clusters de RACH. Les barres d'échelle correspondent à 50μm.

Face à ces résultats peu concluants, nous nous sommes tournés vers une technologie mise au point par la société CYTOO, qui permet de former des agrégats de RACH sur des myotubes humains.

3) Production de RACH sur plaque myoscreen

La société CYTOO a mis au point un système de culture de myoblastes humains primaires sur plaque de verre dans laquelle sont creusés, grâce à un traitement UV, des micro-cavités appelée « UFO micropattern ».

L'abréviation UFO est issue de l'anglais Unidentified Flying Object (l'équivalent d'OVNI (Objet Volant Non Identifié) en français). Ce nom lui vient de sa forme représentant une soucoupe volante (Figure 29).

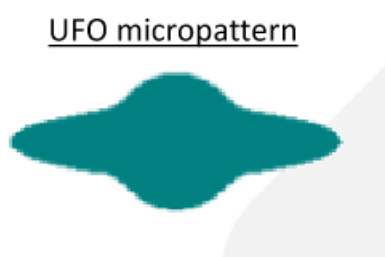


Figure 27 : Schéma représentant un « UFO micropattern ». (Figure issue de <https://cytoo.com>)

Ces patterns sont recouverts par une couche de fibronectine. Un traitement du reste de la plaque par un agent cytophobe empêche l'adhésion des cellules en dehors des patterns. Cet environnement permet de générer des contraintes mécaniques sur les cellules en cours de différenciation, ce qui serait favorable à l'apparition des agrégats de RACH. Après différenciation des myoblastes en myotubes puis ajout d'agraine recombinante, CYTOO a pu visualiser des clusters de RACH aux extrémités des myotubes formés dans les micropatterns (Figure 30).

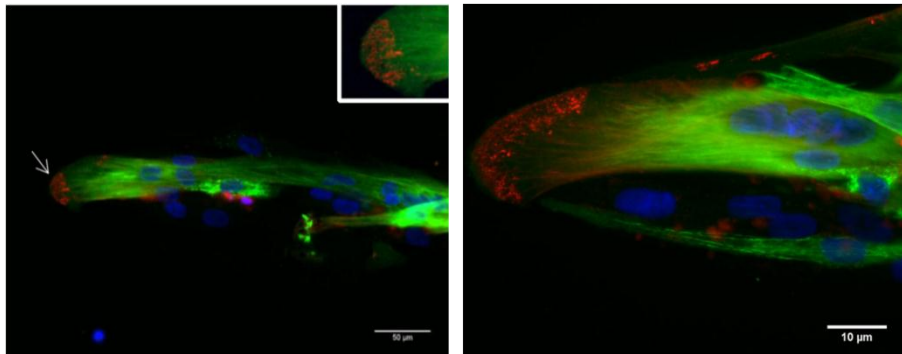


Figure 28 : Images des clusters de récepteurs marqués à l'alphabungarotoxine obtenus sur des myoblastes humains cultivés et différenciés en UFO micropattern par CYTOO. En vert le signal associé à la myosine (MY-32) ; en rouge le signal correspondant à l'alphabungarotoxine liée aux RACH ; en bleu le signal correspondant au marquage des noyaux au Hoechst. Les barres d'échelle correspondent à 10μm. (Figure issue de <https://cytoo.com>).

Notre objectif était donc dans un premier temps de réussir à reproduire de tels résultats, pour pouvoir tester dans un second temps si les autres protéines post synaptiques de la JNM étaient également présentes au niveau de ces agrégats et enfin tester des sérums de patients myasthéniques. Avant de lancer les premiers essais au sein de notre équipe, la société CYTOO a eu la gentillesse de me recevoir dans leurs locaux durant quelques jours afin de me former à l'utilisation de leur technique.

Nous avons utilisé la lignée primaire V177.wt et les lignées immortalisées n°1 et V177.Im sur plaque myoscreen, afin d'observer si la contrainte mécanique de culture permettait d'observer des clusters de récepteurs, en suivant strictement le protocole d'ensemencement et de différenciation établi par CYTOO (Figure 31).



Figure 29 : Myoblastes de la lignée primaire V177.wt (A) et des lignées immortalisées V177.Im (B) et n°1 (C) ensemencées et cultivées sur plaque myoscreen. Images prises au microscope à lumière blanche d'un micropattern sept jours après différenciation pour chaque lignée. Les barres d'échelle correspondent à 50μm.

Les résultats de cet essai nous ont permis de d'observer que la lignée V177, qu'elle soit primaire ou immortalisée, fusionne mieux dans les UFO que la lignée immortalisée n°1. On distingue plusieurs myotubes de grosse taille qui traversent l'UFO d'une extrémité à l'autre, et dont les noyaux se sont alignés (Figure 31 (A ; B)), ce qui n'est pas le cas pour la lignée n°1 (Figure 31 (C)). L'aspect des cellules du patient V177 ressemble d'avantage aux myotubes obtenus par la société CYTOO.

Après avoir fixé les cellules avec du PFA, un marquage a été réalisé avec un anticorps anti-myosine afin de visualiser respectivement les sarcomères et les clusters de RACH (Figure 32).

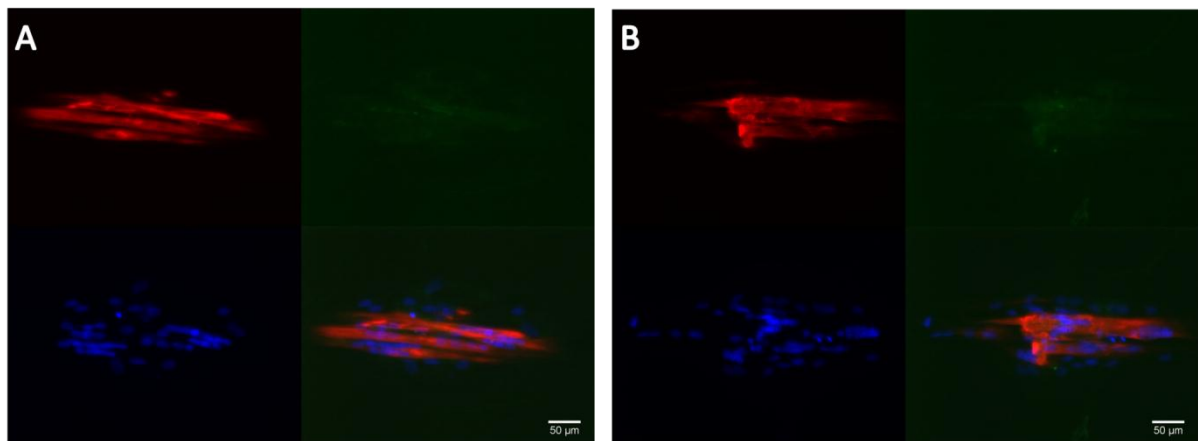


Figure 30 : Myoblastes de la lignée primaire V177.wt (A) et immortalisées V177.lm (B)ensemencées et cultivées sur plaque myoscreen. Images prises au microscope à épifluorescence d'un UFO sept jours après différenciation. En rouge le signal associé à la myosine ; en vert le signal associé à l'alphabungarotoxine ; en bleu le signal correspondant au marquage des noyaux au DAPI. Les barres d'échelle correspondent à 50μm.

Bien que les myotubes soient de bonne qualité (c'est-à-dire longs myotubes épais traversant les patterns de part en part), ce test ne nous a pas permis de mettre en évidence des clusters de récepteur que ce soit pour la lignée primaire ou immortalisée.

À ce stade, nous ne sommes donc pas en mesure de reproduire le modèle d'intérêt. Néanmoins, tous ces résultats nous ont permis de déterminer les conditions de culture et de différenciation optimales pour nos lignées cellulaires humaines. L'utilisation de cellules murines montrant des résultats encourageants, des axes de travail ont pu être mis en évidence afin d'atteindre notre objectif sur des cellules humaines.

DISCUSSION

L'objectif principal de mon travail était de développer des outils et des techniques de détection innovants afin d'accélérer et d'améliorer le diagnostic des patients atteints de myasthénies auto-immunes. Pour cela, mes recherches se sont articulées autour de trois axes : i) l'adaptation et la validation d'une méthode de détection des anticorps anti-RACH de faible affinité en CBA au sein d'un service hospitalier, ii) le développement d'autres CBA pour la recherche d'autres cibles antigéniques impliquées dans la myasthénie, et iii) la mise au point d'un test permettant de détecter la grande majorité des anticorps impliqués dans la myasthénie.

I. Détection des anticorps anti-RACH de faible affinité en Cell Based Assay au sein d'un service hospitalier

1) Adaptation et validation de la méthode

J'ai débuté mon projet par la mise en place et la validation du test de détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité au sein du CBC. La réalisation d'une validation de méthode selon les spécifications d'une norme (ISO 15189) et les exigences d'un organisme d'accréditation (COFRAC), bien que parfois fastidieuse, a permis d'identifier des paramètres critiques de la méthode, que ce soit en termes de réalisation ou en termes de gestion globale. Ces paramètres ne sont pas forcément critiques lorsque la technique est cantonnée au domaine de la recherche. C'est là toute la difficulté d'adapter une technique de ce type pour une utilisation à visée diagnostic dans un laboratoire de biologie médicale.

Après la phase d'adaptation, la validité de la méthode ayant été démontrée, la déclaration d'aptitude de celle-ci a été prononcée en interne le 05 septembre 2016. Cela nous a permis de la proposer aux cliniciens en routine. À court terme, la méthode devra faire l'objet d'une évaluation par un organisme externe, le COFFRAC. Avant cela, des améliorations peuvent encore être apportés et certains points restent à discuter.

Tout d'abord, l'item de la validation de méthode concernant les interférences pourrait être approfondit.

Bien que les éventuelles interférences liées à la qualité du sérum (hémolyse, ictère et turbidité) n'interviennent ni sur la présence des anticorps recherchés, ni sur la réaction antigène-anticorps permettant leur détection, il serait judicieux de réaliser des tests de surcharge. Ces tests correspondent à ajouter à des sérums connus comme étant positifs et des sérums témoins, des molécules permettant de reproduire une hémolyse ou un ictère par exemple. Pour cela, il faudrait être en mesure d'identifier au moins deux patients positifs acceptant d'être prélevés à nouveau afin de surcharger leur sérum (hémoglobine, bilirubine...). En parallèle, la même technique serait réalisée sur deux sérums sains, pour pouvoir constater que les paramètres tels que l'hémolyse l'ictère et la turbidité n'interfèrent pas sur le résultat final.

Ensuite, lors de l'évaluation de la robustesse de la technique, nous avons fait varier un certain nombre de paramètres (temps de fixation des cellules au PFA, temps d'incubation des anticorps, ...). L'objectif est de vérifier la stabilité de la méthode, en déterminant les plages de variations acceptables selon leur criticité envers le résultat final. Cette évaluation est compliquée car contrairement à des tests biochimiques « classiques », cette technique est longue et comprend beaucoup d'étapes.

L'abondance et la qualité de la cible (à savoir les RACH agrégés) constituent des paramètres qui n'ont pas pu être évalués systématiquement. De plus, pour que les tests des sérums soient interprétables, le pourcentage de cellules transfectées doit être suffisant. La distribution de la GFP doit être ponctuelle et ne pas occuper presque tout l'espace de la cellule. En effet, ce phénomène survient quand l'expression du/des transgène(s) est trop forte et cause l'accumulation intracellulaire de la protéine surexprimée. Comme il s'agit de protéines transmembranaires multimériques, elles s'accumulent probablement dans le réticulum endoplasmique sous forme d'agrégats mal repliés non reconnus par les auto-anticorps (Figure 15 (B), flèche jaune). Ainsi, la transfection doit être suffisamment efficace sans pour autant l'être « trop ».

Or, non seulement ce paramètre est difficile à contrôler lors de la réalisation de la méthode, mais également à évaluer lors de la phase de lecture. Il serait donc intéressant d'arriver à définir des conditions d'applicabilité du test relatives au profil d'expression des RACH. Cela pourrait par exemple être réalisé en déterminant au préalable le nombre minimal par puits de cellules présentant des agrégats de RACH satisfaisants.

Toutefois, cette caractérisation est compliquée pour deux raisons : i) le résultat de la transfection en lui-même est difficile à maîtriser et donc par conséquent à faire varier de manière contrôlée, et ii) nous avons pu observer que, selon une fréquence très variable, différents auto-anticorps se lient à des RACH distribués de manière différemment (en tâches, en points ou étalés par exemple). Cela rend le nombre minimal impossible à déterminer de manière générale.

C'est pour ces différentes raisons qu'à ce jour, l'évaluation de certains paramètres est uniquement qualitative. À titre d'exemple, pour illustrer la déviation de ce paramètre « qualitatif », nous avons observé au cours des tests de routine que la proportion des cellules transfectées non exploitables car exprimant les RACH trop fortement augmentait, alors que la technique restait inchangée. Cet élément nous a conduits à diminuer la quantité de transfectant (CaCl₂-HeBs) utilisée afin de diminuer la proportion de ces cellules transfectées non satisfaisantes. L'ajustement du protocole a été réalisé après avoir fait varier différents paramètres initiaux : quantité de cellulesensemencées, quantité d'ADN plasmidique, durée d'incubation du transfectant, ...

À défaut d'avoir une mesure simple de la qualité des cibles antigéniques disponibles, nous avons décidé d'ajouter, en plus du contrôle positif « fort » habituellement utilisé, un autre contrôle positif « faible ». Le premier est dit « fortement » positif car il génère un marquage des RACH fort sur la totalité des cellules transfectées. En comparaison, le second est dit « faiblement » positif car il est issu d'un patient avec une myasthénie avérée mais marquant faiblement une petite proportion des cellules transfectées. Ce contrôle permet de calibrer la technique afin de pouvoir observer le résultat que donnerai le signal d'un sérum faible.

2) Interprétation du résultat

Lorsque la méthode a été publiée par l'équipe du Dr VINCENT [1], un score à 5 degrés était établi lors de la lecture du test.

Il était réalisé sur la base de l'intensité de coloration lorsque le signal du marquage des IgG était positif et la proportion de co-localisation entre le signal de la GFP et le signal des anticorps. Néanmoins, cette interprétation laissait beaucoup de place à l'interprétation du lecteur (très faible, faible, modéré, fort, très fort), ce qui n'est pas optimal en termes de reproductibilité et de variation inter-opérateur. Dans notre cas, nous avons jugé qu'une telle analyse semi-quantitative du résultat serait difficile à mettre en place, compte tenu du temps d'analyse qu'impliquerait un comptage précis de la fraction de cellules transfectées marquées, plus le comptage parmi celles-ci de la fraction avec co-localisation. Nous avons également évoqué une quantification automatique de la fluorescence et des événements de co-localisation, mais ceci est extrêmement difficile à mettre en pratique. Le codage informatique serait fastidieux, face à la difficulté de l'interprétation du signal puisqu'il ne devrait pas compter : i) les cellules avec gros agrégat de GFP, ii) les signaux punctiformes disséminés d'anti-IgG (car il s'agit souvent d'agrégats extracellulaires non spécifiques) et iii) les cellules entièrement marquées de manière uniforme (car elles correspondent souvent à des cellules mortes, donc perméables, et donc à un marquage intra-cellulaire non spécifique).

Les pièges d'interprétation sont donc nombreux, et seule une lecture humaine après un bon apprentissage nous a semblé plausible. Nous avons effectivement fait le choix d'une interprétation purement qualitative (positif ou négatif). Le résultat est considéré comme positif lorsque l'on retrouve un signal correspondant au marquage des IgG du sérum et qu'au moins trois événements de co-localisation sont identifiés par puits. Si l'on n'observe qu'une ou deux co-localisations sur l'ensemble du puits, le sérum est testé de nouveau. Néanmoins, nous perdons probablement de l'information, concernant l'abondance et /ou l'affinité de l'auto-anticorps. De plus, il apparaît avec l'expérience de la lecture des plaques que les sérums pourraient au moins être classés en deux catégories : i) ceux pour lesquels le marquage et la co-localisation concernent la quasi-totalité des cellules transfectées, dits forts, et ii) ceux pour lesquels le marquage et la co-localisation sont faibles et/ou partiels.

On peut supposer que les marquages « forts » correspondent à des anticorps qui seraient rapidement détectables en RIA dans la suite de l'évolution de la maladie. Rappelons que la transfection avec les sous-unités du RACH mais sans la rapsyne a été abandonnée, ne constituant pas un vrai contrôle négatif, au profit d'une transfection avec rapsyne-GFP seule. Cette seconde méthode permet de vérifier que les anticorps ne se lient ni à la rapsyne ni à la GFP ni à un autre constituant non spécifique induit par le processus de transfection elle-même. Précisons que, lorsque ce contrôle était encore utilisé (première méthode), nous avons pu observer que les marquages « forts » étaient souvent positifs également dans les puits RACH-GFP sans rapsyne, sous la forme d'un halo continu péri-cellulaire. Cela pourrait signifier que ces Ac anti-RACH ne sont pas spécifiques de la forme agrégée. Il serait donc pertinent de réintroduire ce test. L'objectif serait d'évaluer voire de déterminer si les auto-anticorps sont vraiment spécifiques ou non de la forme agrégée des RACH. L'idée sous-jacente serait de valider la pertinence de ce critère pour une utilisation clinique en routine.

Enfin, lors de la réalisation des dosages pour la validation de méthode un paramètre important a été identifié : l'aspect et la densité cellulaire de la lignée cellulaire HEK 293 dans la flasque d'entretien de la souche, avant la mise en plaque. Lorsque les cellules sont à confluences, nous avons noté une transfection de moins bonne qualité, c'est-à-dire sur un moins grand nombre de cellules et représentant moins de clusters, et une mort cellulaire augmentée. C'est pourquoi nous avons mis en place deux dilutions de remise en culture différentes dans le protocole. Ceci permet de choisir la condition dans laquelle les cellules ont une confluence et une morphologie optimale. Un axe d'amélioration possible serait d'instaurer un moyen d'évaluer la densité cellulaire autrement que par une interprétation visuelle (mise en place d'un seuil limite de cellules/mL après comptage par exemple). Cela permettrait d'avoir une technique plus reproductible et non utilisateur-dépendant.

3) Résultats des premiers tests

Concernant les résultats des dosages réalisés, une analyse préliminaire des données a permis de mettre en avant plusieurs pistes à étudier. La première concerne le nombre de patients positifs aux anticorps anti-RACH de faible affinité selon le centre prescripteur. Nous avons noté que les centres nous envoyant de nombreux sérums ne sont pas forcément ceux pour lesquels on retrouve le plus de patients positifs. Cette différence est probablement due aux critères d'inclusion des patients qui diffèrent d'un hôpital à l'autre. Néanmoins, en l'absence de données sur la sévérité du tableau clinique, nous ne pouvons conclure sur ce point.

La seconde concerne l'analyse des données cliniques et épidémiologiques des patients positifs aux RACH de faible affinité. Celle-ci montre qu'il y a environ quatre fois plus d'hommes possédant ce type d'anticorps que de femmes, et qu'ils sont retrouvés en majorité chez des patients de plus de 40 ans.

Rappelons que d'après la littérature le ratio sexe de la myasthénie est en faveur des femmes, dans la population générale [38]. C'est la peut-être une piste à exploiter afin de définir des caractéristiques types pour ces patients. De plus, en fonction que l'atteinte liée à la myasthénie soit purement oculaire ou généralisée, le taux de patients possédant des anticorps anti-RACH de faible affinité est quasiment équivalent, ce qui est déjà décrit dans la littérature [63], [65].

Bien que ces résultats ne permettent pas d'établir un profil précis de patient, une des perspectives envisageables serait de réaliser une analyse plus poussée des données afin d'étudier si une corrélation existe entre les données épidémiologiques et cliniques des patients, les résultats des dosages, et les réponses aux traitements. Il serait pour cela intéressant de nous mettre en relation avec des neurologues afin qu'ils nous apportent leur expertise pour réaliser cette analyse.

II. Développement d'une nouvelle technique similaire destinée à la recherche d'autres cibles antigéniques impliquées dans la myasthénie

Le deuxième axe de recherche de ce travail s'est concentré sur l'adaptation de la technique de détection en CBA utilisée précédemment pour les RACH, à la recherche d'autres cibles antigéniques impliquées dans la myasthénie. L'objectif était de confirmer le diagnostic des patients souffrant d'un tableau évoquant une myasthénie auto-immune mais dont les dosages d'anticorps anti-RACH et anti-MuSK par RIA, ainsi que le dosage d'anticorps anti-RACH de faible affinité par CBA, restent négatifs. Notre stratégie a été de rechercher des auto-anticorps dirigés contre d'autres protéines importantes de la JNM.

La difficulté générale de cette partie a été l'absence de contrôle positif, puisqu'il s'agissait de la mise en évidence de nouvelles cibles, et non d'une comparaison de méthodes de détection utilisant la même cible.

Au fur et à mesure des essais infructueux, nous avons testé deux types de CBA : avec et sans perméabilisation des cellules, chacune ayant ses avantages et ses défauts.

En l'absence de perméabilisation cellulaire au moment de l'incubation des sérums, on interdit l'accès des anticorps aux épitopes intracellulaires. Cela limite le bruit de fond lié à des interactions non spécifiques ou croisées des IgG et favorise la spécificité de la détection. Le faible bruit de fond permet d'augmenter la quantité d'anticorps, en diluant peu les sérums (1/20^{ème}).

À l'inverse, si les sérums sont déposés après perméabilisation, on augmente la quantité de protéine cible produite accessible aux anticorps. Cela accroît donc la probabilité de détecter ces derniers. De plus, les cellules étant fixées, on peut augmenter le temps d'incubation de sérums, et donc favoriser là aussi, la réaction antigène-anticorps.

En revanche, l'importance des interactions non spécifiques contraint à augmenter la dilution des sérums ($1/200^{\text{ème}}$), ce qui engendre par conséquent la diminution de la quantité d'anticorps. Afin de diminuer le bruit de fond lié au signal non spécifique, nous avons ajouté une étape de clarification des sérums sur des cellules non transfectées (qui possèdent donc le même contenu protéique à l'exception des protéines cibles).

La perméabilisation des cellules nous a donc permis de mettre en évidence quelques sérums positifs. Ils sont définis par la co-localisation du signal GFP et du signal des IgG dans le cas de la transfection avec l'agrine, et de la concordance entre cellules transfectées et cellules marquées par les IgG pour MuSK et LRP4. Néanmoins, des sérums ont également été trouvés positifs dans la cohorte de sérums contrôles négatifs non myasthéniques mais atteints de pathologies auto-immunes, et ce dans une fréquence comparable.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- La méthode détecte un excès de faux positifs : Les IgG détectent d'autres cibles intracellulaires. Les cellules non transfectées n'étant pas marquées, il s'agit de protéines dont l'expression augmente après transfection. Les cellules transfectées avec GFP seule n'étant jamais positives, il s'agit probablement de protéines liées au complexe agrine-MuSK-LRP4 et non de protéines augmentées de manière non spécifique par les processus de transfection ou de surexpression.
- Il s'agit de vrais positifs, c'est-à-dire de sérums contenant des auto-anticorps anti-agrine ou anti-LRP4, mais non pathogènes : Les patients de la cohorte de témoins négatifs n'ont pas de signes évocateurs d'une altération de la transmission neuromusculaire. Cependant, ces sérums témoins sont issus de patients qui présentent tout de même des pathologies dysimmunes. De plus, on sait que l'agrine et LRP4 sont exprimées ailleurs qu'à la JNM.

Ces anticorps sont peut-être le témoin d'une pathologie auto-immune en cours, même s'ils ne sont pas directement pathogènes pour la JNM. Ils peuvent donc être importants à mettre en évidence pour le clinicien, au même titre que d'autres auto-anticorps recherchés bien qu'étant sans pathogénicité prouvée (exemple des facteurs antinucléaire dans les Lupus). C'est pour cette raison que nous avons dosé, dans les mêmes conditions que pour les témoins dysimmuns, une série de sérums de personnes saines, afin de vérifier la spécificité de l'association avec le processus auto-immun. Aucun des sérums testés n'a été trouvé positif pour aucune des cibles. Ce résultat irait dans le sens de la détection de vrais auto-anticorps associés à des pathologies auto-immunes. Néanmoins, le nombre de sérums négatifs « vrais » testés est faible ($n=8$).

Face à ces résultats, il semble donc que l'orientation la plus judicieuse à prendre soit de réussir à développer cette technique sans perméabilisation, bien qu'une transfection avec le complexe agrine-MuSK-LRP4 ou avec les protéines exprimées individuellement ne permettent pas la détection de sérum positif, en l'état actuel du protocole.

L'agrine étant sécrétée, une des perspectives est de trouver un moyen de l'ancrer à la membrane (ce que nous pensions arriver à faire en utilisant une co-transfection avec LRP4). Pour cela, nous pourrions générer un plasmide contenant son isoforme transmembranaire (normalement exprimée dans le cerveau).

Quant à LRP4, afin d'augmenter sa quantité à la membrane, nous pourrions le co-transfecter avec LRPAP1, qui est une protéine chaperonne [66].

Une piste à explorer également, serait une co-transfection du complexe agrine-MuSK-LRP4 avec un plasmide permettant l'expression de la protéine DOK-7. Des mutations dans le gène régulant son expression ont été mises en évidence chez des patients atteints de SMC. DOK-7 régule l'activation du MuSK phosphorylé et permet son activation. Cette protéine est donc nécessaire et suffisante pour l'activation de MuSK, sachant que l'inactivation de celle-ci entraîne la non agrégation de RACH membranaire.

Enfin, plusieurs études dans la littérature mettent en avant la détection de sérums positifs pour agrine et LRP4 voir multi-positifs pour les différentes cibles, grâce à une technique en CBA avec perméabilisation des cellules (Figure 11) [51]). Inversement, on trouve peu d'articles mettant en avant de tels résultats avec une méthode non perméabilisée.

III. Mise au point d'une technique de détection non spécifique de l'ensemble des auto-anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie

La méthode CBA pour la détection d'autres anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie n'étant pas spécifique, nous avons abordé une stratégie différente. Nous avons orienté nos recherches sur la mise au point d'une technique de détection non spécifique de l'ensemble des auto-anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie. En effet, le troisième et dernier axe de ce projet a été de produire *in vitro* des structures réceptrices semblables à celles rencontrées *in vivo* au niveau des JNM. Notre stratégie expérimentale a été d'utiliser des cellules humaines différenciées. L'objectif était de tester une grande partie des cibles antigéniques potentiellement impliquées dans la myasthénie en aveugle. Malgré l'utilisation de différentes lignées (primaires ou immortalisées) et l'utilisation d'une technologie de culture en micropattern, nous n'avons, pour l'heure, pas réussi à mettre en évidence les RACH. Néanmoins, de façon encourageante nous arrivons à les observer sur une lignée contrôle de cellules murines (C2C12).

Les essais sur cette technique n'en sont qu'à leurs débuts. L'objectif à court terme est donc de réussir à reproduire les résultats de la société CYTOO qui commercialise les plaques, à savoir visualiser des clusters de récepteurs sur les myotubes différenciés dans les micropatterns. Pour cela, nous avons commandé des « CYTOOchipTM ».

Ce sont des lames de verre comportant les mêmes micropatterns coatés à la fibronectine. Le protocole d'utilisation reste donc le même que pour les plaques 96 puits, néanmoins ces lames seront plus simples à manipuler que les plaques. De plus, nous avons demandé de l'aide à la société afin de s'assurer que nous réalisons leur protocole correctement. En parallèle, dans la mesure où nous réussissons à visualiser des RACH sur les cellules murines, nous pourrions essayer de passer des sérums de patients séropositifs afin d'observer ce qu'en serait le résultat.

Une co-localisation des IgG avec ces agrégats de RACH indiquerait la présence d'anticorps ciblant la JNM, sans que l'on sache quelle protéine est l'antigène. À long terme, on pourrait déterminer quel composant de la JNM est ciblé.

La stratégie serait d'incuber le sérum avec un extrait de cellules musculaires contenant des structures de type JNM, puis après immuno-précipitation des complexes antigènes-IgG et migration sur gel, analyser par spectrométrie de masse les bandes spécifiques. La spécificité pourrait être obtenue soit par rapport à une condition utilisant le même sérum avec un extrait de cellules musculaire sans JNM, soit avec un sérum contrôle sur le même extrait cellulaire. Ce projet pourrait être réalisé dans la continuité de mon diplôme EPHE au sein du laboratoire.

CONCLUSION

La myasthénie auto-immune est une pathologie de la JNM rare, dont le diagnostic reste à ce jour relativement complexe. En plus d'arguments cliniques et paracliniques, il est établi grâce à des dosages sérologiques permettant la mise en évidence d'auto-anticorps dirigés contre des constituants de la JNM. Néanmoins, à l'heure actuelle ce diagnostic sérologique n'est fiable que pour 90% des patients, grâce à la détection avec un dosage en RIA des auto-anticorps anti-RACH (80%) ou anti-MuSK (10%).

Il reste donc environ 10% de patients séronégatifs, également appelés SNMG, pour lesquels l'incertitude de diagnostic persiste.

L'objectif principal de mes travaux a été de développer et mettre en place des techniques, afin d'améliorer et d'accélérer le diagnostic de ces patients SNMG.

Le premier axe de travail a consisté à mettre en place au sein d'un service hospitalier, à savoir le CBC des HCL, d'un test de détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité, grâce à une technique en CBA. Après une phase d'adaptation de la méthode qui jusque-là, était réalisée au titre de la recherche, une validation dans le cadre de l'accréditation des laboratoires de biologie médicale selon la norme NF EN ISO 15189 a été effectuée. Cette technique ainsi approuvée a été mise en place en tant que diagnostic de routine le 05 septembre 2016. Depuis cette date, elle a permis de mettre en évidence la présence d'auto-anticorps anti-RACH de faible affinité chez 40 patients, soit environ 9% des patients SNMG testés.

Néanmoins, ce test ne permet pas de diagnostiquer la totalité des SNMG restant. Il était donc important de développer un test similaire permettant de déterminer si ces patients possèdent des auto-anticorps dirigés contre d'autres cibles antigéniques de la JNM. Ce fut l'objectif mon deuxième axe de travail. Le protocole en CBA utilisé initialement pour les auto-anticorps anti-RACH a donc été développé et adapté afin de pouvoir détecter des anticorps anti-agrine, anti-MuSK et/ou anti-LRP4. Toutefois, les résultats obtenus soulignent que la méthode n'est pas spécifique. Ce manque de spécificité est probablement lié à la perméabilisation des cellules qui permet la fixation d'anticorps non spécifiques conduisant à de faux positifs. Une des perspectives serait donc d'arriver à réaliser cette technique sans avoir à perméabiliser les cellules, afin d'assurer la spécificité de celle-ci.

Face ces résultats et sachant qu'il reste potentiellement d'autres cibles antigéniques non identifiées pouvant être impliquées dans la myasthénie au niveau de JNM, nous avons abordé une autre approche. Celle-ci consiste à développer un test non ciblé permettant de trouver des anticorps dirigés contre la JNM et non pas une cible précise. Notre stratégie innovante repose sur l'utilisation de myoblastes humains cultivés sur des « micropatterns » contraints à se différencier mécaniquement.

Ces myoblastes matures ainsi obtenus et en conjonction avec l'apport de facteurs neutrophiques, permettent de créer des agrégats de RACH semblables à ceux observés *in vivo* à la JNM. Lorsque nous aurons réussi à visualiser de tels agrégats de RACH, l'objectif suivant sera de tester des sérums de patients sur ces cellules afin de visualiser d'éventuels auto-anticorps dirigés contre cette reconstitution partielle de la partie post-synaptique de la JNM. Pour l'heure, les premiers résultats concernant ce troisième et dernier axe de travail sont plutôt encourageants.

En conclusion, grâce à ces travaux, le diagnostic sérologique de la myasthénie auto-immune a pu s'étoffer, ce qui a permis de rendre un résultat sérologique à plusieurs patients. Les recherches en cours afin de le développer de surcroît sont prometteuses et permettront d'aider de nombreux autres patients lorsqu'elles auront abouti.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] M. I. Leite *et al.*, "IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis," *Brain*, vol. 131, no. 7, pp. 1940–1952, Jul. 2008.
- [2] P. Devic *et al.*, "Antibodies to clustered acetylcholine receptor: expanding the phenotype," *Eur. J. Neurol.*, vol. 21, no. 1, pp. 130–134, 2014.
- [3] S. Schiaffino and C. Reggiani, "Fiber types in mammalian skeletal muscles," *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 4, pp. 1447–1531, Oct. 2011.
- [4] D. Pette and R. S. Staron, "Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 50, no. 6, pp. 500–509, Sep. 2000.
- [5] R. S. Beddington and E. J. Robertson, "Anterior patterning in mouse," *Trends Genet. TIG*, vol. 14, no. 7, pp. 277–284, Jul. 1998.
- [6] A. G. Borycki, B. Brunk, S. Tajbakhsh, M. Buckingham, C. Chiang, and C. P. Emerson, "Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 126, no. 18, pp. 4053–4063, Sep. 1999.
- [7] S. M. Abmayr and G. K. Pavlath, "Myoblast fusion: lessons from flies and mice," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 139, no. 4, pp. 641–656, Feb. 2012.
- [8] P. S. Zammit, T. A. Partridge, and Z. Yablonka-Reuveni, "The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold," *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.*, vol. 54, no. 11, pp. 1177–1191, Nov. 2006.
- [9] R. Bischoff, "Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture," *Dev. Biol.*, vol. 115, no. 1, pp. 129–139, May 1986.
- [10] D. D. Cornelison, B. B. Olwin, M. A. Rudnicki, and B. J. Wold, "MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient," *Dev. Biol.*, vol. 224, no. 2, pp. 122–137, Aug. 2000.
- [11] A. Mauro, "SATELLITE CELL OF SKELETAL MUSCLE FIBERS," *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, vol. 9, no. 2, pp. 493–495, Feb. 1961.
- [12] A. Renzini, A. Benedetti, M. Bouché, L. Silvestroni, S. Adamo, and V. Moresi, "Culture conditions influence satellite cell activation and survival of single myofibers," *Eur. J. Transl. Myol.*, vol. 28, no. 2, p. 7567, Apr. 2018.
- [13] H. E. Huxley, "Electron microscope studies of the organisation of the filaments in striated muscle," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 12, no. 1, pp. 387–394, Oct. 1953.
- [14] K. Yamamoto, H. Nakayama, K. Nunoi, and M. Fujishima, "Interaction of calmodulin with troponin I and the troponin-tropomyosin-actin complex. Effect of Ca²⁺ and Sr²⁺ ions," *Biochem. J.*, vol. 241, no. 3, pp. 905–909, Feb. 1987.
- [15] B. Allard, "From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: Basic aspects and related clinical disorders," *Neuromuscul. Disord. NMD*, vol. 28, no. 5, pp. 394–401, May 2018.
- [16] H. Nishimune and K. Shigemoto, "Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease," *Neurol. Clin.*, vol. 36, no. 2, pp. 231–240, May 2018.

- [17] P. Rigoard *et al.*, "Organisation structurale, moléculaire, formation et maturation de la jonction neuromusculaire," *Neurochirurgie*, vol. 55, Supplement 1, pp. S34–S42, Mar. 2009.
- [18] W. Lin, H. B. Sanchez, T. Deerinck, J. K. Morris, M. Ellisman, and K. F. Lee, "Aberrant development of motor axons and neuromuscular synapses in erbB2-deficient mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 3, pp. 1299–1304, Feb. 2000.
- [19] M. L. Reynolds and C. J. Woolf, "Terminal Schwann cells elaborate extensive processes following denervation of the motor endplate," *J. Neurocytol.*, vol. 21, no. 1, pp. 50–66, Jan. 1992.
- [20] P. M. R. Cruz, J. Palace, and D. Beeson, "Inherited disorders of the neuromuscular junction: an update," *J. Neurol.*, vol. 261, no. 11, pp. 2234–2243, Oct. 2014.
- [21] C. R. Slater, "The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 10, Oct. 2017.
- [22] J. Verschuuren, E. Strijbos, and A. Vincent, "Neuromuscular junction disorders," *Handb. Clin. Neurol.*, vol. 133, pp. 447–466, Jan. 2016.
- [23] C. Shen, W.-C. Xiong, and L. Mei, "LRP4 in neuromuscular junction and bone development and diseases," *Bone*, vol. 80, pp. 101–108, Nov. 2015.
- [24] L. Shi, A. K. Y. Fu, and N. Y. Ip, "Molecular mechanisms underlying maturation and maintenance of the vertebrate neuromuscular junction," *Trends Neurosci.*, vol. 35, no. 7, pp. 441–453, Jul. 2012.
- [25] S. J. Burden, M. G. Huijbers, and L. Remedio, "Fundamental Molecules and Mechanisms for Forming and Maintaining Neuromuscular Synapses," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, Feb. 2018.
- [26] M. Motomura and O. Higuchi, "[Progress of myasthenia gravis: discovery of Lrp4 antibodies]," *Rinshō Shinkeigaku Clin. Neurol.*, vol. 52, no. 11, pp. 1303–1305, 2012.
- [27] S. Berrih-Aknin, M. Frenkian-Cuvelier, and B. Eymard, "Diagnostic and clinical classification of autoimmune myasthenia gravis," *J. Autoimmun.*, vol. 48–49, pp. 143–148, Feb. 2014.
- [28] L. Schaeffer, A. de Kerchove d'Exaerde, and J. P. Changeux, "Targeting transcription to the neuromuscular synapse," *Neuron*, vol. 31, no. 1, pp. 15–22, Jul. 2001.
- [29] H. Wu, W. C. Xiong, and L. Mei, "To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 137, no. 7, pp. 1017–1033, Apr. 2010.
- [30] A. G. Engel, "Congenital Myasthenic Syndromes in 2018," *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, vol. 18, no. 8, p. 46, Jun. 2018.
- [31] C. Legay, "Congenital myasthenic syndromes with acetylcholinesterase deficiency, the pathophysiological mechanisms," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1413, no. 1, pp. 104–110, Feb. 2018.
- [32] B. Eymard *et al.*, "[Congenital myasthenic syndromes: difficulties in the diagnosis, course and prognosis, and therapy--The French National Congenital Myasthenic Syndrome Network experience]," *Rev. Neurol. (Paris)*, vol. 169 Suppl 1, pp. S45–55, Feb. 2013.
- [33] P. B. Shieh and S. J. Oh, "Congenital Myasthenic Syndromes," *Neurol. Clin.*, vol. 36, no. 2, pp. 367–378, May 2018.

- [34] D. C. Abenroth, A. G. Smith, J. E. Greenlee, S. D. Austin, and S. L. Clardy, "Lambert-Eaton myasthenic syndrome: Epidemiology and therapeutic response in the national veterans affairs population," *Muscle Nerve*, vol. 56, no. 3, pp. 421–426, Sep. 2017.
- [35] R. Hülsbrink and S. Hashemolhosseini, "Lambert–Eaton myasthenic syndrome – Diagnosis, pathogenesis and therapy," *Clin. Neurophysiol.*, vol. 125, no. 12, pp. 2328–2336, Dec. 2014.
- [36] V. G. Kesner, S. J. Oh, M. M. Dimachkie, and R. J. Barohn, "Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome," *Neurol. Clin.*, vol. 36, no. 2, pp. 379–394, May 2018.
- [37] M. K. Hehir and N. J. Silvestri, "Generalized Myasthenia Gravis: Classification, Clinical Presentation, Natural History, and Epidemiology," *Neurol. Clin.*, vol. 36, no. 2, pp. 253–260, May 2018.
- [38] B. Eymard, "La myasthénie du côté de l'interniste," *Rev. Médecine Interne*, vol. 35, no. 7, pp. 421–429, Jul. 2014.
- [39] W. D. Phillips and A. Vincent, "Pathogenesis of myasthenia gravis: update on disease types, models, and mechanisms," *F1000Research*, vol. 5, 2016.
- [40] D. B. Drachman, "Myasthenia gravis," *N. Engl. J. Med.*, vol. 330, no. 25, pp. 1797–1810, Jun. 1994.
- [41] A. Vincent, "Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 2, no. 10, pp. 797–804, Oct. 2002.
- [42] W. Hoch, J. McConville, S. Helms, J. Newsom-Davis, A. Melms, and A. Vincent, "Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies," *Nat. Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 365–368, Mar. 2001.
- [43] A. Vincent and M. I. Leite, "Neuromuscular junction autoimmune disease: muscle specific kinase antibodies and treatments for myasthenia gravis," *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 18, no. 5, pp. 519–525, Oct. 2005.
- [44] A. Vincent and J. Newsom-Davis, "Acetylcholine receptor antibody as a diagnostic test for myasthenia gravis: results in 153 validated cases and 2967 diagnostic assays," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 48, no. 12, pp. 1246–1252, Dec. 1985.
- [45] J. J. G. M. Verschuuren *et al.*, "Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase and low-density lipoprotein receptor-related protein 4," *Autoimmun. Rev.*, vol. 12, no. 9, pp. 918–923, Jul. 2013.
- [46] L. Yang *et al.*, "Non-radioactive serological diagnosis of myasthenia gravis and clinical features of patients from Tianjin, China," *J. Neurol. Sci.*, vol. 301, no. 1–2, pp. 71–76, Feb. 2011.
- [47] S. Jacob *et al.*, "Presence and pathogenic relevance of antibodies to clustered acetylcholine receptor in ocular and generalized myasthenia gravis," *Arch. Neurol.*, vol. 69, no. 8, pp. 994–1001, Aug. 2012.
- [48] O. Higuchi, J. Hamuro, M. Motomura, and Y. Yamanashi, "Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis," *Ann. Neurol.*, vol. 69, no. 2, pp. 418–422, Feb. 2011.
- [49] A. Pevzner *et al.*, "Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis," *J. Neurol.*, vol. 259, no. 3, pp. 427–435, Mar. 2012.

- [50] C. Shen *et al.*, "Antibodies against low-density lipoprotein receptor-related protein 4 induce myasthenia gravis," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 12, pp. 5190–5202, Dec. 2013.
- [51] M. Yan, G.-L. Xing, W.-C. Xiong, and L. Mei, "Agrin and LRP4 antibodies as new biomarkers of myasthenia gravis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1413, no. 1, pp. 126–135, Feb. 2018.
- [52] B. Zhang *et al.*, "Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis," *Arch. Neurol.*, vol. 69, no. 4, pp. 445–451, Apr. 2012.
- [53] J. Cossins *et al.*, "The search for new antigenic targets in myasthenia gravis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1275, no. 1, pp. 123–128, Dec. 2012.
- [54] C. Gasperi *et al.*, "Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis," *Neurology*, vol. 82, no. 22, pp. 1976–1983, Jun. 2014.
- [55] B. Zhang *et al.*, "Autoantibodies to Agrin in Myasthenia Gravis Patients," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Mar. 2014.
- [56] Y. Kawakami *et al.*, "Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK," *Neurology*, vol. 77, no. 20, pp. 1819–1826, Nov. 2011.
- [57] M. Zoltowska Katarzyna, K. Belaya, M. Leite, W. Patrick, A. Vincent, and D. Beeson, "Collagen Q--a potential target for autoantibodies in myasthenia gravis," *J. Neurol. Sci.*, vol. 348, no. 1–2, pp. 241–244, Jan. 2015.
- [58] W. Wang, H. Hao, and F. Gao, "Detection of multiple antibodies in myasthenia gravis and its clinical significance," *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 123, no. 18, pp. 2555–2558, Sep. 2010.
- [59] A. M. Yamamoto *et al.*, "Anti-titin antibodies in myasthenia gravis: tight association with thymoma and heterogeneity of nonthymoma patients," *Arch. Neurol.*, vol. 58, no. 6, pp. 885–890, Jun. 2001.
- [60] D. Beeson *et al.*, "Primary structure of the human muscle acetylcholine receptor. cDNA cloning of the gamma and epsilon subunits," *Eur. J. Biochem.*, vol. 215, no. 2, pp. 229–238, Jul. 1993.
- [61] J. Cossins *et al.*, "Diverse molecular mechanisms involved in AChR deficiency due to rapsyn mutations," *Brain J. Neurol.*, vol. 129, no. Pt 10, pp. 2773–2783, Oct. 2006.
- [62] M. I. Leite *et al.*, "IgG1 antibodies to acetylcholine receptors in 'seronegative' myasthenia gravis," *Brain*, vol. 131, no. 7, pp. 1940–1952, Jul. 2008.
- [63] M. I. Leite, P. Waters, and A. Vincent, "Diagnostic use of autoantibodies in myasthenia gravis," *Autoimmunity*, vol. 43, no. 5–6, pp. 371–379, Aug. 2010.
- [64] F. Melo, D. J. Carey, and E. Brandan, "Extracellular matrix is required for skeletal muscle differentiation but not myogenin expression," *J. Cell. Biochem.*, vol. 62, no. 2, pp. 227–239, Aug. 1996.
- [65] A. Vincent *et al.*, "Serological and experimental studies in different forms of myasthenia gravis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1413, no. 1, pp. 143–153, Feb. 2018.
- [66] P. M. Rodriguez Cruz, S. Huda, P. López-Ruiz, and A. Vincent, "Use of cell-based assays in myasthenia gravis and other antibody-mediated diseases," *Exp. Neurol.*

ANNEXES

Annexe N°1 (A) : Fiche de liaison



Hospices Civils de Lyon

LABORATOIRE de BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES du CHU de LYON
GHE - Centre de Biologie et Pathologie Est

Demande D'analyses : Centre de Biotechnologie Cellulaire et Biothèque

2^{ème} Étage - Renseignements : Tél 04.72.12.96.99 – Fax 04.72.12.97.10 (8h - 16h30)

Zone obligatoirement remplie par le préleveur

Prescripteur :
Préleveur :
Téléphone :
Incident au cours du prélèvement :

Joindre 4 étiquettes « Patient »
N° séjour :
Nom usuel :
Prénom :
Date de naissance : **Sexe :**
Nom de naissance :
Service prescripteur :

Prélèvement

Date : **Heure :** **URGENT :** ☐
RENS. CLINIQUES : ☐

**Demande de recherche d'auto-anticorps de faible affinité
anti-RACH (anti-Récepteur à l'acétylcholine agrégé)
(myasthénies séronégatives)**

Médecin prescripteur :

Renseignements cliniques :

Tout prélèvement devra être accompagné de renseignements clinicobiologiques et du consentement éclairé du patient

■ **si délai d'acheminement supérieur à 24h, centrifuger et décanter pour conservation du sérum congelé**

- Nature du prélèvement

- ☐ sang veineux sur tube sec (bouchon rouge) ou tube SST (bouchon or)
☐ sérum congelé

- Réalisé pour :

- ☐ test de détection des auto-anticorps anti-RACH de faible affinité

Documents à joindre :

- **Consentement parents/malade**
- **Bon de commande (si hors HCL)**
- **Fiche de données cliniques myasthénie**

Adresse d'envoi du prélèvement : (par transporteur le jour même du prélèvement)

CENTRE DE TRI - CENTRE de BIOLOGIE et PATHOLOGIE EST
(pour le Centre de Biotechnologie Cellulaire – Pr .L. SCHAEFFER et Dr T. SIMONET)
59, Boulevard Pinel - 69500 BRON

Annexe N°1 (B) : Fiche de données cliniques



Hospices Civils de Lyon

**Fiche de données cliniques :
MYASTHENIES SERONEGATIVES**

Dr P.DEVIC (04 78 86 17 91), Dr P.PETIOT, Dr T.SIMONET, Pr L.SCHAEFFER

Nom usuel : _____
Nom de naissance : _____
Prénom : _____
Date de Naissance : _____
Sexe : _____

Médecin référent : _____
Centre préleveur : _____
Téléphone : _____

Date de début des symptômes : _____

MYASTHENIE OCULAIRE : ☐ OUI ☐ NON

MYASTHENIE GENERALISEE :

- Signes oculaires : ☐ OUI ☐ NON
- Signes bulbaires : ☐ OUI ☐ NON
- Signes squelettiques : ☐ OUI ☐ NON
- Osserman : _____ / 100

EMG :

- Décrément aux stimulations répétitives : ☐ OUI ☐ NON ☐ NON FAIT
- Fibre unique : ☐ OUI ☐ NON ☐ NON FAIT

ANTICORPS :

- Anti-RACH : ☐ OUI ☐ NON ☐ NON FAIT
- Anti-MuSK : ☐ OUI ☐ NON ☐ NON FAIT

THYMOME : ☐ OUI ☐ NON

TRAITEMENTS :

- Anticholinestérasiques => efficaces : ☐ OUI ☐ NON ☐ NON FAIT
- Immunosuppresseurs (dont corticoïdes) => efficaces : ☐ OUI ☐ NON ☐ NON FAIT
- Traitements immunosuppresseurs / immunomodulateurs antérieurs :

Annexe N°1 (C) : Consentement éclairé au prélèvement et à la conservation

LABORATOIRE DE BIOLOGIE MEDICALE MULTI SITES du CHU de LYON
CENTRE de BIOLOGIE et PATHOLOGIE EST - 59, boulevard Pinel 69677 BRON Cedex
France
CENTRE DE BIOTECHNOLOGIE CELLULAIRE et BIOTHEQUE
Pr SCHAEFFER
Tel : 04 72 12 96 99 – Fax : 04 72 12 97 10
Dr Isabelle ROUVET – Clémence ESCOFFIER

CONSENTEMENT ECLAIRE

Je, soussigné, (nom des deux parents ou du titulaire de l'autorité parentale si enfant mineur)

☐ **ai donné mon accord pour** la réalisation du (ou des) prélèvements et la production de matériels biologiques dérivés y compris génétiques qui peuvent aider au diagnostic ou à la prévention de la maladie

dont je souffre* / *Je ne souffre pas* : et dont je suis : les parents ou titulaire de l'autorité parentale*/tuteur*/ayant-droit*

(*rayer la mention inutile et compléter la mention nécessaire)

NOM	ou	Étiquette patient
Prénom		
Date de naissance		

Ce(s) prélèvement(s) et ses dérivés ont été et/ou seront conservés sauf contordre de ma part.

Je suis conscient que ce(s) prélèvement(s) peu(ven)t être d'un intérêt potentiel majeur pour la recherche scientifique et aider à la mise au point de solutions thérapeutiques, je

☐ **donne mon accord pour** que ce prélèvement et/ou ses dérivés, non utilisés à visée sanitaire et après anonymisation, soit à la disposition de la communauté scientifique à des fins de recherche scientifique et médicale.

☐ **m'oppose à ce que** ce prélèvement et/ou ses dérivés, non utilisés à visée sanitaire et après anonymisation, soit à la disposition de la communauté scientifique à des fins de recherche scientifique et médicale.

J'ai été informé(e) par :

Je reconnais avoir reçu l'ensemble des informations permettant la compréhension de cet acte biologique et de sa finalité

Je souhaite que les résultats de l'analyse soient transmis au médecin suivant :

Docteur..... A.....

Fait à.....le.....

Signature (s) (des deux parents ou du titulaire de l'autorité parentale, si enfant mineur)

Annexe N°2 : Protocole de recherche d'anticorps anti-RACH de faible affinité

Date	Historique (version)	Rédaction et nature des modifications	Approbation	Validation
17/03/2016	01	S BALLESTA	T SIMONET	I ROUVET
Destinataires : Personnel CBC et Biothèque				

Prise de connaissance du document

[illegible]

Rappels :

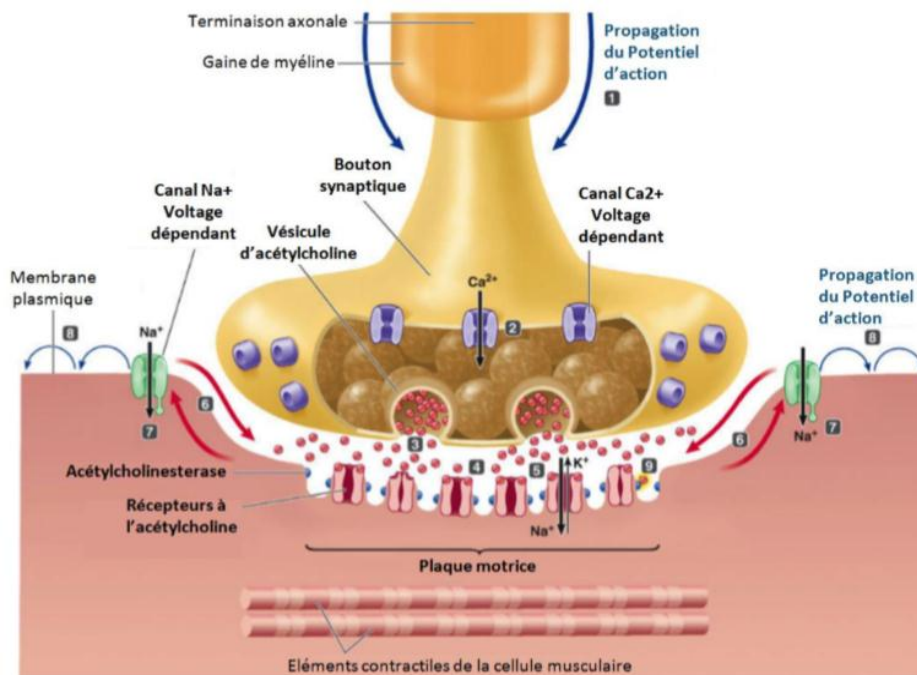
La myasthénie, ou « *myasthenia gravis* », est une maladie auto-immune due à des auto-anticorps spécifiques responsables d'un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire. Ce dysfonctionnement induit une faiblesse et une fatigabilité musculaire anormale chez les patients. Survenant à tout âge, elle affecte surtout des adultes de moins de 40 ans, en majorité des femmes.

Les caractéristiques de l'affection sont : i) début fréquemment oculaire (ptosis ou diplopie) puis une extension à d'autres muscles dans 80 % des cas, ii) aggravation à l'effort, iii) évolution par poussées. La sévérité de la maladie est déterminée en fonction de l'atteinte des muscles respiratoires et des troubles de déglutition (dont la majoration rapide signe la crise myasthénique). On remarque une association à un thymome dans 20 % des cas et à une grande variété de maladies auto-immunes, au premier rang desquelles une dysthyroïdie.

Le diagnostic repose sur le tableau clinique, la réponse aux anticholinestérasiques, la détection d'anticorps spécifiques et la présence d'un décrément à l'EMG.

Environ 80% des patients myasthéniques possèdent des anticorps anti-récepteurs d'acétylcholine (RACH) et 10% des anticorps anti-MuSK détectables en Radio Immuno Assay (RIA). Le présent test en Cell Based Assay cherche à détecter des anticorps-RACH dits « de faible affinité » sensibles à la conformation du récepteur en agrégats membranaires, chez les patients myasthéniques restés séronégatifs à l'issue des deux tests précédents.

Représentation schématique de la JNM et des principales molécules impliquées dans son fonctionnement :



Principe : Méthode en Cell Based Assay avec immunomarquage

Des cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney), préalablement cultivées en plaque, sont transfectées avec un ensemble de plasmides permettant d'exprimer les 4 sous-unités ($2\alpha, \beta, \delta, \epsilon$) du RACH pentamérique, à la membrane des cellules.

Afin de créer une concentration de RACH similaire à celle trouvée à la jonction neuromusculaire, l'expression de la Rapsyne, est ajoutée afin d'« agréger » les récepteurs en clusters à la membrane. La séquence de la Rapsyne a été fusionnée à celle d'un fluorochrome vert (la Green Fluorescent Protein, GFP), pour nous permettre de visualiser les récepteurs agrégés.

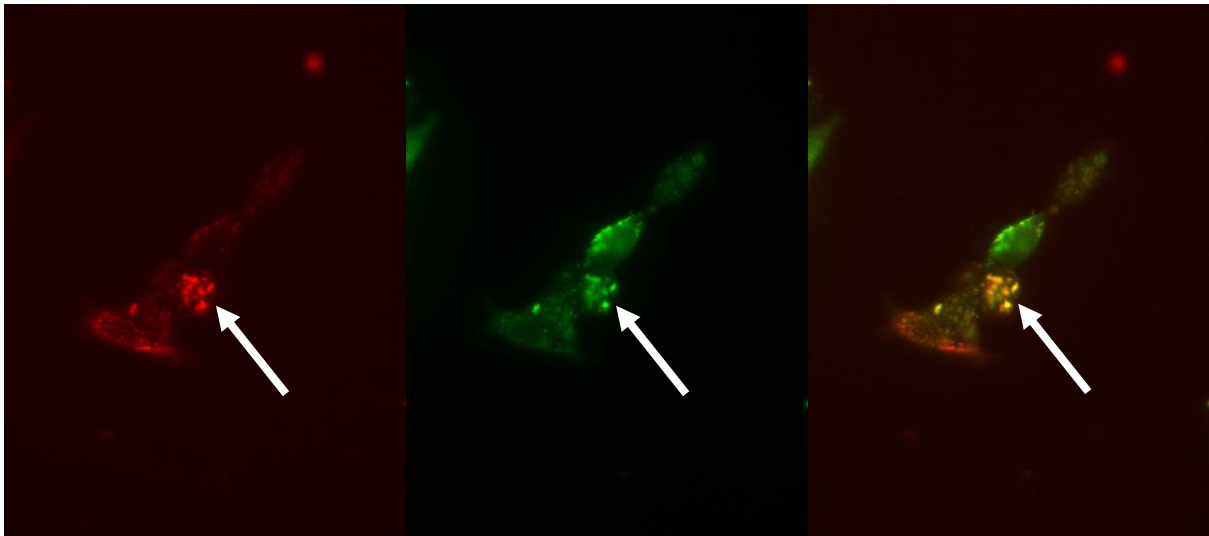
Les cellules transfectées seront ensuite mises en contact avec les sérums de patients dilués. Ces cellules sont alors lavées puis fixées, et incubées avec un anticorps secondaire anti-Immunoglobuline humaine, couplé avec un fluorochrome rouge, afin qu'il se fixe sur les éventuels anticorps anti-RACH.

L'observation d'une co-localisation entre le signal du fluorochrome vert associé aux RACH et le signal rouge associé aux anticorps humains, indiquera la présence d'auto-anticorps anti-RACH dans le sérum du patient.

Note : le fait que les cellules soient vivantes lors de l'incubation avec les sérums, donc non perméabilisées, permet de s'assurer que les anticorps n'aient accès qu'aux protéines membranaires, ce qui diminue le risque de faux négatifs et les problèmes de bruit de fond.

Exemple d'un sérum positif :

- *Image 1 : Signal rouge (présence d'auto-anticorps anti-RACH fixés sur les clusters de récepteur)*
- *Image 2 : Signal vert (transfection des cellules RACH + Rapsyne-GFP = visualisation des clusters de récepteurs)*
- *Image 3 : Co-localisation signal vert + signal rouge*



MATÉRIEL ET RÉACTIFS

▪ 1.1 Matériel

- Pipettes Pasteur pointes ouvertes stériles (cotonnées ou non)
- Pipettes stériles à usage unique de 1, 2, 10, 25 mL
- Pipettes automatiques + cônes stériles
- Plaques 24 puits stériles
- Tubes plastique 15mL et 50 mL
- Flacons T75
- Poire, pompe à vide, boîte à déchets
- Cellule de Malassez + Lamelle
- Hotte à flux laminaire
- Hotte chimique
- Incubateur enrichi en CO₂ et thermostaté à 37°C
- Microscope à objectif inversé
- Microscope à objectif inversé à fluorescence

▪ 1.2 Réactifs

- Milieu DMEM (LONZA Référence : BE12-604F)
- Sérum de Veau Fœtal (SVF HyCLONE Référence : SV30160-3)
- Pénicilline-streptomycine (LONZA Référence : DE17-602 E)
- PBS 1X Without Ca & Mg (Phosphate Buffer Saline LONZA Référence: BE17-512F)
- Trypsine (LONZA Référence: BE17-160 E)
- Chlorure de calcium CaCl₂ (CARLO ERBA REAGENT Référence : 433407)
- HEPES (SIGMA ALDRICH CHIMIE Référence : H0887-20ML)
- Chlorure de sodium NaCl (CARLO ERBA REAGENT Référence : 479687)
- Phosphate de sodium dibasique Na₂HPO₄ (SIGMA ALDRICH CHIMIE Référence : S3264-500G)
- Paraformaldéhyde PFA 4% (SIGMA ALDRICH CHIMIE Référence : F8775-25ML)
- Glycine 0,1M (SIGMA Référence : G7126-500G)
- Sérum Albumine Bovine BSA (SIGMA Référence : A9647-50G)
- Triton 0,1% (SIGMA Référence : T9284-100ML)

▪ 1.3 Cellules / Anticorps primaires / Anticorps secondaires :

- Cellules HEK 293T (Human Embryonic Kidney cells)
- Plasmides pour transfection : RCh + Rapsyne-GFP ; Rapsyne-GFP
- Anticorps secondaire : Rhodamine Red-X Goat Anti-Human IgG (Jackson Immuno-Research Laboratories Référence : 109-295-003)
- DAPI Marqueur Nucléaire (SIGMA Référence : D9452-10MG)

MODE OPERATOIRE

▪ 2.1 Ensemencement des cellules (J1 LUNDI)

- 2.1.1 Étape pré-analytique

- J-3 (Minimum) : Décongélation des cellules HEK 293T.
Décongélation rapide à 37°C. Mettre la totalité du cryotube (soit environ 2 millions de cellules) dans un tube plastique avec 10mL de milieu DMEM-10% : centrifuger 10mn à 500g. Éliminer le surnageant, récupérer le culot avec 1mL de milieu et le placer dans une flasque T75 avec 16mL de DMEM-10%. Incuber jusqu'au lendemain à 37°C/5% CO₂.
- J0 : Sortir du réfrigérateur le milieu DMEM-10%, la trypsine diluée au 1/10 et le PBS 1X environ 1 heure avant manipulation pour qu'ils reviennent à température ambiante. Vérifier au microscope les cellules HEK 293T : confluence, état des cellules.

NB : La confluence et l'aspect des cellules en culture avant l'ensemencement sont des critères essentiels au bon fonctionnement de la méthode. Les cellules ne doivent pas être trop confluentes (environ 75% le jour de l'ensemencement) et doivent avoir un aspect « en étoile ».

- 2.1.2 Préparation des plaques 24 puits

Travailler sous la hotte à flux laminaire verticale avec les précautions d'usage.
Identifier chaque boîte avec la date du jour et le nombre de cellules ensemencées. Le nombre de boîte 24 puits est à déterminer en fonction du nombre de patients que l'on veut tester.

- 2.1.3 Ensemencement

Travailler sous la hotte à flux laminaire avec les précautions d'usage.

- Préparation de la suspension cellulaire :

Aspirer le milieu de culture à l'aide d'une pipette stérile branchée sur la pompe à vide.

Effectuer 2 rinçages avec 5 mL de PBS 1X.

Ajouter 1,5 mL de trypsine (préalablement diluée au 1/10ème)

Placer le flacon environ 5 minutes à 37°C/5% CO₂.

Suivre le décollement au microscope et aider celui-ci en tapant fortement le côté du flacon fermé avec le plat de la main.

Arrêter l'action de la trypsine par 10 mL de milieu DMEM-10%. Remettre les cellules en suspension par aspiration – refoulement avec une pipette pasteur pointe ouverte stérile cotonnée.

- Numération cellulaire :

Avec une cellule de Malassez :

Nettoyer la cellule à l'alcool iodé. Préparer la cellule avec une lamelle de verre. Déposer une goutte de suspension cellulaire (préalablement homogénéisée par aspiration – refoulement) à l'aide d'une pipette cotonnée stérile. Faire la numération au microscope, puis calculer le nombre de cellules/mL d'après la formule suivante:

$$N = C \times 1000 \text{ ou } N = c \times 10 \times 1000$$

N : Nombre total de cellules/mL

C : Nombre de cellules comptées sur toute la cellule (10 bandes).

c : Nombre de cellules comptées sur une bande (dans le cas d'un nombre de cellules trop important).

- Ensemencement des plaques 24 puits :

15 000 cellules dans un volume final de **0,5mL** de DMEM-10% **par puits** :

Préparer le volume total de mix « milieu + cellules » à répartir sur les plaques, et déposer 0,5mL de cette suspension délicatement au centre de chaque puits à la pipette automatique, en homogénéisant la suspension avant chaque dépôt.

Exemple :

- 1 plaque à ensemerer soit 24 puits
- 420 000 cellules/mL au comptage dans la suspension
- $15000/420000 = 35,7\mu\text{L}$ de suspension cellulaire à mettre par puits
- Volume final à distribuer = 12mL (24 x 0,5mL)
- $35,7\mu\text{L}$ (suspension) x 24 (puits) = 857μL (suspension)
- Mix final à répartir = 857 μL de suspensions cellulaire dans 11,14 mL de DMEM-10%
- Distribution de 0,5mL par puits du mix final

INCUBER 24H à 37°C/5% CO₂.

- 2.1.4 Remise en culture cellule HEK 293T

Après la mise en plaque, remettre en culture la souche HEK 293T, en cas d'échec de la manipulation en cours ou en vue d'une manipulation ultérieure, dans 2 flacons T75 : 1 dilution au 1/100^{ème} et 1 dilution au 1/200^{ème} (cela permettra de choisir le flacon dont le tapis cellulaire n'est pas trop confluent).

- Inscrire sur les flacons le numéro de la souche, le nom de la souche, le stade de repiquage, la date, le numéro du milieu utilisé, la dilution (1/100^{ème} ou 1/200^{ème}).
- Mettre 16mL de milieu DMEM 10%-SVF dans chacun des flacons.
- Remettre les cellules en suspension en aspirant et refoulant plusieurs fois le milieu avec une pipette cotonnée stérile.
- Aspirer le volume souhaité de suspension cellulaire en fonction de la dilution à l'aide d'une pipette automatique, et le transférer dans le flacon T75.
- Mettre à l'étuve dans le box d'origine, à 37°C/5%CO₂

▪ 2.2 Transfection des cellules HEK 293T (J2 MARDI)

L'introduction du matériel génétique exogène dans les cellules est réalisée à l'aide d'une transfection par chlorure de calcium.

$(\text{CaCl}_2 + \text{ADN}) + 2\text{XHeBS} \Rightarrow$ précipité de phosphate de calcium liant l'ADN à sa surface.

- 2.2.1 Les plasmides

Transfecter les cellules avec 2 plasmides différents :

- **RR** : RCh + Rapsyne-GFP [concentration] = **0,6µg/µL** composé de :

Sous-unité	Quantité	Concentration
$\alpha 1$	2	0,2µg/µL
$\beta 1$	1	0,1µg/µL
δ	1	0,1µg/µL
ϵ	1	0,1µg/µL
Rapsyne-GFP	1	0,1µg/µL
[c] finale		0,6µg/µL

- **RG** : Rapsyne-GFP [concentration] = **0,25µg/µL** (contrôle négatif)

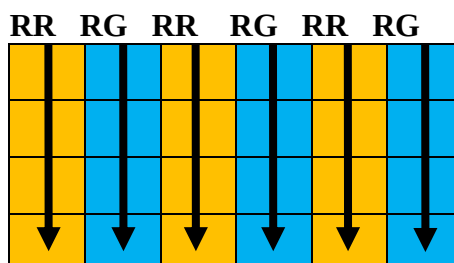
**-GFP : couplée avec une protéine verte fluorescente (Green Fluorescent Protein)*

- 2.2.2 Préparation des Mixs

Base par puits : - 25µL de CaCl_2

- 1µL de plasmide (soit 0,6µg pour RR et 0,25µg pour RG)
- 25µL d'HeBS doublement concentré (2XHeBS)

Exemple pour une plaque 24 puits :



- Mix à préparer pour chaque plasmide = 50µL x 12 puits = 600µL
- Dans un tube plastique, déposer 300µL de CaCl_2 à l'aide d'une pipette automatique
- Déposer ensuite 12µL de plasmide « **RR** : RCh + (Rapsyne-GFP) » : VORTEXER

- Enfin, déposer 300µL de 2XHeBS **goutte à goutte sous VORTEX**, en comptant 2 secondes entre chaque goutte
- Dans un autre tube, répéter l'opération pour l'autre plasmide « **RG** : Rapsyne-GFP »

INCUBER 1H à température ambiante (formation des précipités).

- 2.2.3 Dépôt des Mixs d'ADN

Après homogénéisation, à l'aide d'une pipette automatique, déposer **50µL** par puits de chaque mix sur 12 des puits de la plaque (en fonction du plan de plaque), **directement dans le milieu.**

INCUBER 48H à 37°C/5%CO₂.

▪ 2.3 Immunomarquage et Fixation (J4 JEUDI)

- 2.3.1 Anticorps primaires = Dilution et dépôt des sérums patient

Sérums patients ainsi que Sérum CONTROLE + (fort) et Sérum CONTROLE + (faible) (sérums de patients connus comme positif) :

Les sérums sont utilisés à une dilution au **1/20^{ème}**. Après aspiration du contenu des puits déposer 200µL exactement par puits de DMEM-10% puis 10µL exactement de sérum patient par puits (2 puits par patient 1« **RR** » et 1« **RG** »)

Exemple pour une plaque 24 puits :* Remarque : SER = SERUM PATIENT

RR	RG	RR	RG	RR	RG
C+	C+	SER4	SER4	SER8	SER8
SER1	SER1	SER5	SER5	SER9	SER9
SER2	SER2	SER6	SER6	SER10	SER10
SER3	SER3	SER7	SER7	C+ faible	C+ faible

INCUBER 1H à température ambiante à l'abri de la lumière (papier aluminium)

- 2.3.2 Fixation des cellules

- **Lavages** : Effectuer trois lavages avec du PBS:

Aspirer délicatement le milieu à l'aide d'une pipette stérile, ligne par ligne.

Déposer tout aussi délicatement environ 250µL de PBS

Répéter l'opération pour toutes les lignes de la plaque, le tout, 3 fois

- Fixation :

Déposer environ 250µL de PFA 4% (paraformaldéhyde dilué à 4% dans du PBS)

Incuber 10mn à température ambiante à l'abri de la lumière

Effectuer un lavage comme décrit précédemment avec du PBS

Effectuer un deuxième lavage avec une solution de PBS + Glycine 0,1M (diluée à 0,1M dans du PBS)

Incuber 5mn à température ambiante à l'abri de la lumière

Effectuer un troisième et dernier lavage dans une solution de PBS +Triton 0,1%+BSA1% (dilués à 0,1M dans du PBS)

Incuber 30mn à température ambiante à l'abri de la lumière

- 2.3.3 Anticorps Secondaire

L'anticorps secondaire est à diluer dans une solution de PBS + Triton0,1% + BSA1%

- Anticorps secondaire : Anticorps de chèvre anti-IgG humain : Dilution au 1/750^{ème}

Déposer cette solution à raison de 250µL par puits.

INCUBER SUR LA NUIT à +4°C à l'abri de la lumière (papier aluminium)

2.4 DAPI (J5 VENDREDI)

Le marqueur nucléaire est à diluer dans une solution de PBS + Triton0,1% + BSA1%

- DAPI : marqueur nucléaire bleu : Dilution au 1/1000^{ème}

Déposer cette solution à raison de 250µL par puits.

INCUBER 10mn à température ambiante à l'abri de la lumière (papier aluminium)

2.5 Lavage des plaques (J5 VENDREDI)

-Effectuer trois lavages avec une solution de PBS 1X + Triton0,1% :

Aspirer délicatement le milieu à l'aide d'une pipette stérile, ligne par ligne.

Déposer tout aussi délicatement environ 0,5mL de PBS 1X + Triton0,1%

Répéter l'opération 3 fois pour toutes les lignes de la plaque

2.6 Lecture (J5 ou jusqu'à max J19)

Laisser les cellules immergées dans le dernier lavage avec la solution de PBS 1X + Triton0,1% (500µL) afin de pouvoir conserver les plaques (maximum 2 semaines à +4°C à l'abri de la lumière). Elles seront observées au microscope à fluorescence inversé dans ce délai.

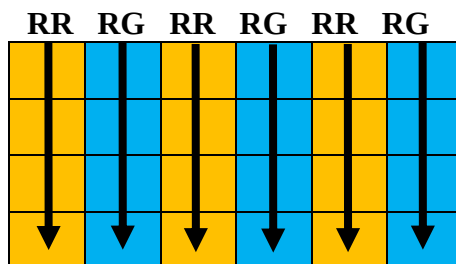
TECHNIQUE SIMPLIFIEE

Jour 1 (LUNDI) : Ensemencement des cellules HEK 293T

- Choisir 1T75 avec un tapis cellulaire optimal (75% de confluence)
- Lavage au PBS 5mL
- Décoller les cellules avec 1,5mL de Trypsine, incubé 5mn à 37°C
- Arrêt de la trypsine avec 10mL de DMEM-10%, remise en suspension des cellules
- Numérer la souche
- Ensemencer la/les plaque(s) : 15 000 cellules/puits, VF=0,5mL/puits DMEM-10%
- Remettre en culture 2T75 (à partir de la suspension) VF = 16mL DMEM-10% :
 - 1T75 Dilution au 1/100ème
 - 1T75 Dilution au 1/200^{ème}
- Incuber les plaques et les T75 à 37°C/ 5%CO₂

Jour 2 (MARDI) : Transfection

- Transfection avec 2 plasmides différents :
 - **RR** : RACH + (Rapsyne-GFP) [concentration] = 0,6µg/µL
 - **RG** : Rapsyne-GFP [concentration] = 0,25µg/µL
- Base par puits : 25µL CaCl₂
 - + 1µL Plasmide => VORTEXER
 - + 25µL 2XHeBS => GOUTTE à GOUTTE sous VORTEX
- Ajuster la quantité des mixs à préparer en fonction du nombre de plaque et donc du nombre de puits à transfecter. Exemple :



- Incuber les mixs 1H à T°C ambiante (formation des précipités)
- Déposer les mixs (50µL par puits) en fonction du plan de plaque
- Incuber les plaques 48H à 37°C/5%CO₂ à l'abri de la lumière

Jour 4 (JEUDI) : Immunomarquage + Fixation

Sérums

- Déposer les sérums patients et les sérums CONTRÔLE (dilution **1/20^{ème}**) : dépôt de 200µL / puits de DMEM-10% + 10µL / puits de sérum dans chaque puits (1« **RR** » et 1« **RG** »)
- Exemple :

RR	RG	RR	RG	RR	RG
C+	C+	SER4	SER4	SER8	SER8
SER1	SER1	SER5	SER5	SER9	SER9
SER2	SER2	SER6	SER6	SER10	SER10
SER3	SER3	SER7	SER7	C+ faible	C+ faible

- Incuber les plaques 1H à T°C ambiante à l'abri de la lumière

Fixation

- 3 lavages au PBS, ligne par ligne, délicatement
- Fixer les cellules avec 250µL/puits de PFA 4% : Incuber **10mn** T°C ambiante
- 1 lavage PBS
- 1 lavage PBS + Glycine 0,1M : Incuber **5mn** T°C ambiante
- 1 lavage PBS + Triton 0,1% + BSA 1% : Incuber **30mn** T°C ambiante

Ac secondaire

- Diluer Ac2 (Ac de chèvre anti-IgG humain) au **1/750^{ème}** dans une solution de PBS + Triton 0,1% + BSA 1%
- Déposer 250µL/puits de cette solution
- Incuber les plaques SUR LA NUIT à +4°C à l'abri de la lumière

Jour 5 (VENDREDI) : DAPI + Lavages + Lecture

- Diluer le DAPI (marqueur nucléaire) au **1/1000^{ème}** dans une solution de PBS + Triton 0,1% + BSA 1%
- Déposer 250µL/puits de cette solution
- Incuber **10mn** à T°C ambiante à l'abri de la lumière
- 3 lavages au PBS + Triton 0,1%, ligne par ligne, délicatement
- Laisser les cellules immergées dans 0,5mL de tampon du dernier lavage
- Les plaques peuvent être conservées ainsi maximum 2 semaines à +4°C à l'abri de la lumière
- Observation + rendu de résultats sur microscope à fluorescence inversé

Annexe N°3 : Dossier de validation de méthode

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9 du document Cofrac SH GTA 04rev 01 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale***

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE

Identification du paramètre (comme identifié dans la liste détaillée des examens) :
Auto-Anticorps Anti-Récepteur d'Acétylcholine (RACH) de faible affinité

Processus simple ☒ ; Processus complexe ☐ (nombre de sous-processus : ...)

DESCRIPTION DU PROCESSUS

Analyse réalisée à partir du sérum issu de sang total centrifugé	Éléments à vérifier (argumentation)	Modalités de vérification/validation ¹ : ☐ 1. Répétabilité ☐ 2. Fidélité intermédiaire ☒ 3. Variabilité inter-opérateurs ☐ 4. Justesse ☐ 5. Exactitude ☒ 6. Sensibilité et spécificité analytique ☐ 7. Incertitudes ☒ 8. Étendue de mesure ☒ 9. Comparaison de méthodes ☒ 10. Interférences ☒ 11. Contamination ☒ 12. Robustesse et fiabilité des réactifs ☒ 13. Intervalle de référence
--	-------------------------------------	---

Pour chaque étape, le laboratoire procèdera à la vérification / validation des items attendus, et dupliquera autant que de besoin les pages 2 à 8 (évaluation des performances de la méthode) du présent document. Si un autre élément du processus lui semble critique, il devra vérifier / valider cette étape et le préciser dans la conclusion argumentée. C'est cette vérification qui lui permettra de maîtriser ce point critique.

Argumentaire (le cas échéant) :

¹ Note : Pour la vérification/validation de méthodes quantitatives, le renseignement des items 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu a minima. Pour la vérification/validation de méthodes qualitatives, le renseignement des items 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12 et 13 est attendu, à minima.

Le types de vérification (bibliographique ou essais) est à indiquer.

L'absence d'applicabilité de certains items (NA) doit être justifiée dans le corps du document.

SOUS-PROCESSUS 1	
Portée A ☐ ; Portée B ☒ (à justifier)	

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte / Mesurande :	Auto-anticorps anti-récepteur d'acétylcholine (RACH) de faible affinité
Principe de la Méthode :	Méthode de type : Qualitatif – Principe d'immuno-marquage sur cellules en culture
Type d'échantillon primaire :	Sang total
Type de récipient, additifs :	Tubes secs (avec ou sans gel séparateur)
Prétraitement de l'échantillon :	Centrifugation et aliquotage du sérum
Unités :	Positif / Négatif (Lecture de la présence des IgG du sérum par le biais de l'émission fluorescente)
Critères d'interprétation ² :	NA
Marquage CE (Oui/Non) :	NON
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Équipement (instrument, analyseur, etc.) :	Analyse : - Manuelle – Lecture des résultats sur microscope à fluorescence inversé NIKON TE20000-U (N° SERIE : 596254 et N° BIOMED : 20061102401) pour la lecture des résultats - Caméra couleur SONY SSC-M388CE Intermédiaire : - Centrifugeuse Thermo Haereus modèle MULTIFUGE 1S pour le traitement de l'échantillon primaire - Hotte PSM Herasafe Thermo type KS12 - Hotte chimique : FASTER CHEMFREE 8000 (N° SERIE : 295 et N° BIOMED : 20061176000) - Incubateur 37°C/5%CO2 : SANYO MCO-18AIC (N° SERIE : 12030101 et N° BIOMED : 201268974) - Congélateur -80°C (pour la conservation des échantillons) : HERAUS HFU1785TOP (N° SERIE : X220-273254-XO et N° BIOMED : 20047264000) Informatique : - Logiciel d'acquisition des photos LEICA NIS F 2.21 - Logiciel ImageJ pour le traitement des images - Logiciel GLIMS (commun HCL)

² Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

Référence du réactif :	Réactif	Fournisseur	Référence fournisseur	Remarque
	Milieu DMEM	LONZA	BE12-604F	4,5g/L glucose with L-Glutamine
	Sérum de Veau Fœtal (SVF)	HyClone	SV30160-03	-
	Pénicilline/Streptomycine	LONZA	DE17-602E	10'000U/mL Stérile
	PBS 0,0095M	LONZA	BE17-512F	Without Ca and Mg
	Trypsine	LONZA	BE17-160E	10X Stérile
	HCL	SIGMA	H9892-500ML	-
	Chlorure de Calcium (CaCl ₂)	CARLO ERBA REAGENT	433407	Poudre
	HEPES	SIGMA ALDRICH CHIMIE	H0887-20ML	Solution 1M
	Chlorure de Sodium (NaCl)	CARLO ERBA REAGENT	479687	Poudre
	Phosphate de Sodium Dibasique (Na ₂ HPO ₄)	SIGMA ALDRICH CHIMIE	S3264-500G	Poudre
	Paraformaldéhyde (PFA)	SIGMA ALDRICH CHIMIE	F8775-25ML	-
	Glycine	SIGMA	G7126-500G	-
	Sérum Albumine Bovine (BSA)	SIGMA	A9647-50G	-
	Triton	SIGMA	T9284-100ML	100X BioXtra
	Rhodamine Red-X Goat Anti-Human IgG	Jackson-Immuno-Research Laboratories	109-295-003	Affini Pure (H+L)
	DAPI	SIGMA	D9452-10MG	-
Matériau d'étalonnage :		NA		
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :		NA		

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) qualifié(s) et reconnu(s) compétent(s) ayant réalisé la vérification/validation de méthode :	Thomas SIMONET (Biologiste) Samantha BALLESTA (Technicienne)
Procédure de validation :	MU-ANA-DE-001-01 LBMMS - SH FORM43 : VALIDATION / VERIFICATION DE METHODE QUANTITATIVE MU-ANA-PG-001-02 LBMMS : PROCEDURE GENERALE DE VALIDATION / VERIFICATION DES METHODES MU-ANA-PG-004-01 LBMMS : PROCEDURE DE VALIDATION DES METHODES QUALITATIVES
Procédure de gestion de la portée flexible :	MU-ANA-PG-003-03 - LBMMS : PROCEDURE DE GESTION DE LA PORTEE D'ACCREDITATION « A11 - Portée B »
Période d'étude :	du : 31/08/2015 au 02/09/2016
Date de 1 ^{ère} utilisation :	05/09/2016

MAITRISE DES RISQUES :

➤ Analyse de risque de la phase « Pré-Analytique » :

ETAPES Pré-analytique	5M	Points critiques à maîtriser	Gravité	Fréquence	Détection	Indice Critique	Modalité de maîtrise du/des risque(s)
Prélèvement	Main d'œuvre	Réalisation du prélèvement	10	1	1	10	Manuel de prélèvement du LBMMS (MU-PréA-PG-003-02), formation et information des préleveurs
	Matière	Prélèvement = sang	6	3	1	18	Manuel de prélèvement du LBMMS (MU-PréA-PG-003-02), formation et information des préleveurs
	Milieu	Conditions de stockage	1	3	3	9	Manuel de prélèvement du LBMMS (MU-PréA-PG-003-02), formation et information des préleveurs
	Méthode	Procédure	3	3	6	54	Catalogue des analyses, manuel de prélèvement, formation et information des préleveurs, Biobook
	Matériel	Aiguilles, seringues, tubes (état et type)	3	3	1	9	Biobook, pharmacie, manuel de prélèvement, formation et information des préleveurs
Transport des prélèvements	Main d'œuvre	Transport des prélèvements	6	3	3	54	Contrat avec un transporteur habilité au transport "d'échantillons biologiques" et assurant la traçabilité de la livraison et de la température + Gestion des non-conformités (RTE : MU-SMQ-PG-001-04 CBC : M3-P1-I2)
	Milieu	Conditions de transport	3	3	10	90	Procédure "Conditions de transport des prélèvements pour analyse sérologique" + Contrat avec le transporteur + Gestion des non-conformités (RTE : MU-SMQ-PG-001-04 CBC : M3-P1-I2) (Délai et température de transport)
	Méthode	Conditions de transport	3	3	6	54	Contrat avec le transporteur + Fiche de suivi des prélèvements + Bon de transport
	Matériel	Utilisation d'outils de transport	1	1	6	6	Formation et information des chauffeurs, notices d'utilisation
Réception / Enregistrement des prélèvements	Main d'œuvre	Réception et Enregistrement	6	6	1	36	Formation et habilitation du personnel RTE : MU-RH-DE-052-01 CBC secrétariat (instruction d'enregistrement des prélèvements) : R1-P2-I1 + HABILITATION

	Matière	Intégrité du prélèvement, état du sang	6	1	6	36	Formation et habilitation du personnel RTE : MU-RH-DE-052-01 CBC secrétariat (instruction d'enregistrement des prélèvements) : R1-P2-I1 + HABILITATION
	Milieu	Conservation entre 2-8°C,	3	3	6	54	Suivi des températures de stockage
	Méthode	Conformité des prélèvements	3	3	3	27	Critères d'acceptation des prélèvements connus = Gestion des non conformités (RTE : MU-SMQ-PG-001-04 CBC : M3-P1-I2) ; Pré-analytique contrôle des prélèvements MU-PréA-IT-022-01
		Enregistrement et étiquetage	1	10	1	10	Formation et habilitation du personnel RTE : MU-RH-DE-052-01 CBC secrétariat (instruction d'enregistrement des prélèvements) : R1-P2-I1 + HABILITATION
		Conformité du bon de commande	1	10	1	10	Critères d'acceptation des prélèvements connus = Gestion des non conformités (RTE : MU-SMQ-PG-001-04 CBC : M3-P1-I2) ; Pré-analytique contrôle des prélèvements MU-PréA-IT-022-01
	Matériel	Équipement informatique	3	10	1	30	Tests de connexion
Centrifugation + Aliquotage	Main d'œuvre	Réalisation de la centrifugation des prélèvements et aliquotage	6	1	3	18	Habilitation des techniciens S1-P1-ST2 ; Procédure de valorisation des prélèvements et stockage des échantillons : R3-P1
	Matière	Sang puis sérum	6	1	3	18	Observation état ; Habilitation des techniciens S1-P1-ST2 ; Procédure de valorisation des prélèvements et stockage des échantillons : R3-P1
	Milieu	Conditions de réalisation	6	1	1	6	Formation travail sous hotte en zone stérile (instruction de travail en salle blanche S4-P1-I4), suivi des températures et des pressions
	Méthode	Centrifugation et aliquotage	6	1	3	18	Habilitation des techniciens S1-P1-ST2 ; Procédure de valorisation des prélèvements et stockage des échantillons : R3-P1
	Matériel	Centrifugeuse et hotte à flux laminaire	6	1	1	6	Suivi et maintenance des équipements (Procédure de maintenance et de suivi des équipements critiques S2-P1)

➤ Analyse de risque de la phase « Analytique » :

ETAPES Analytique	5M	Points critiques à maîtriser	Gravité	Fréquence	Détection	Indice Critique	Modalité de maîtrise du/des risque(s)
Réalisation du test	Main d'œuvre	Réalisation d'une méthode d'immuno-marquage sur cellules en culture, lecture de résultats, validation technique	10	3	1	30	Habilitations des techniciens pour cette technique + Fiche de suivi des habilitations et formations : S1-P1-ST3 Tableau des habilitations et matrice de responsabilité : S1-P1-ST2 + utilisation d'au moins un sérum de patient positif à chaque passage comme contrôle positif
	Matière	État de l'échantillon de sérum : non hémolysé, non contaminé, non lipémique	6	1	3	18	Habilitation des techniciens
		Plasmides pour transfection	6	3	1	18	Contrôle de production, utilisation de la bonne concentration, suivi des températures de stockage
		Cellules HEK 293T	6	3	1	18	Habilitation des techniciens à la décongélation et au repiquage des cellules adhérentes Procédures : R3-P1-I1-21 + R3-P1-I1-27
		Anticorps secondaires : Rhodamine Red-X Goat Anti-Human IgG (H+L) (Jackson-Immuno-Research Laboratories)	6	3	1	18	Suivi des lots fournisseur, et suivi des recommandations d'utilisation et de stockage + utilisation d'au moins un sérum de patient positif à chaque passage comme contrôle positif
		Marqueur nucléaire DAPI (Sigma)	6	3	1	18	Suivi des lots fournisseur, et suivi des recommandations d'utilisation et de stockage
	Milieu	Conditions ambiantes : réactifs entre 20-25°C, pression constante au moment de l'utilisation	3	3	1	9	Relevés et suivi des températures du laboratoire et des pressions des pièces

		Conditions de stockage : entre 2-8°C pour milieu de culture ; PBS ; Trypsine ; Tampons en solution	6	3	1	18	Gestion des équipements non critiques
		Conditions de stockage : entre 20-25°C pour Glycine en poudre ; Triton non dilué	6	3	1	18	Relevés et suivi des températures du laboratoire et des pressions des pièces
		Conditions de stockage : -20°C pour PFA 4% ; Anticorps secondaire repris et aliquoté ; Plasmides	6	3	1	18	Gestion des équipements non critiques
		Conditions de stockage : -80°C pour les sérums patients	6	3	1	18	Relevés et suivi des températures de stockage
	Méthode	Gestion documentaire (procédures)	3	1	3	9	Maîtrise du système documentaire (Kalilab)
		Validation initiale de la méthode	3	3	3	27	Dossier de validation de méthode
		Suivi des performances de la méthode	6	3	3	54	Utilisation d'au moins un sérum de patient positif à chaque passage comme contrôle positif (Pas de CQI)
		Validation technique et saisi des résultats	10	3	1	30	Définition des critères de validation technique et procédures
	Matériel	Maintenance des équipements (hottes, incubateurs, frigo, congel, pipettes)	6	1	3	18	Fiches de vie, gestion des alarmes...
		Microscope à fluorescence	6	1	3	18	Gestion des équipements ; Entretien et changement lampe
		Logiciel traitement d'image	6	3	1	18	Test connexion, formation

➤ Analyse de risque de la phase « Post-Analytique » :

ETAPES Post-analytique	5M	Points critiques à maîtriser	Gravité	Fréquence	Détection	Indice Critique	Modalité de maîtrise du/des risque(s)
Validation	Main d'œuvre	Validation des résultats	10	1	3	30	Procédure de validation biologique des résultats MU-PostA-PG-002-02 et MU-PostA-PG-001-03 , formation continue, double lecture en aveugle des résultats
	Matière	Feuille de résultats	10	1	3	30	Procédure de validation biologique des résultats MU-PostA-PG-002-02 et MU-PostA-PG-001-03 , formation continue, double lecture en aveugle des résultats
	Milieu	NA	X	X	X	X	NA
	Méthode	Logiciels de validation des résultats et saisie (GLIMS)	6	3	3	54	Double lecture des résultats + Procédure et habilitation à la maîtrise des logiciels +Compte rendu résultats
	Matériel	Équipement informatique	3	6	1	18	Tests de connexion, SIL
Conservation des prélèvements	Main d'œuvre	Gestion de la sérothèque	1	3	1	3	Habilitation des techniciens + Procédures : R3-P1-I3
	Matière	Sérums	1	1	1	1	Conditions de conservation des sérums patients
	Milieu	Conditions de stockage des sérums : -80°C	6	3	1	18	Suivi des températures de stockage
	Méthode	Congélation des prélèvements	1	1	1	1	Habilitation des techniciens + Procédure : R3-P1-I3
	Matériel	Congélateur - 80°C : Panne congélateur ou électrique	6	1	1	6	Maintenance des équipements, fiche de vie, gestion des alarmes, congélateur de secours, circuit électrique de secours
Élimination des déchets	Main d'œuvre	Personnel compétent	10	1	6	60	Formation à la gestion et à l'élimination des déchets de type DASRI (fûts, sacs, et poubelles spéciaux), chimiques (hotte chimique + bidons spéciaux), et courants
	Matière	Déchets DASRI, chimiques et courants	6	3	3	54	Procédure et habilitation à la gestion des déchets : S4-P1-I2
	Milieu	NA	X	X	X	X	NA
	Méthode	Procédures	3	3	6	54	Procédure et habilitation à la gestion des déchets : S4-P1-I2
	Matériel	DASRI, chimiques et courants	6	3	1	18	Procédure et habilitation à la gestion des déchets : S4-P1-I2

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) : Sérums patients positifs et négatifs

REPETABILITE Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒							
Échantillons	Nombre de valeurs(N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ³)	Conclusion ⁴
Sérums	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Argumentaire de la conclusion : **NON APPLICABLE : Analyse QUALITATIVE (positif / négatif). Néanmoins, de nombreuses images ont été analysées : au minimum 100 cellules comptées par champs et trois champs par puits. La méthode est considérée comme répétable dans la mesure où deux sérums positifs ont été utilisés pour les vérifications expérimentales liées à la validation de méthode et ces derniers se sont avérés positifs de la même manière à chaque fois. De plus, deux autres sérums sont utilisés à titre de contrôle positif à chaque passage pour les tests en routine, et ont été trouvés positifs à chaque essai.**

FIDELITE INTERMEDIAIRE Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒							
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Moyenne	Écart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) retenu par le laboratoire (cf. source ⁴)	Conclusion ⁵
Sérums	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Argumentaire de la conclusion : **NON APPLICABLE : Analyse QUALITATIVE**

VARIABILITE INTER-OPERATEURS Applicable ☒ ; non applicable ☐	
Opérateur évalué 1 : SIMONET Thomas	Essai sur site – Cette méthode varie peu, on accepte donc lors de ces essais un maximum de 5% de discordance. Pour cela on passe sur une plaque 2 sérums positifs (on utilisera des sérums de patients séropositifs) et 2 sérums négatifs (on utilisera des sérums de patients sains), et ce par 2 opérateurs différents. Ce test sera réalisé 3 fois de manière distincte.
Opérateur évalué 2 : BALLESTA Samantha	

Argumentaire de la conclusion : **D'après les résultats issus des trois tests distincts réalisés en doublon avec deux sérums connus comme étant positifs et deux sérums négatifs, on peut dire que la méthode est conforme aux exigences du laboratoire. En effet, le seuil maximum de discordance était fixé à 5%. Aucune variation inter-opérateur n'a été détectée puisque les résultats des dosages sont identiques pour les deux opérateurs soit 0% de discordance : les six sérums positifs sont retrouvés positifs pour chaque opérateur, il en va de même pour les négatifs.**

³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

⁴ Conforme/non conforme

JUSTESSE (à partir des CIQ externalisés) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒								
Échantillons	Nombre de valeurs (N)	Valeurs Labo	Cible (groupe de paires)	Biais (%) /groupe de paires	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) Limite ⁴	Conclusion ⁵
Échantillon CIQ niveau 1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Échantillon CIQ niveau 2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Argumentaire de la conclusion : **NON APPLICABLE : Analyse QUALITATIVE. De plus, la justesse ne peut être étudiée car il n'existe aucun CIQ externalisé.**

EXACTITUDE (à partir des contrôles externes ponctuels : EEQ/CNQ) Contrôles quantitatifs ☐ ; Contrôles qualitatifs ☒							
Échantillons	Valeur Labo	Cible (groupe de paires)	Cible (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de paires	Biais (%) /toute technique	Biais (%) limite ⁴	Conclusion ⁵
NA	NA	NA	NA	A renseigner pour les contrôles quantitatifs			NA

Argumentaire de la conclusion : **NON APPLICABLE : Analyse QUALITATIVE. De plus, l'exactitude ne peut être étudiée car il n'existe aucun EEQ/CNQ externalisé.**

SENSIBILITE et SPECIFICITE ANALYTIQUE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Vrais positifs	Spécificité, sensibilité, VPN, VPP
Faux positifs	
Vrais négatifs	
Faux négatifs	

Argumentaire de la conclusion : **La sensibilité est définie comme étant la probabilité qu'un test donne un résultat positif en présence de la caractéristique cible, en d'autres termes cela revient à avoir le moins de faux négatifs. La spécificité analytique, quant à elle, démontre la capacité du test à fournir un résultat négatif en l'absence de la caractéristique cible, autrement dit avoir le moins de faux positifs. Dans notre cas, en l'absence de méthode de référence permettant de détecter des anticorps anti-RACH de faible affinité et de contrôles qualité, ce point ne peut être évalué.**

INCERTITUDE DE MESURE (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) : Méthodologie choisie : analyse des risques (absence d'interférence résiduelle) ☒ ; calcul ☐		
	Incertitudes calculées	Exigence de performances
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	NA	NA
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	NA	NA

Argumentaire de la conclusion (impact sur la zone décisionnelle ?) : **NON APPLICABLE : Pas de calculs possibles pour cette analyse QUALITATIVE. Les risques résiduels sont écartés du fait des tests effectués pour cette validation de méthode ainsi qu'avec la réalisation de l'analyse des risques et leurs modalités de maîtrise.**

LIMITE DE DETECTION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A) Applicable ☒ ; non applicable ☐	
Limite de détection :	NA

Argumentaire de la conclusion : **Pas d'étude expérimentale pour cette analyse QUALITATIVE dans laquelle on ne dose pas la quantité d'anticorps et où l'on indique seulement sa présence ou son absence. De plus, on ne dispose pas, là encore, de technique de référence permettant de réaliser une mesure de la quantité de ces auto-anticorps.**

COMPARAISON DE METHODES : Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	NA
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou back-up, EBMD :	NA
Nombre de mesures :	NA
Intervalle de comparaison adaptée à l'étendue des mesures du laboratoire :	NA
Méthode d'exploitation des résultats :	NA
Equation de la droite de régression :	NA
Diagramme des différences et/ou des rapports :	NA

Argumentaire de la conclusion : **NON APPLICABLE : Cette méthode est la seule existante à l'heure actuelle en France pour mettre en évidence ce type d'anticorps.**

ETENDUE DE MESURE (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH, ...) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Limite de détection :	VOIR ITEM LIMITE DE DETECTION CI-DESSUS
Limite de quantification :	NA analyse QUALITATIVE
Limite supérieure de linéarité :	NA analyse QUALITATIVE

INTERFERENCES (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments, ... - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) Applicable ☐ ; non applicable (à justifier) ☒	
Hémolyse	essai de surcharge (module LIH)
Turbidité	essai de surcharge (module LIH)
Bilirubine, ictère	essai de surcharge (module LIH)

Argumentaire de la conclusion : **Les interférences visibles liées à l'hémolyse, la turbidité et la bilirubine interviennent principalement dans les mécanismes de surcharge, les mécanismes optiques et les mécanismes chimiques de dosages. Dans notre cas, il s'agit d'une méthode qualitative de détection des auto-anticorps d'un sérum (dilué au 1/20^{ème}) sur cellules en culture, par une réaction antigène-anticorps révélée par immunofluorescence. Les éventuelles interférences liées aux paramètres cités ci-dessus n'impactent pas la présence ou l'absence de l'analyte recherché.**

CONTAMINATION (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, βHCG, ...) :	Essais avec utilisations de sérums positifs et négatifs sur une même plaque
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides, ...) :	NA technique manuelle

Argumentaire de la conclusion : **Cette technique est entièrement manuelle. L'utilisation répétée de deux sérums connus comme étant positifs et deux sérums négatifs les uns à côté des autres sur une même plaque, lors des essais de mise au point et de validation, démontre qu'il n'y a pas de contamination inter-échantillon ou inter-réactif.**

ROBUSTESSE et STABILITE des REACTIFS (étude expérimentale indispensable en portée B) (étude expérimentale possible si pertinente en portée A pour les paramètres sensibles) Applicable ☒ ; non applicable (à justifier) ☐	
Paramètres sensibles testés (t°, pH, position sur un support, ...)	Afin de démontrer la capacité de la méthode à maintenir ses performances lorsqu'elle est soumise à de petites variations fortuites liées aux conditions expérimentales, nous avons réalisé la méthode en faisant varier 4 paramètres : - Densité cellulaire initiale - Temps d'incubation des sérums - Dilution des sérums - Temps d'incubation de l'anticorps secondaire - Temps de fixation des cellules* Les vérifications expérimentales afin d'évaluer la robustesse découlent de l'identification des paramètres critiques de la méthode. Elles ont été testées avec 2 sérums positifs et 2 sérums négatifs. Les résultats indiquent que pour chaque paramètre les variations n'entraînent aucun impact sur le résultat. Cf. tableau ci-dessous
Stabilité des réactifs après ouverture, embarqués, ...	Après ouverture, les réactifs sont reconstitués et conservés selon les recommandations du fournisseur (les solutions et tampons utilisés sont fabriqués extemporanément)

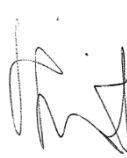
Argumentaire de la conclusion :

		Sérums positifs		Sérums négatifs	
		SER ZA3-40	SER ZA3-09	SER NEG-1	SER NEG-2
Temps de fixation au PFA	5 minutes	+	+	-	-
	10 minutes	+	+	-	-
	15 minutes	+	+	-	-
Temps d'incubation des sérums	30 minutes	+	+	-	-
	1 heure	+	+	-	-
	2 heures	+	+	-	-
Temps d'incubation de l'anticorps secondaire à +4°C	15 heures	+	+	-	-
	20 heures	+	+	-	-
Quantité de cellules ensemencées	10'000 cellules/puits	+	+	-	-
	15'000 cellules/puits	+	+	-	-
	20'000 cellules/puits	+	+	-	-
Dilution des sérums	1/10 ^{ème}	+	+	-	-
	1/100 ^{ème}	+	+	-	-
	1/200 ^{ème}	+	+	-	-

Les résultats des tests mis en œuvre afin d'évaluer la robustesse de la méthode indiquent que les variations des paramètres critiques cités ci-dessus n'impactent pas le résultat final de la technique s'il soit positif ou négatif.

INTERVALLES de REFERENCE et/ou valeurs seuils en fonction des données démographiques (étude expérimentale indispensable en portée B) Applicable ☐ ; non applicable ☒	
Valeurs de référence	NA

Argumentaire de la conclusion : **NON APPLICABLE : Analyse QUALITATIVE.**

DECLARATION d'APTITUDE
<u>Conclusion :</u> Cette méthode est conforme aux performances attendues et souhaitées. Méthode conforme utilisée à partir du 05/09/2016 Autorisée par : Dr SIMONET Thomas Signature : 

Développement de méthodes innovantes de détection des auto-anticorps non conventionnels dans la myasthénie auto-immune

BALLESTA Samantha

RÉSUMÉ

La myasthénie auto-immune, également appelée « *myasthenia gravis* », est une pathologie rare de la jonction neuromusculaire. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire anormale et une fatigabilité excessive. Actuellement, le diagnostic sérologique de cette pathologie est réalisé par un dosage radio immunologique des auto-anticorps. Il est estimé, grâce à ce dernier, que 80% des patients possèdent des auto-anticorps anti-RACH et 10% des auto-anticorps anti-MuSK.

Mes travaux ont donc eu pour objectifs de développer, d'adapter et d'instaurer des techniques de détection innovantes afin d'améliorer le diagnostic des 10% de patients séronégatifs pour lesquels aucun auto-anticorps conventionnel n'a été détecté.

Des études récentes ont montrées grâce à un test en CBA, que certains patients possèdent des auto-anticorps anti-RACH sensibles à la conformation du récepteur. L'équipe du Pr SCHAEFFER a mis au point en 2014 un test similaire permettant la détection de tels auto-anticorps. Mon travail a donc débuté par l'adaptation et la validation de cette méthode afin de la rendre disponible en tant que diagnostic de routine. La mise en place de cette technique a permis de rendre un diagnostic à près de 9% des patients SNMG. J'ai ensuite poursuivi mes recherches afin d'élargir ce type de test à la détections d'autres anticorps potentiellement impliqués dans la myasthénie tels que les anticorps anti-agrine, anti-MuSK et anti-LRP4. Toutefois, les résultats obtenus soulignent que cette technique n'est pas spécifique. C'est pourquoi, j'ai axé mes travaux en abordant une approche différente consistant à développer un test non ciblé permettant de détecter des anticorps dirigés contre la structure post-synaptique de la JNM. Cette stratégie repose sur l'utilisation de myoblastes humains cultivés sur des « micropattern » contraint à se différencier et à exprimer des clusters de RACH semblables à ceux observés *in vivo*. Les résultats préliminaires de ces travaux sont encourageants. L'objectif *in fine* de ce projet serait de pouvoir détecter tous les anticorps impliqués dans la myasthénie (sans pour autant en connaître la nature) grâce à ce test et donc de rendre un diagnostic à tous les patients. Et à long terme, on pourrait déterminer quel composant de la JNM est ciblé grâce à la spectrométrie de masse.

MOTS-CLÉS :

Myasthénie auto-immune, anticorps anti-RACH, anticorps anti-MuSK, anticorps anti-agrine, anticorps anti-LRP4, CBA, validation de méthode, myoblastes, micropattern.