

Module: Immunogénétique

TD 2 Techniques Immunologiques

serum A
(eau)

serum B
(eau)

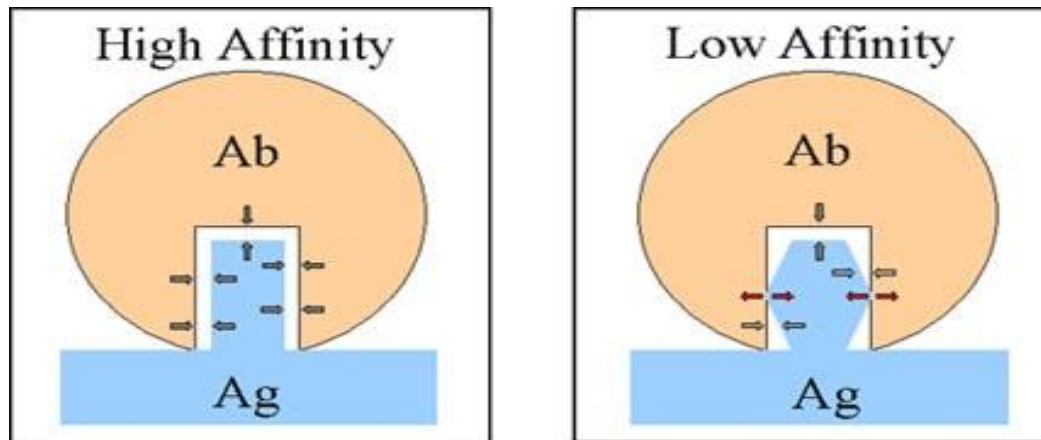
serum D
(soude)

serum C
(eau)

I. Généralités

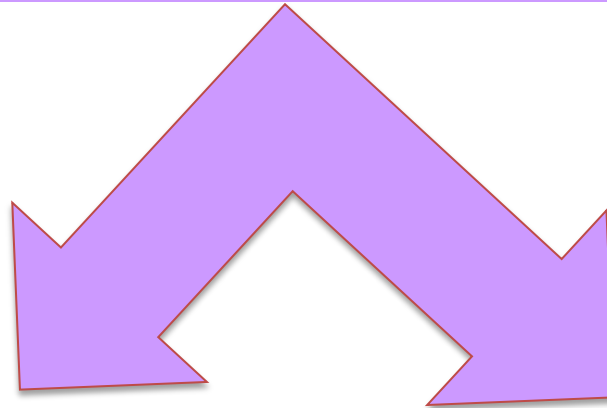
Les techniques ou les essais immunologiques constituent une des méthodes les plus communes en chimie bioanalytique pour le diagnostic et le contrôle des maladies.

Elles sont basées sur l'interaction antigène-anticorps (Ag-Ac), due à la reconnaissance spécifique et la complémentarité de structure (qui déterminent l'affinité) de l'anticorps pour l'antigène.



II. Techniques immunologiques

Détection de réaction Ac-Ag



Visible à l'œil nu	Non visible à l'œil nu
<ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Immun agglutination<input type="checkbox"/> Immun précipitation	<ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Immunofluorescence<input type="checkbox"/> Immun enzymologie

II.1. Immunoprécipitation

Principe

Les réactions de précipitation ont lieu entre un anticorps et un antigène soluble : soit en milieu liquide ou gélifié.

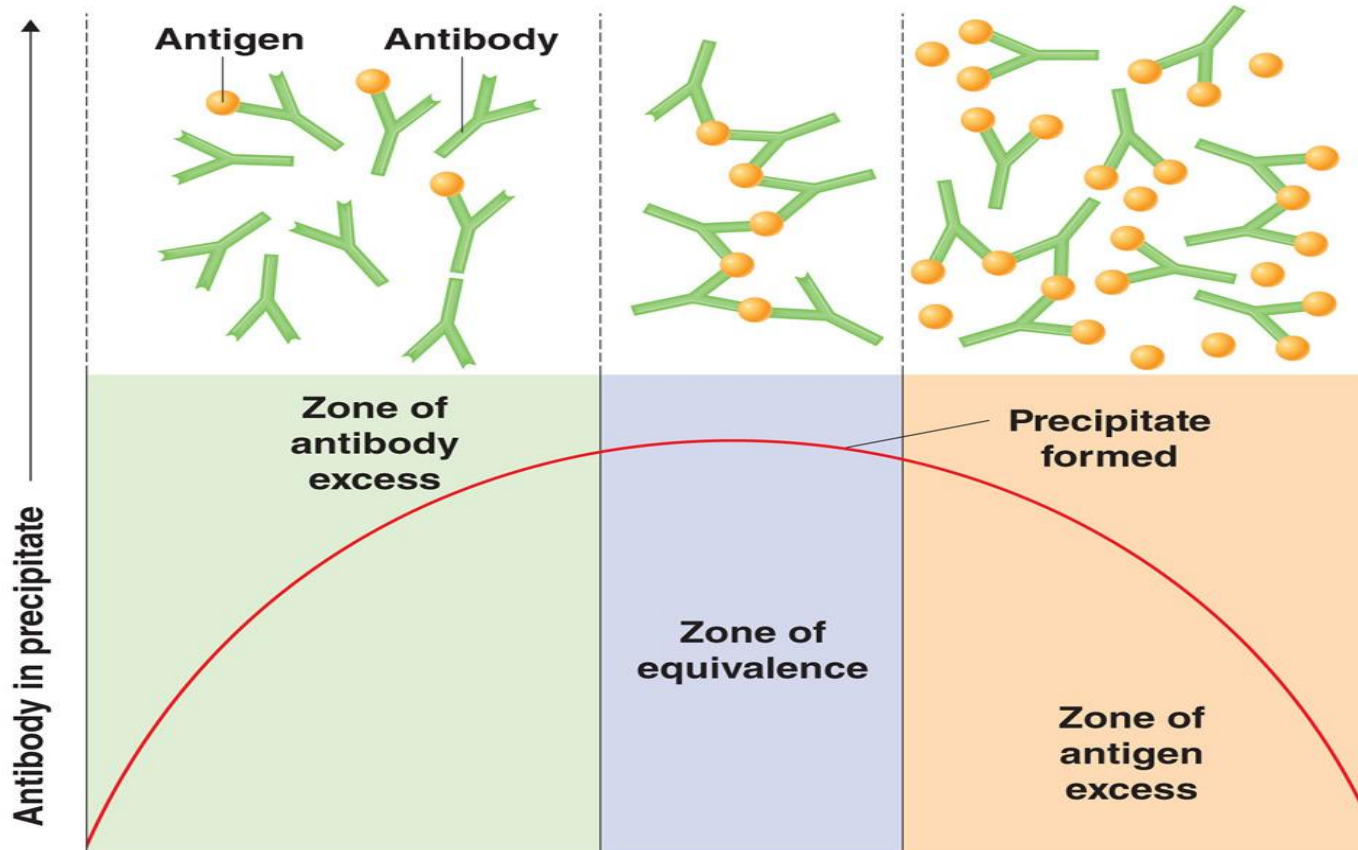
✓ Un précipité est la conséquence de la formation d'un **réseau** au niveau de **la zone d'équivalence**.

✓ Chaque molécule d'Ag multivalent peut fixer plusieurs molécules d'Ac et chaque molécule d'Ac est liée à plus d'une molécule d'antigène. Ce qui influence la taille des agrégats formés qui deviennent importante et leur solubilité diminue:

Si la masse des agrégats dépasse les forces qui les maintiennent en solution, ils peuvent devenir insolubles et se précipiter.

Aucun précipité visible ne se forme dans les régions d'excès d'anticorps ou d'antigène

A forte concentration d'Ac, le nombre de sites de liaison d'Ac peut largement excéder le nombre d'épitopes. Il en résulte que les Ac ne peuvent se lier à l'Ag que d'une façon univalente et non pas multivalente.



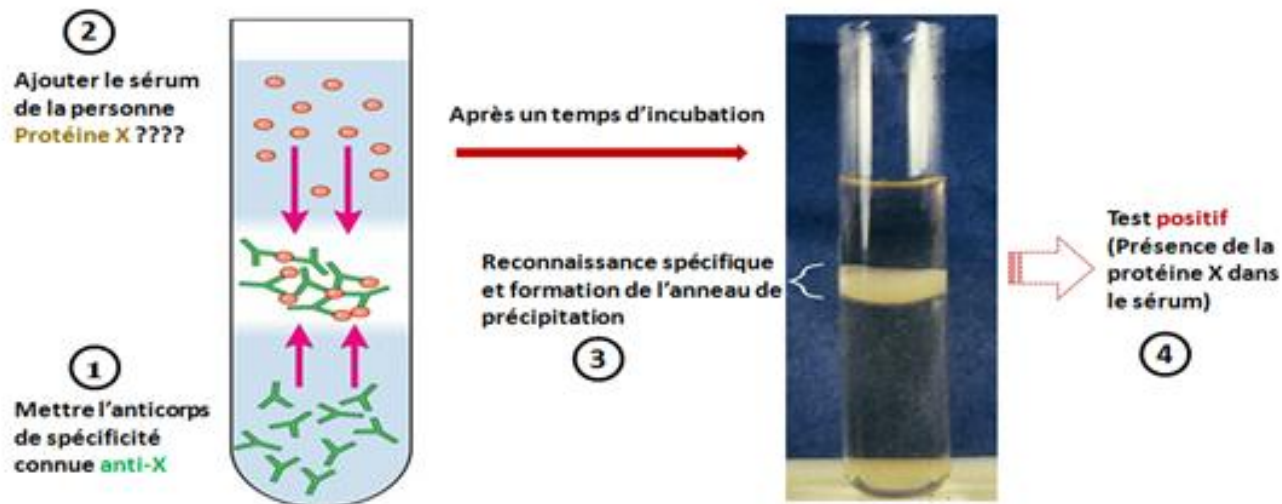
II.1.1. L'immunoprécipitation en milieu liquide

A) Test de l'anneau

C'est un test qualitatif. On introduit dans un tube des antigènes et des anticorps et on laisse reposer. Ils vont lentement diffuser dans le milieu, créant des gradients de concentration. Lorsqu'ils sont à l'équivalence, c'est-à-dire qu'il y a autant de paratope que d'épitopes, ils forment des complexes et précipitent.

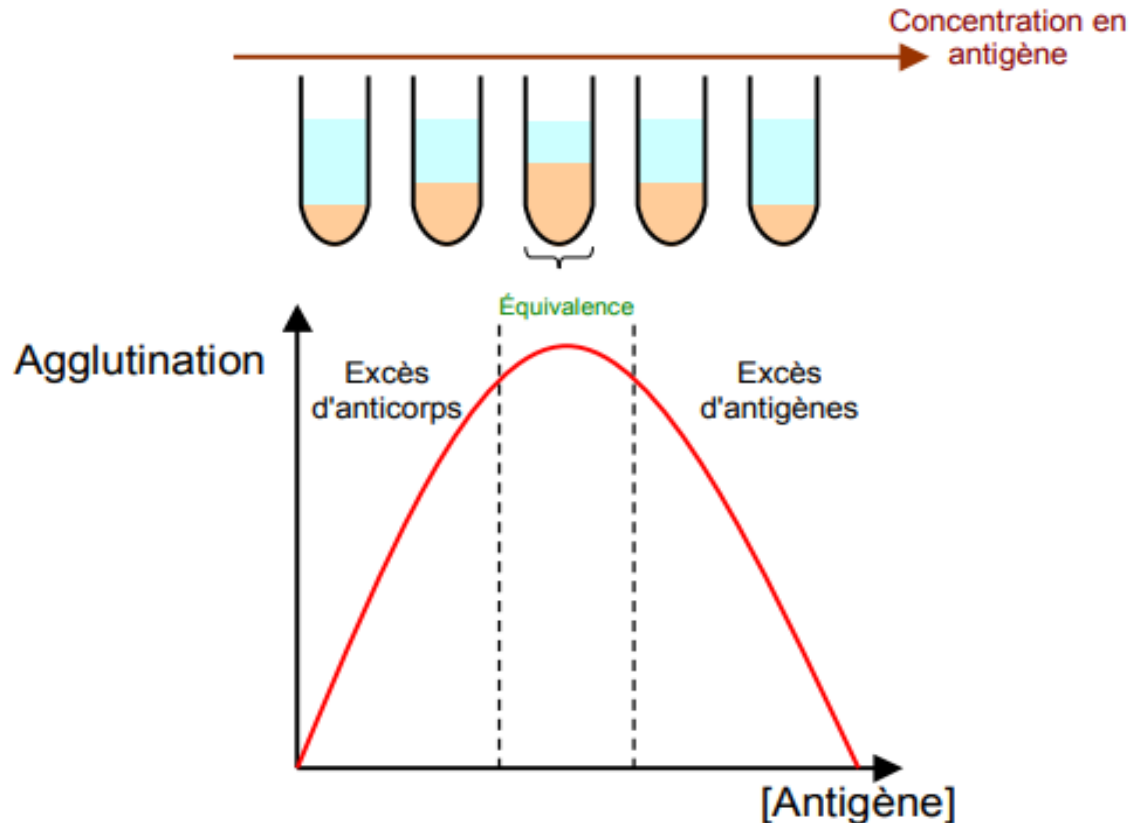
Remarque: Plus il y a d'antigène, plus l'anneau est bas.

But : Recherche de la présence d'une protéine x dans le sérum



B) Technique de Heidelberg et Hendall

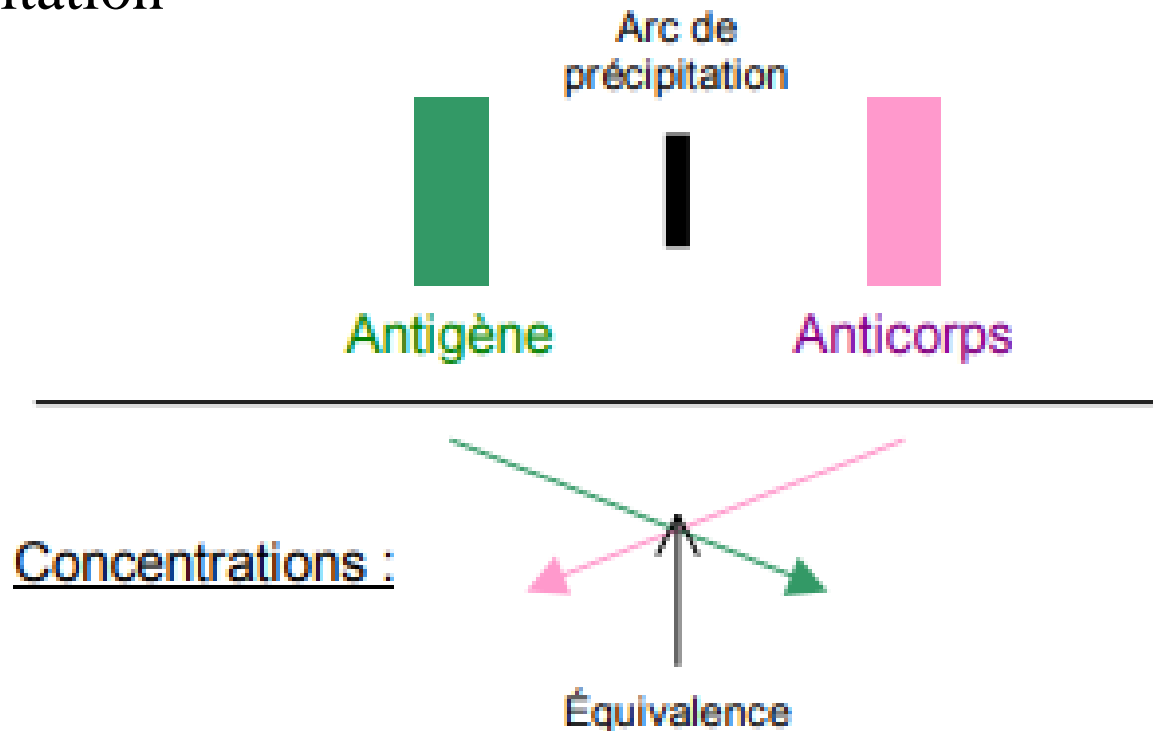
On mélange dans des tubes une quantité constante d'Ac, et une quantité croissante d'Ag, on centrifuge les tubes, et on compare la quantité de précipité en fonction de la concentration



II.1.2. L'immunoprécipitation en milieu gélifié

La Technique s'effectue sur gel qui peut être vierge ou incorporé d'Ac spécifique de l'Ag à chercher. Des précipités immuns peuvent être formés non seulement en solution mais aussi dans une matrice d'agar.

La rencontre et l'interaction entre l'Ag et l'Ac donne apparition à un arc de précipitation

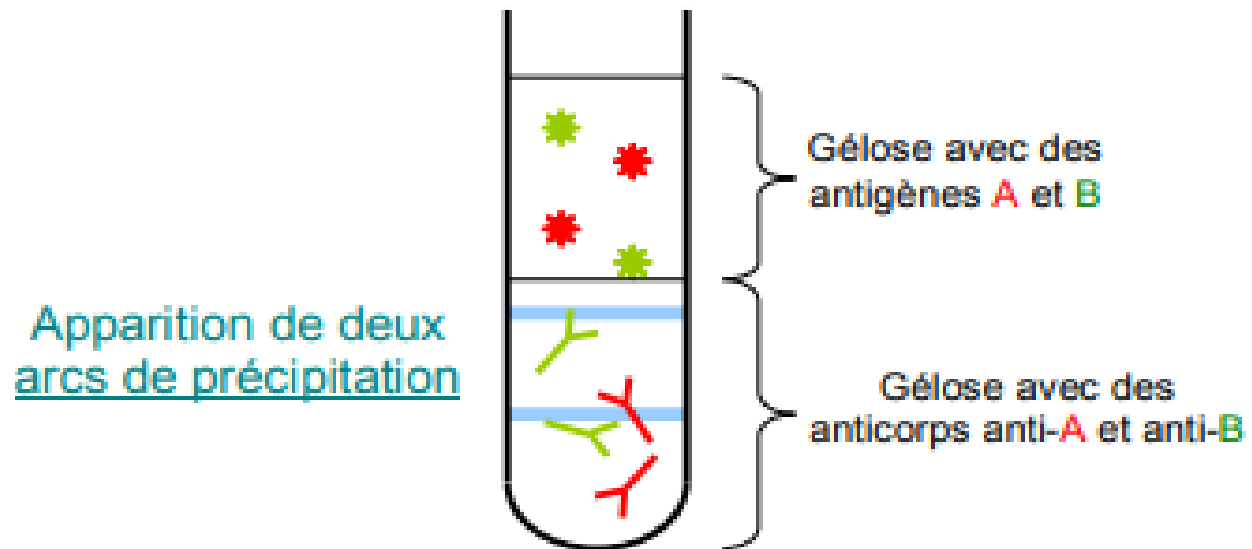


II.1.2.1. Immunodiffusion

➤ Technique Oudin

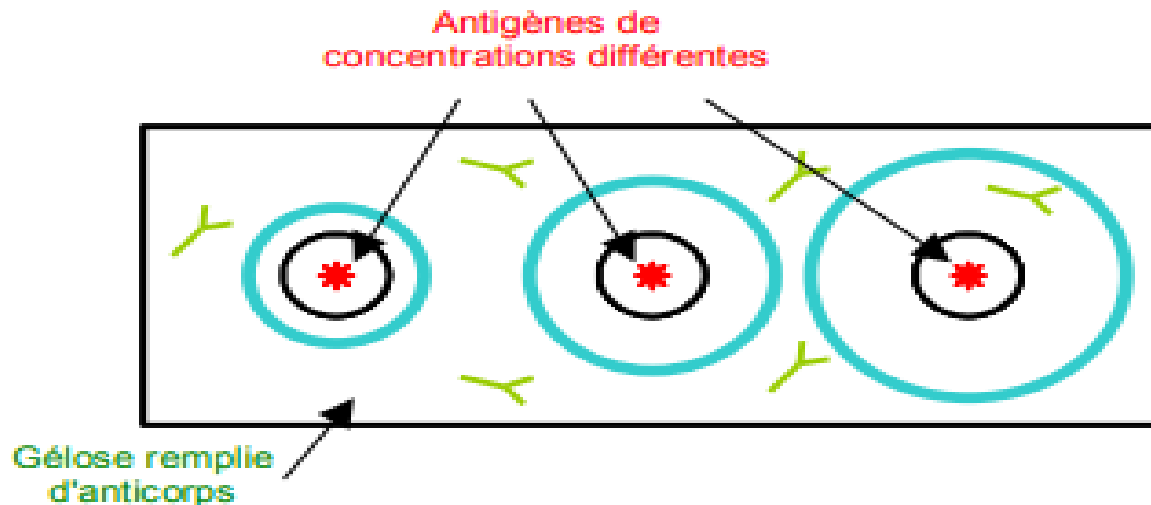
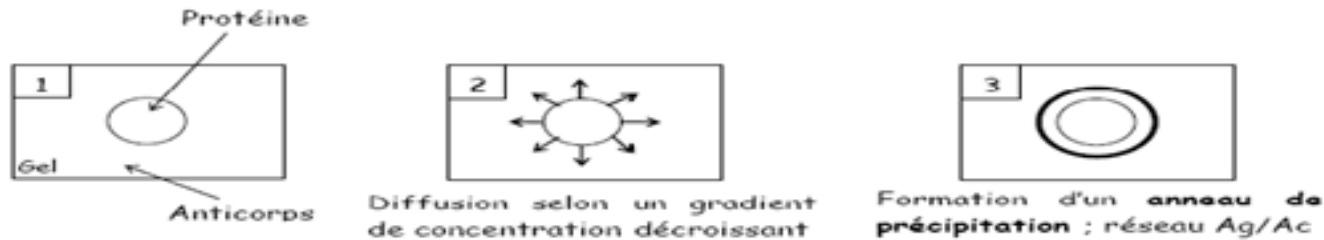
Un seul des deux éléments diffuse; la précipitation a lieu à l'endroit où les concentrations en Ag et en Ac correspondent à la zone d'équivalence.

- On met en contact dans un tube deux géloses contenant chacune des Ag et des Ac. Les molécules vont diffuser et former un arc de précipitation



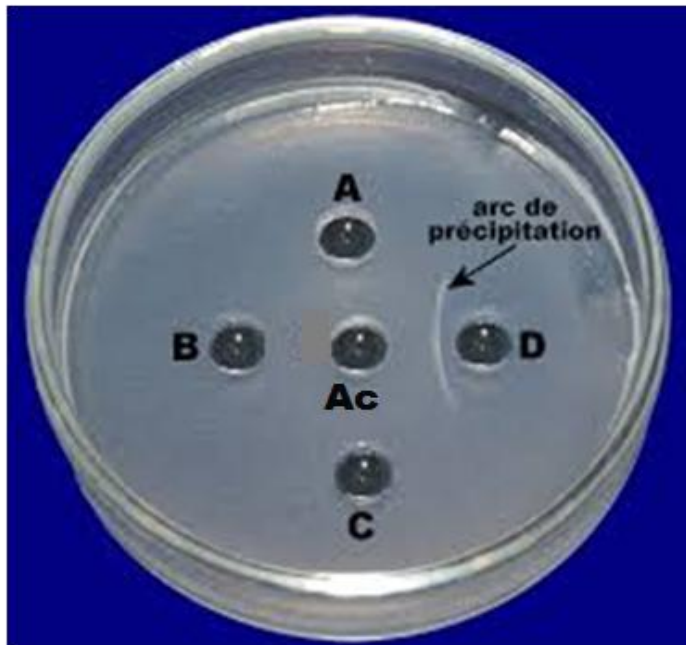
➤ Technique de Mancini

Consiste à introduire des Ac spécifique dans la gélose, et de remplir des puits avec un Ag de concentrations différentes, après la diffusion, on observe des cercle de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la concentration d'antigène. On peut alors doser l'antigène

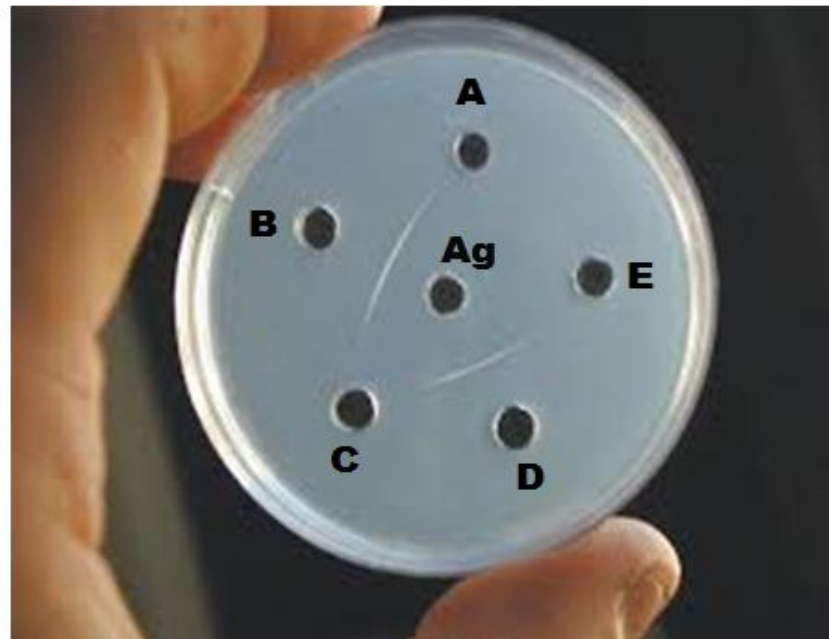


➤ Technique d'Ouchterlony

Cette technique permet de comparer les épitopes portés par différents antigènes. C'est une méthode qualitative. On fait des puits dans la gélose que l'on remplit de différents antigènes et anticorps. On observe alors des arcs de précipitation qui sont différents en fonction des antigènes et des anticorps présents.



Test positif pour le **D**



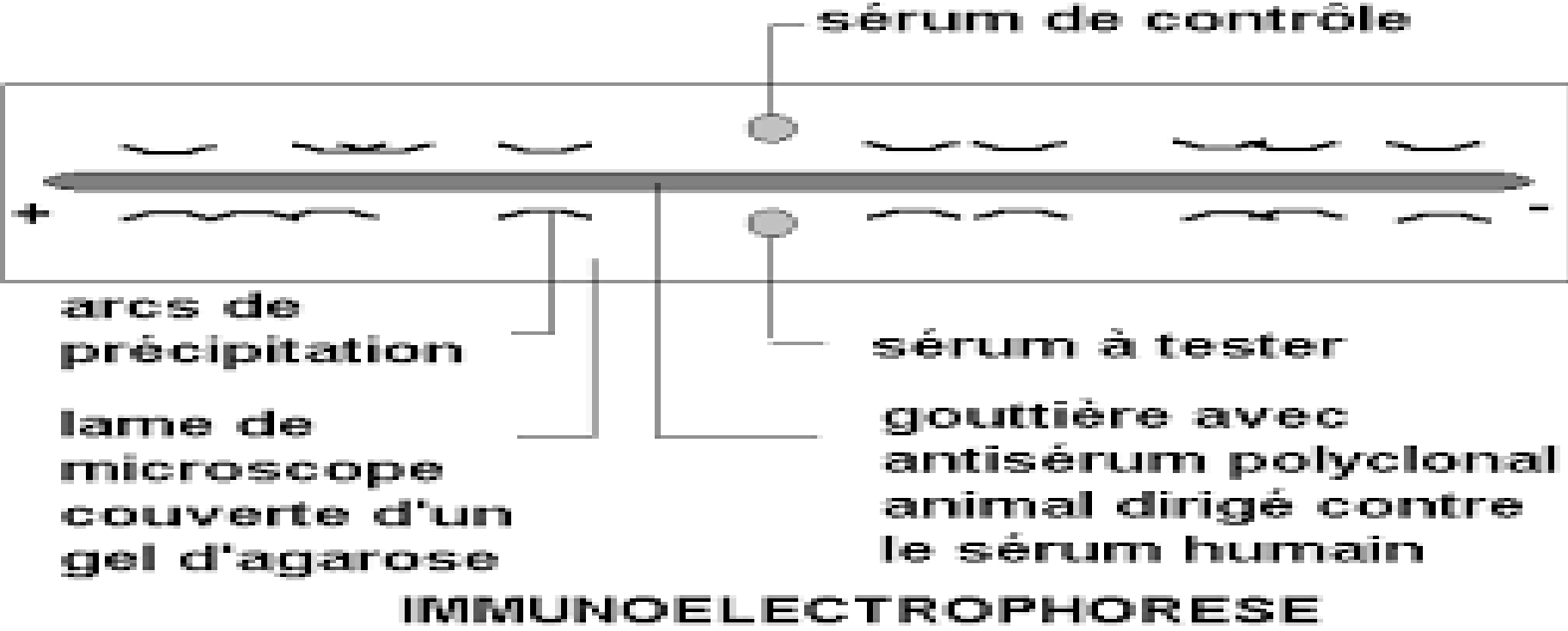
Test positif pour le **B** et le **D**

II.1.2.2. Immunoélectrophorèse (Grabar et Williams)

Le principe de la technique consiste à introduire un mélange d'Ag dans un puits creusé dans une plaque d'agar et à appliquer un champ électrique afin de séparer les molécules d'Ag selon leur mobilité électrophorétique.

Dans un 2eme temps, on utilise leurs propriétés antigéniques ; un immunsérum polyvalent est mis en contact. Les arcs de précipitation antigènes-anticorps sont révélés par coloration

L'immunoélectrophorèse s'est révélée particulièrement spectaculaire pour l'analyse des protéines du sérum, permettant d'objectiver plus de 30 molécules différentes.

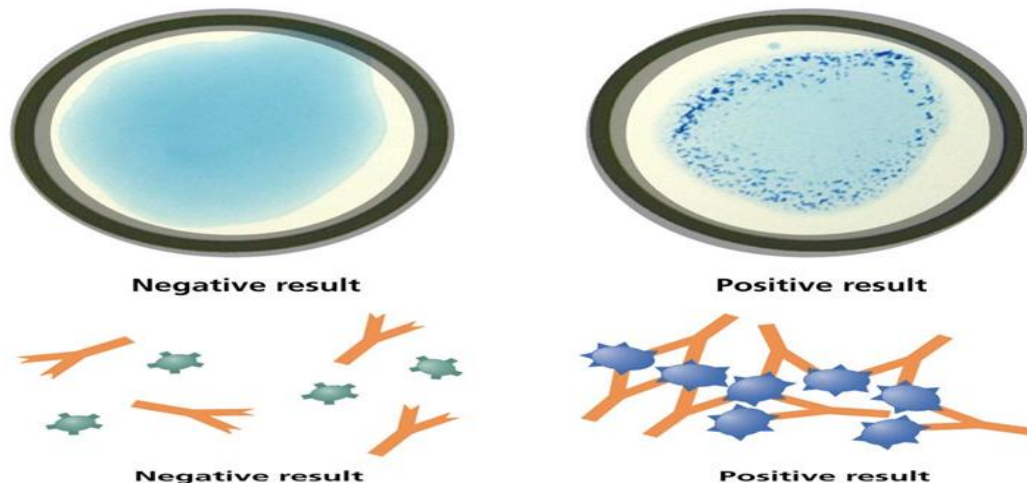


II.2. Immunoagglutination

Principe

L'agglutination immunologique est un phénomène caractérisé par la réunion en amas de particules à la suite d'une réaction d'antigène-anticorps et forme un agglutinât. La suspension de particules, d'abord homogène, devient alors le siège d'agrégats visibles à l'œil nu ou au faible grossissement d'un microscope ordinaire.

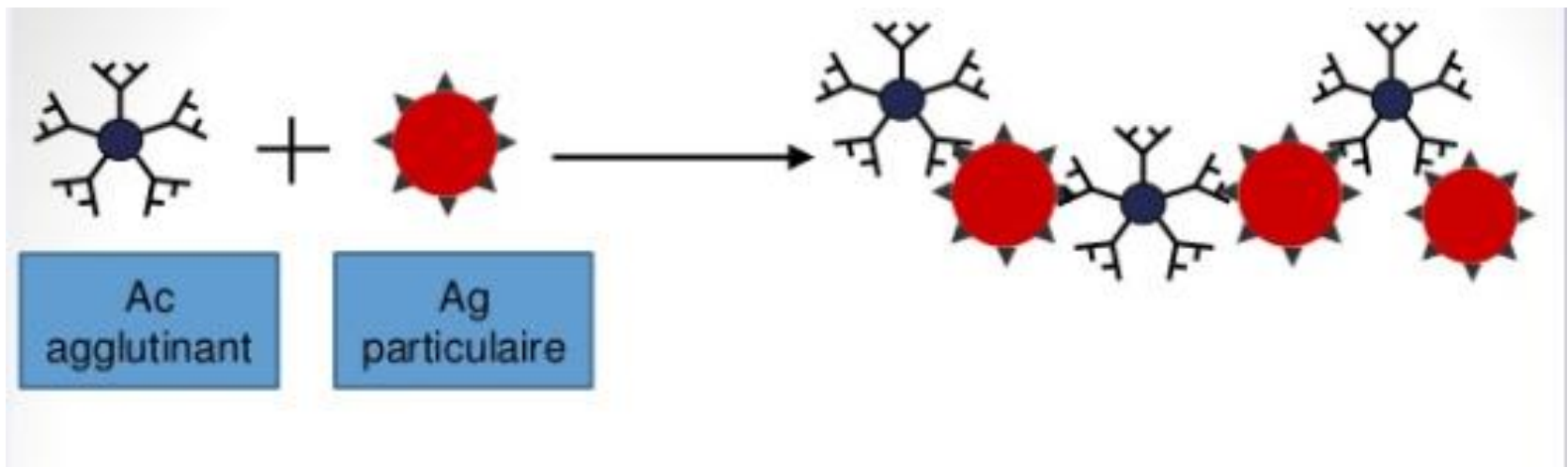
Cet antigène peut être des cellules bactériennes, des hématies portant naturellement des Ag ou artificielle, ou des billes de latex sur lesquelles on a fixé artificiellement un Ag.



II.2.1. Agglutination Active

Ce sont des réactions d'agglutination mettant en présence directement des Ag particulaires et des Ac agglutinants.

Elles sont utilisables qu'en cas où l'antigène fait partie de la particule agglutinée (exemple d'antigène situé sur la surface externe d'une membrane cellulaire ou bactérienne) et est directement accessible par l'anticorps.



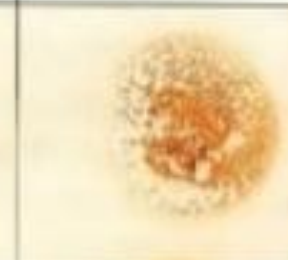











Exemples d'applications en biologie clinique des techniques d'agglutination actives

1) Groupages sanguins :

La mise en évidence des antigènes érythrocytaires se fait par une technique d'agglutination active directe entre les hématies à tester et des anticorps sériques connus: On parle d'épreuve globulaire directe ou épreuve de Beth Vincent. Cette technique peut être réalisée sur plaque, en tube ou en microplaque

Epreuve de Beth Vincent : Recherche de l'Ag A ou B sur les hématies à typer

	Anti-B	Anti-A	Anti-A+B
Groupe sanguin 1 A			
Groupe sanguin 2 O			
Groupe sanguin 3 B			
Groupe sanguin 4 AB			

Par la présence ou l'absence à la surface des hématies d'alloantigènes particuliers appelés également agglutinogène

2) Recherche d'Ac spécifiques, réaction de Widal pour rechercher des Ac contre Salmonella (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes)

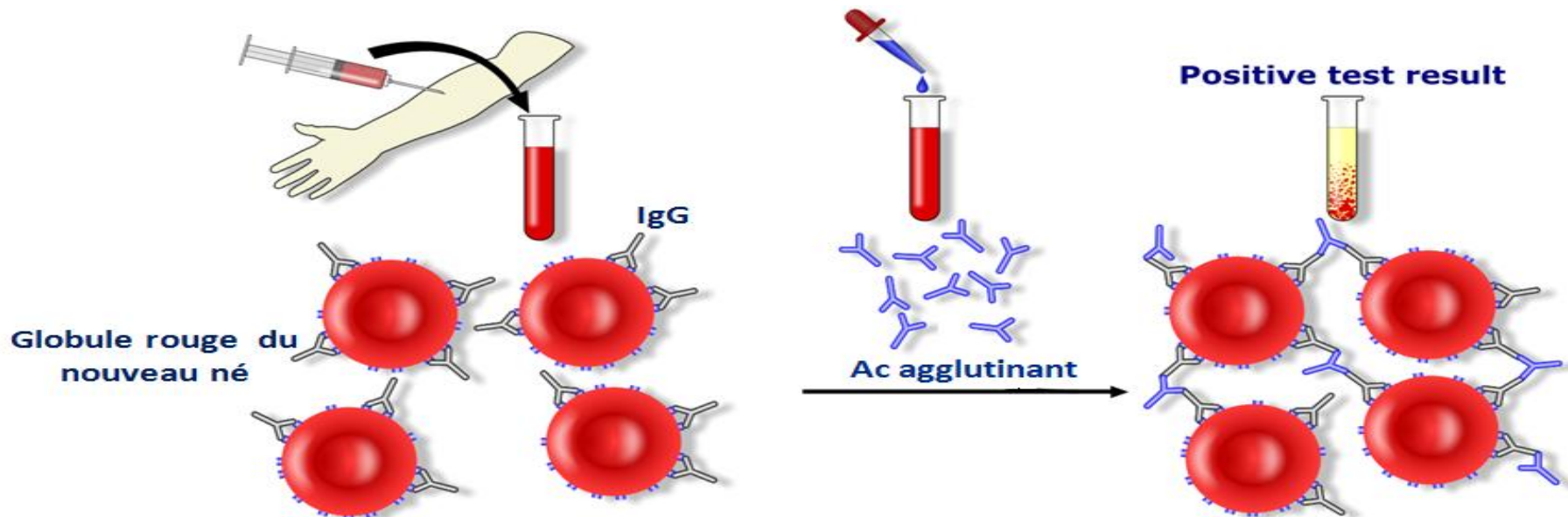
La fièvre typhoïde se caractérise par une infection bactérienne. Elle touche particulièrement les populations des pays en voie de développement. Un traitement efficace et un vaccin préventif existent contre cette maladie.

En l'absence de diagnostic et de prise en charge rapide, cette infection bactérienne peut s'avérer très grave, voire mortelle. La bactérie en cause est *Salmonella typhi*. Cette dernière est généralement transmise par l'alimentation. La fièvre typhoïde est hautement contagieuse.

➤ Le test de Coombs direct

Les hématies du patient sont utilisées en présence d'anticorps agglutinants anti-immunoglobulines (test à l'antiglobuline), et susceptible d'entraîner leur destruction (hémolyse). Le réactif contenant l'antiglobuline est appelé sérum de Coombs.

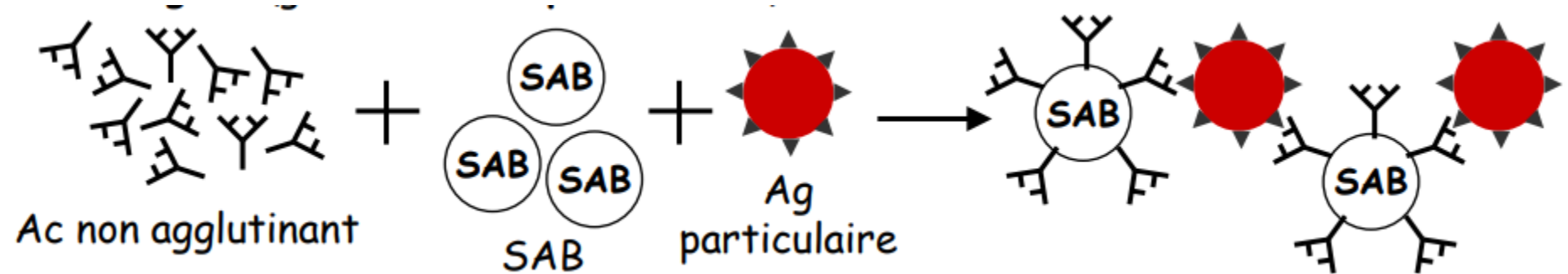
Une agglutination positive témoigne que les hématies du patient ont déjà fixé des anticorps pathogènes (c'est le cas d'anémie hémolytiques auto-immunes par autoanticorps anti érythrocytes, ou les anémies hémolytiques du nouveau-né par anticorps maternels antiRhésus du nouveau-né par exemple)



II.2.2. Agglutination passive

Réaction d'agglutination réalisée avec des Ag solubles préalablement fixés sur des particules servant de support, figuré inerte, n'intervenant pas dans la réaction Ag-Ac; la présence des Ac est décelée par l'agglutination des particules sur lesquelles les Ag sont fixé.

Les particules peuvent être des hématies de moutons, de dinde, des billes de latex, des cristaux de cholestérol ou autre.

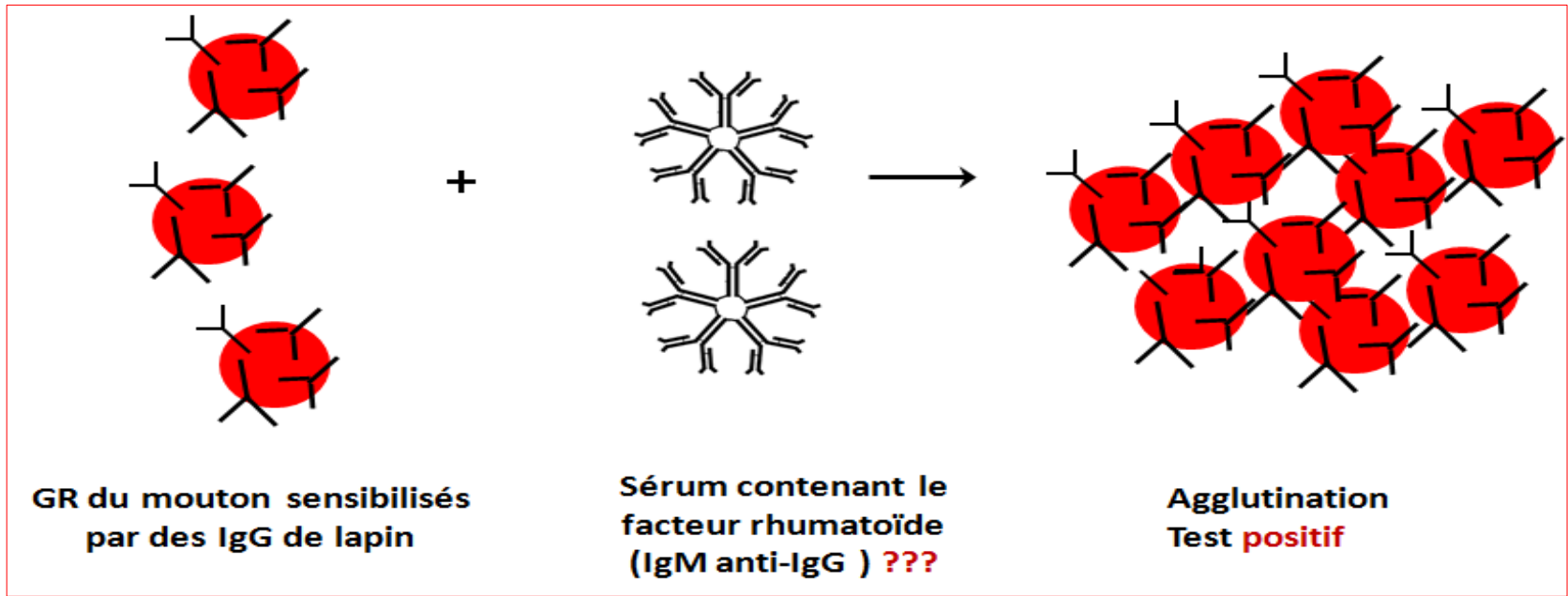


❑ Les applications sont très nombreuses

1. La recherche des facteurs rhumatoïdes (auto-anticorps dirigés contre les IgG agrégées ou liées à un Ag) dans le sérum des malades atteints de Polyarthrite rhumatoïde, qui se font souvent par la réaction de Waaler-Rose ou par le test au latex.
2. La recherche d'Ac anti-globule rouge dans le sérum du malade par le test de Coombs indirect.

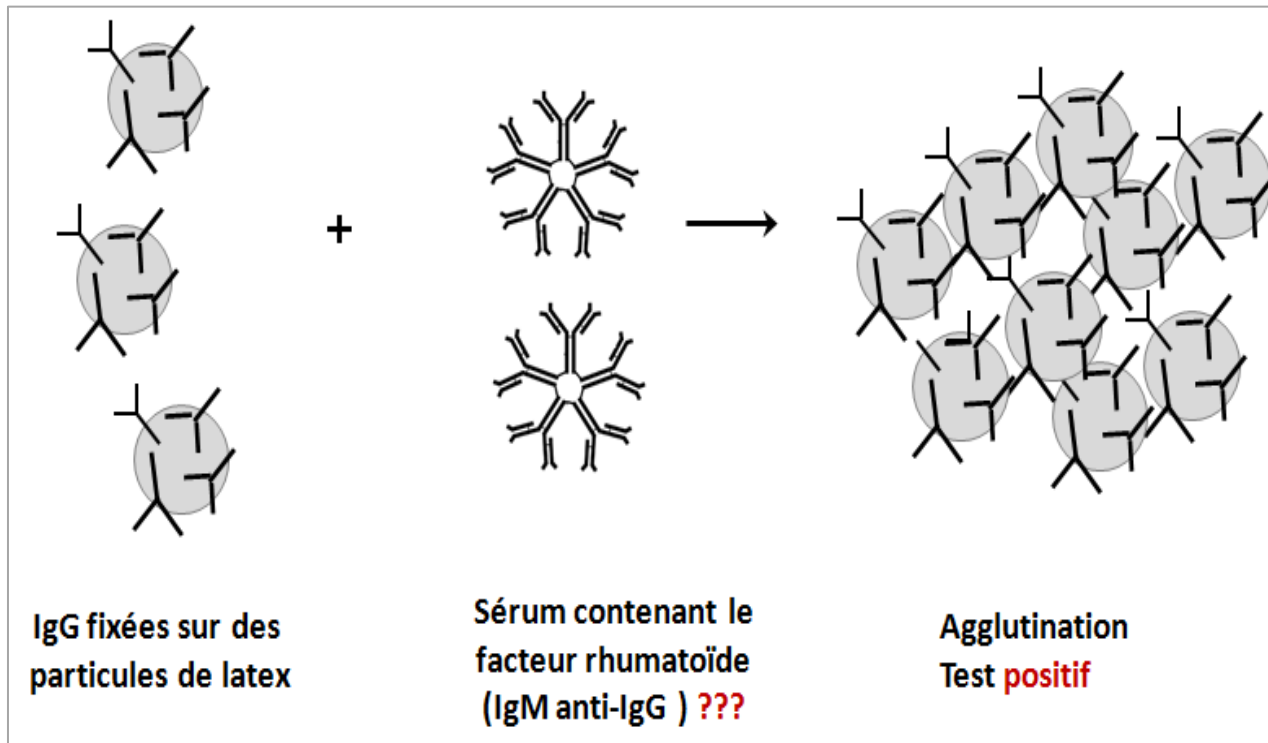
➤ Réaction de Waaler-Rose (Hémagglutination)

Le test de dépistage sur lame utilise des globules rouges de mouton sensibilisés par une dose infra-agglutinante d'IgG de lapin anti-globules rouges de mouton. Le sérum du patient est mis en présence de globules rouges de mouton non sensibilisés (témoin négatif) et de globules rouges de mouton sensibilisés. La présence des facteurs rhumatoïdes est objectivée par l'observation d'une agglutination visible à l'oeil nu avec éclaircissement du milieu.



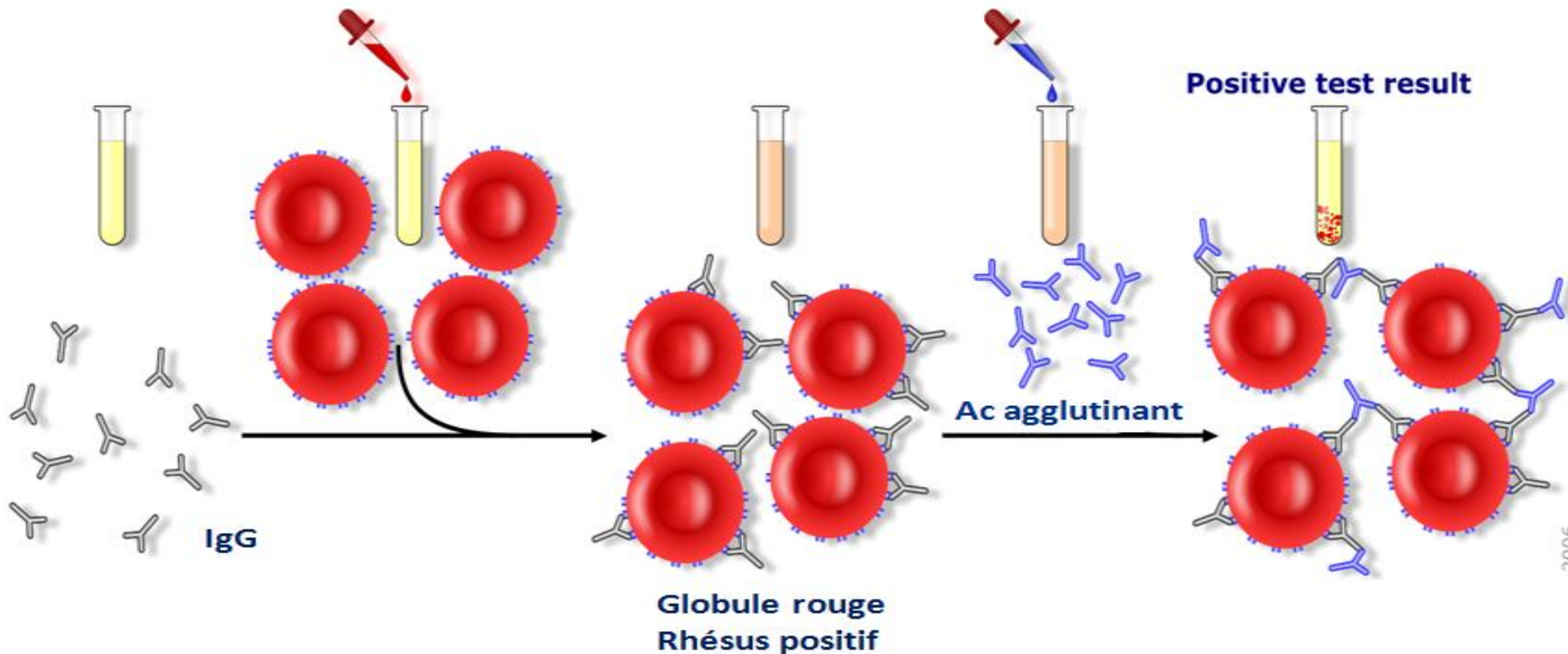
➤ Test au Latex

Technique d'agglutination de particules de polyester recouvertes d'immunoglobulines humaines. Au cours des dernières années, on a abandonné les hématies du sang pour des particules synthétique, telles que les billes de latex, pour servir de matrices aux réactions d'agglutination; elles peuvent être utilisée soit immédiatement, soit stockée par un usage ultérieure.



➤ Test de Coombs indirect

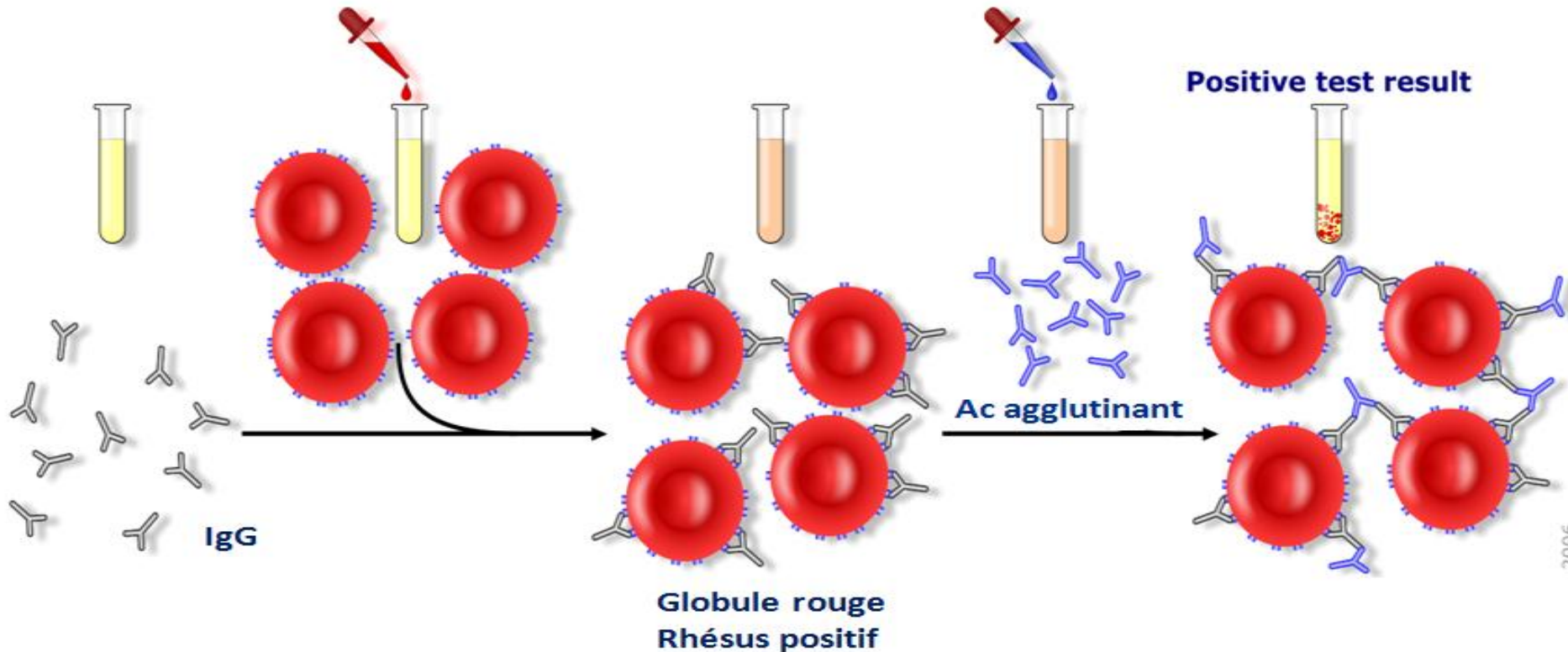
Cette technique est utilisée pour rechercher les Ac non agglutinant circulants dans le sérum. On utilise alors un Ac antiglobuline qui provoque l'agglutination.



➤ Test de Coombs indirect

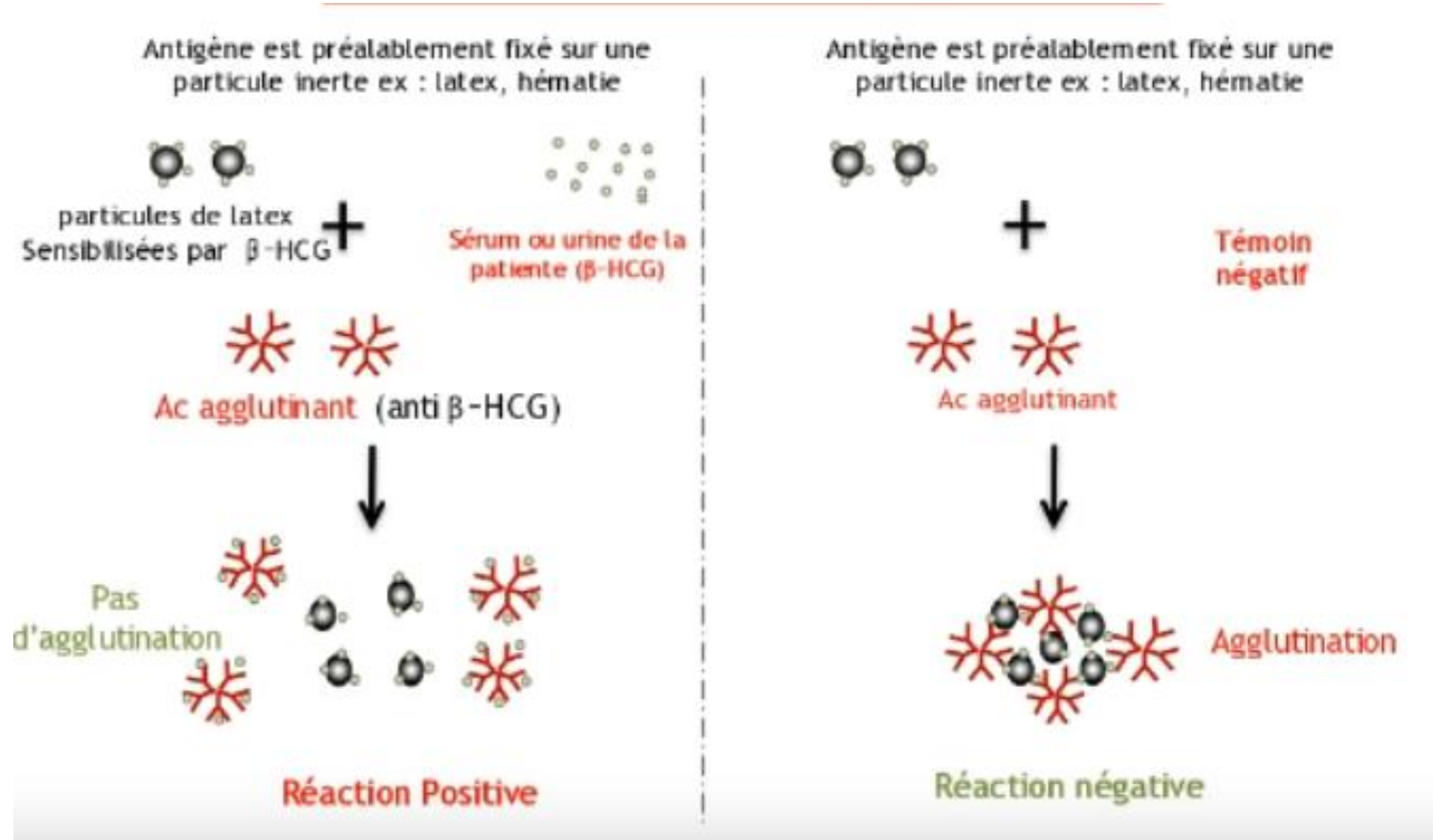
Les hématies sensibilisées sont ensuite mises en réaction avec des anticorps agglutinants (l'anti-globuline). Une réaction positive se traduit par l'agglutination des hématies sensibilisées

Le sérum du patient (dont on veut rechercher la présence d'autoanticorps anti-érythrocytes) est incubé avec des hématies-tests (Des hématies dont les Ag de membrane sont connus) ; les auto-anticorps se fixent sur les hématies-tests ayant Ag correspondant.



C. Inhibition de l'hémagglutination passive (IHA)

Cette réaction permet de rechercher la présence d'Ag dans un liquide biologique. Le même Ag est fixé dans des hématies et mis en présence d'un antisérum spécifique. Si l'Ag est présent il se combine avec Ac spécifique de l'antisérum qui ne peuvent plus agglutiner les particules sensibilisées.



- Les dosages par inhibition de l'agglutination peuvent aussi être utilisés pour déterminer si une personne utilise certains types de drogues illégales, telles que la cocaïne.

Méthodes utilisant un marqueur

Les techniques d'immunomarquage sont utilisées pour analyser des Ag ou haptènes en très faible quantité (sensibilité de l'ordre du nmol/L). Ce principe est aussi utilisé pour étudier les immunocomplexes non précipitant et non agglutinant. Le grand principe du marquage est de fixer sur un des réactifs une substance qui permettra d'identifier l'immunocomplexe recherché. Les marqueurs les plus utilisés sont :

- les fluorochromes (fluorescéine ou rhodamine)
- les radio-isotopes
- les enzymes (phosphatase alcaline ou peroxydase)

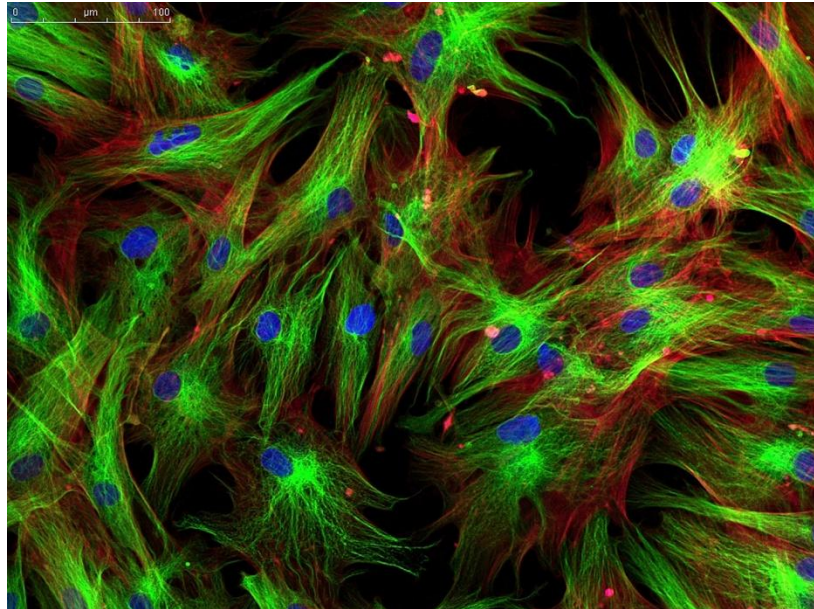
II.3. L'immunofluorescence

C'est une technique qui sert à marquer différentes molécules grâce aux anticorps rendus fluorescents. Ac fluorescent émet de la lumière, lorsqu'elle est exposée à une certaine longueur d'onde. La lecture s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. Il existe deux type de l'immunofluorescence directe et indirecte

Elle utilise plusieurs types de molécules fluorescentes :

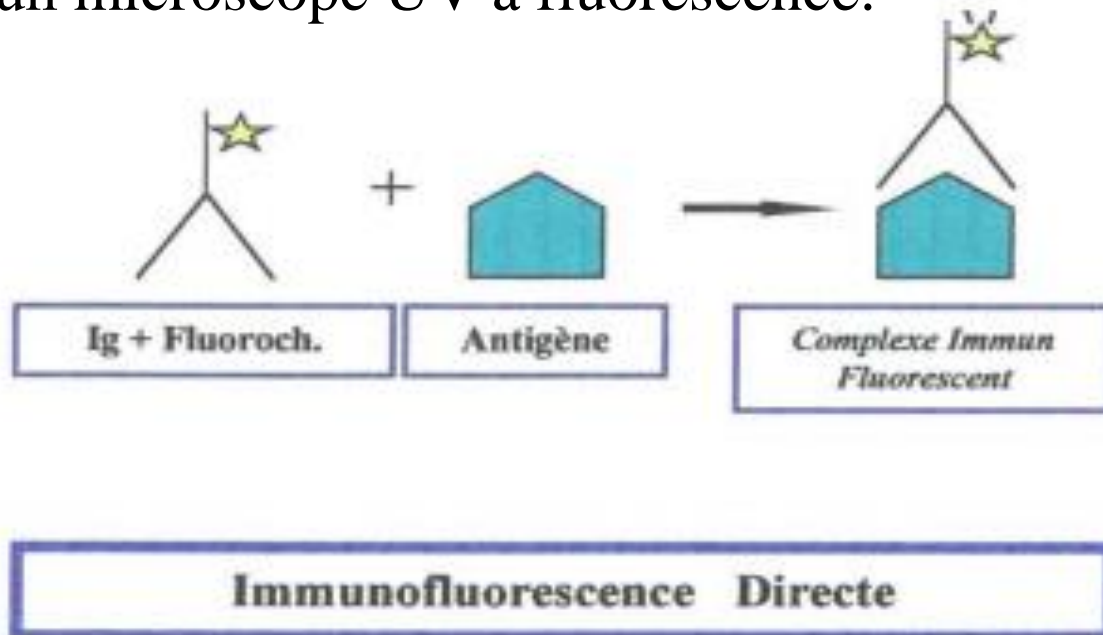
Fluorescéine isothiocyanate ou Rhodamine.

:



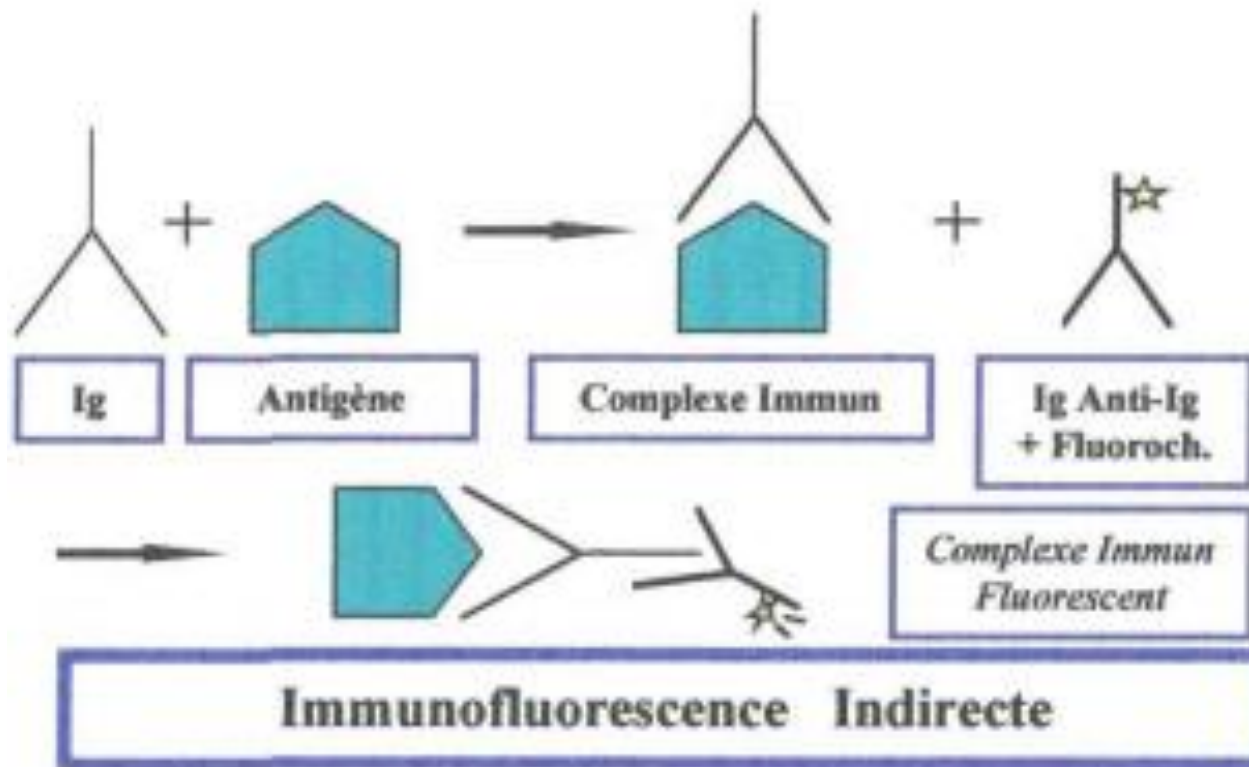
II.3.1. L'immunofluorescence directe

Une des techniques de détection les plus performantes pour détecter la présence d'un anticorps fixé sur un antigène tissulaire ou cellulaire est l'immunofluorescence. Dans cette technique, un colorant fluorescent (l'isothiocyanate de fluorescéine ou la phycoérythrine) est fixé de façon covalente à l'anticorps spécifique et permet la détection directe de l'antigène à analyser. La lecture des coupes tissulaires ou des cellules ainsi marquées est réalisée à l'aide d'un microscope UV à fluorescence.



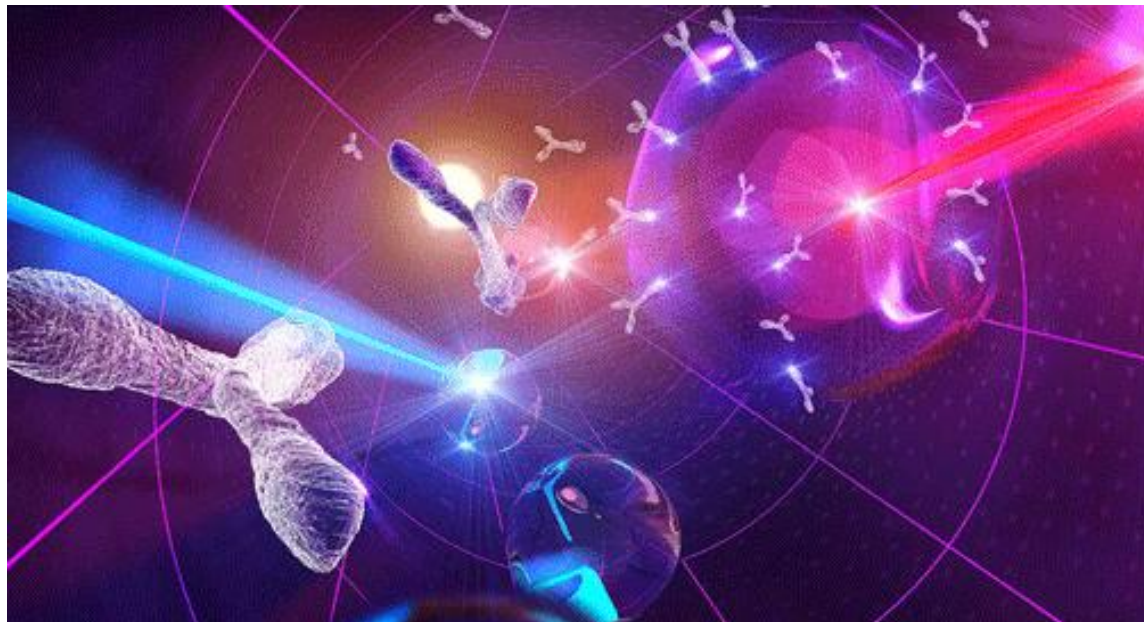
II.3.1. L'immunofluorescence indirecte

Technique d'immunofluorescence utilisée pour détecter des anticorps et des complexes immunes dans des tissus. La technique implique la formation d'un complexe antigène-anticorps marqué avec l'anticorps anti-immunoglobuline fluoresceine-conjugué.



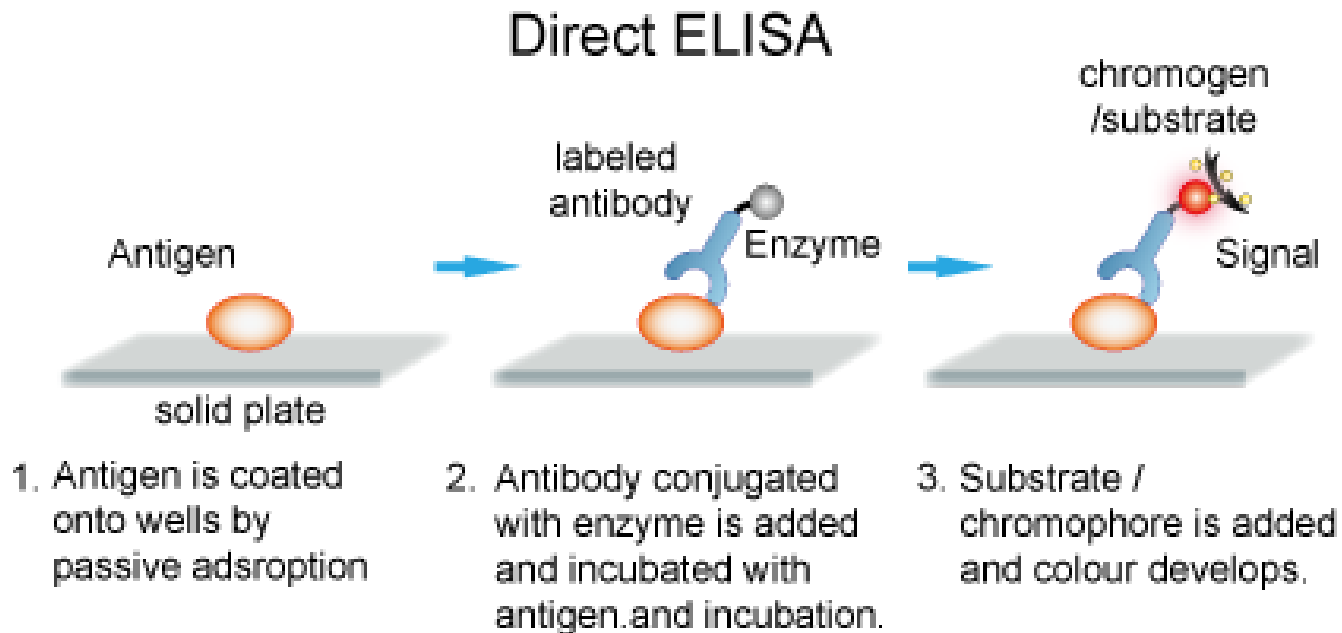
II.4. Immunoenzymologie

On adjoint un marqueur enzymatique qui répond à plusieurs critères (bonne solubilité, pureté, conservation de l'activité catalytique et de la spécificité conservée lors du couplage). On appelle conjugué le composé formé par l'antigène-enzyme ou l'anticorps-enzyme. On révèle la réaction par l'action d'un substrat sur le conjugué enzymatique.



La technique ELISA

La technique ELISA (**Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay**) est une technique hautement sensible et spécifique, fiable et reproductible. C'est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Elle permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

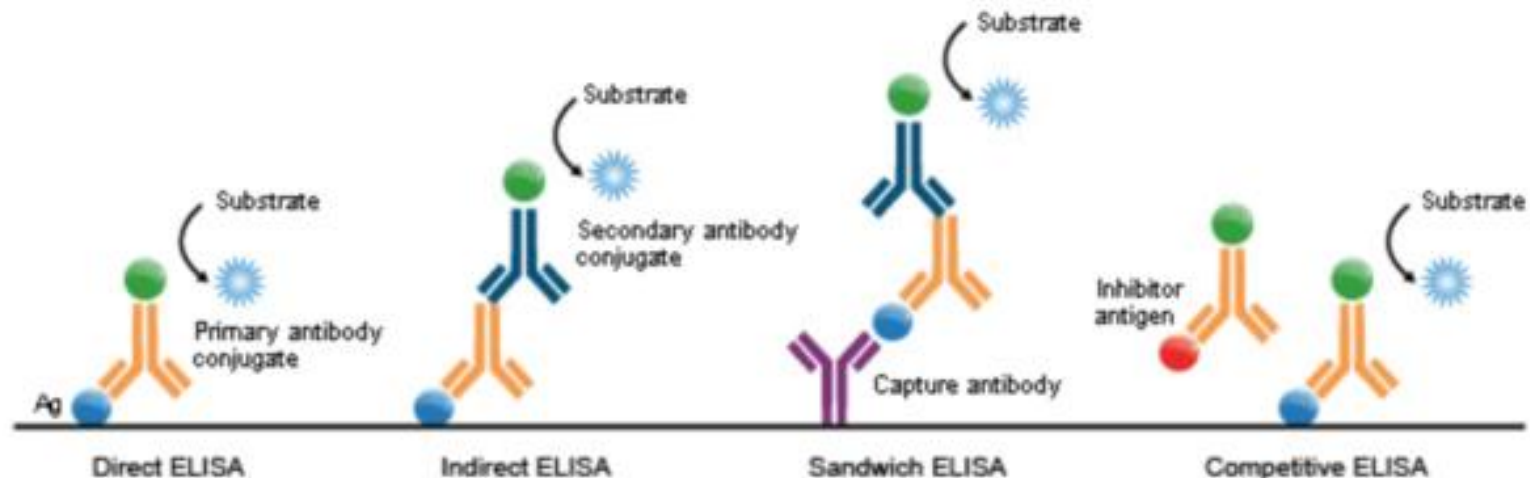


Technique ELISA sandwich

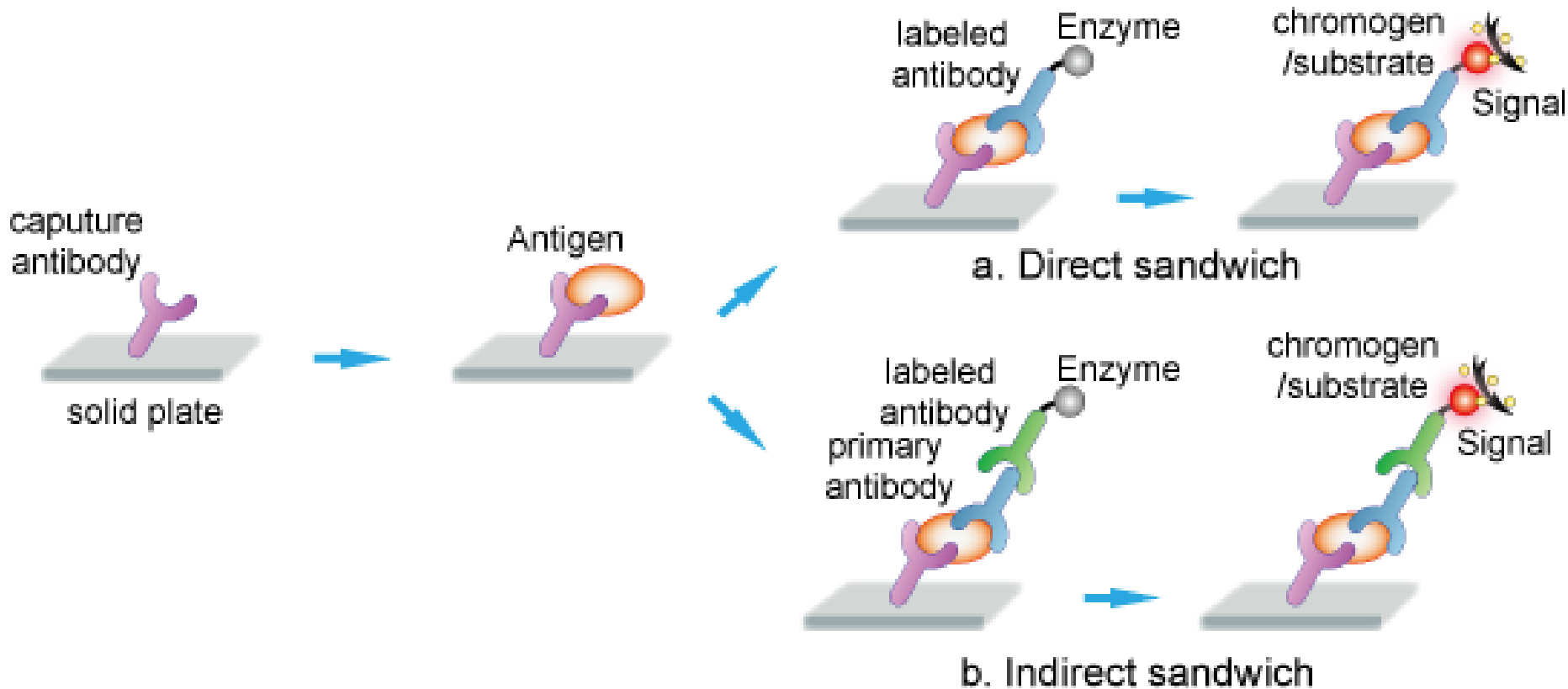
L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection plus sensible et spécifique et il est possible de quantifier les Ag dosés grâce à la réalisation d'une gamme étalon (en concentration) en parallèle.

Protocole de ELISA en sandwich

- Les puits d'une plaque sont tapissés de l'Ac de capture de quantité connue.
- L'échantillon contenant l'Ag à doser est ajouté et il se lie à l'Ac de capture.
- Un Ac de détection (anticorps primaire) est ajouté et se lie à l'Ag, si il est directement couplé à une enzyme (biotine), on parle d'ELISA Sandwich direct..
- Si l'Ac de détection n'est pas conjugué, on utilise un second anticorps de détection (anticorps secondaire couplé biotine) et on parle alors d'ELISA Sandwich indirect



Sandwich ELISA



1. Capture antibody is coated onto wells by passive adsorption and incubation.

2. Antigen sample is added and incubated with capture antibody

3. labeled antibody (a)/primary antibody and labeled antibody (b) is added and incubated with antigen

4. Substrate / chromophore is added and colour develops.