

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

Les techniques immunologiques reposent sur une réaction **antigène-anticorps**. Ces techniques sont utilisées pour mettre en évidence, des antigènes ou des anticorps. Lorsqu'on veut détecter des antigènes, on doit disposer d'anticorps spécifiques correspondant à la spécificité antigénique recherchée. Ces anticorps peuvent être des sérums polyclonaux préparés chez l'animal, ou des immunoglobulines purifiées ou, plus fréquemment aujourd'hui, des anticorps monoclonaux.

Un anticorps est une glycoprotéine complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B : **les plasmocytes**.

La réaction Ag-Ac est une réaction **exothermique, réversible et spécifique**.

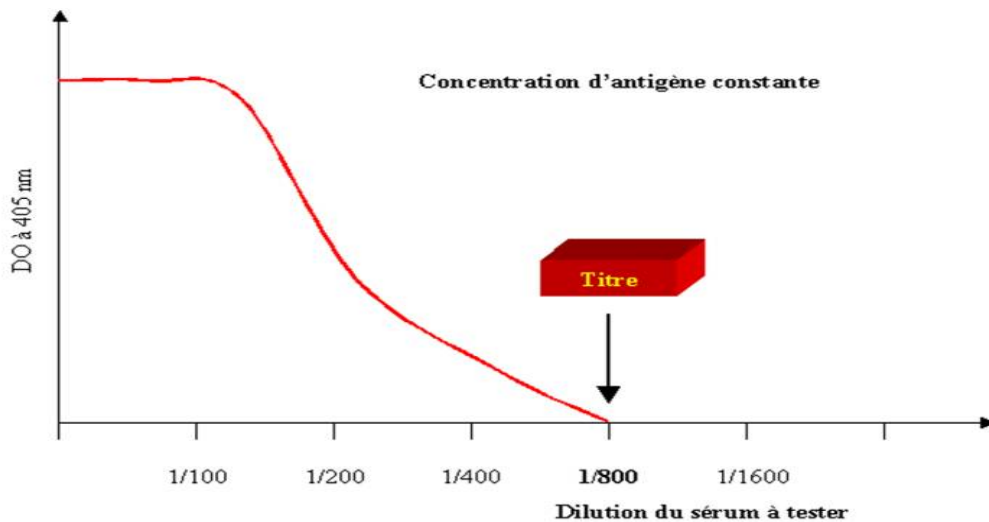
- **Exothermique** : la réaction est caractérisée par la formation d'une liaison libérant de l'énergie, ce qui a pour conséquence une influence de la température sur le bon déroulement de la réaction.
- **Réversible** : la liaison qui s'effectue entre l'Ac et l'Ag sont des liaisons faibles (électrostatique, hydrogène, hydrophobe ...), elle peut donc être rompue assez facilement en faisant varier des paramètres physico-chimiques (pH, température, force ionique).
- **Spécifique** : le site anticorps d'une immunoglobuline (paratope) peut se combiner avec un épitope et un seul ; il existe une spécificité stéréochimique entre le paratope et l'épitope.

La réaction Ag-Ac aboutit à la formation d'un complexe appelé **immuncomplexe**. L'immuncomplexe est le produit qui sera mis en évidence dans toutes les techniques immunologiques.

1. MESURE DU TITRE D'UN ANTICORPS

La présence d'un anticorps spécifique peut être mesurée par plusieurs méthodes différentes. Certaines d'entre elles mesurent la fixation directe de l'anticorps (Ac) sur l'antigène (Ag). Ces techniques sont basées sur des interactions primaires alors que d'autres

détectent les changements physiques de l'antigène induit après la fixation de l'anticorps et sont donc basées sur des interactions secondaires. Quoiqu'il en soit, ces deux types de tests peuvent être employés pour mesurer le titre et la spécificité des anticorps produits au cours de la réponse immunitaire. **Ces tests ayant été utilisés historiquement pour détecter la présence d'anticorps dans le sérum de patients, on les appelle communément tests sérologiques. La quantité d'anticorps présente dans le sérum est déterminée par titrage de celui-ci en dilution limite. Le titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution positive.** Il est à noter que certains auteurs définissent le titre d'un sérum comme la dilution donnant 50% de la réaction maximale observée. Ainsi chaque laboratoire devra fournir pour le test la définition utilisée pour calculer le titre du sérum.



2. TECHNIQUES D'IMMUNO-DOSAGES

2.1 IMMUNO-DOASAGE AVEC MARQUEUR RADIO ACTIF : RIA (Radio Immuno Assay)

L'antigène spécifique des **anticorps** que l'on veut détecter est préalablement **marqué à l'iode 125 (traceur)**. La préparation contenant l'anticorps est alors incubée avec l'antigène marqué. Les complexes Ag/Ac qui se forment en phase liquide sont alors précipités avec une solution de chlorure d'ammonium ou de polyéthylène glycol. Le culot de précipitation est ensuite lavé avec une solution saline et la présence de l'anticorps à doser est déterminée en mesurant la radioactivité présente dans le précipité et en la comparant avec une gamme étalon réalisée soit avec un sérum titré soit avec une préparation purifiée d'anticorps de concentration connue. Cette technique bien que relativement coûteuse et délicate car utilisant des produits radioactifs, présente l'avantage d'une grande sensibilité.

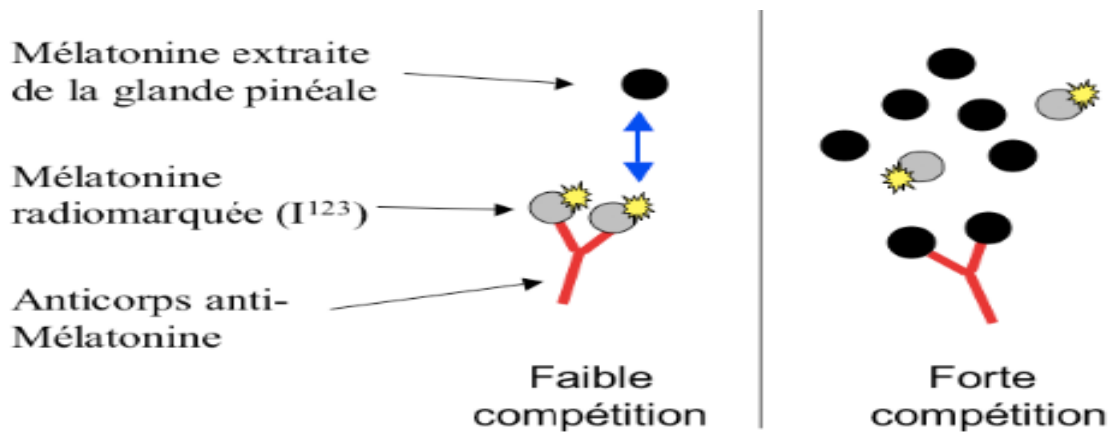
a. Le dosage par compétition

Dans ce type de test, la présence et le titre d'un anticorps particulier est mesurée par sa capacité à entrer en compétition avec un antigène de référence marqué par un radioélément fixé sur l'anticorps spécifique. La courbe étalon est déterminée en ajoutant des quantités connues d'anticorps non marqué. Plus il y a d'antigènes dans l'échantillon, moins les antigènes marqués peuvent lier les anticorps.



b. Exemple du dosage de la mélatonine extraite chez le mouton

Le principe est de créer une compétition entre de la mélatonine marquée radioactive (mélatonine chaude) et de la mélatonine non marquée (dite froide). Des anticorps anti mélatonine sont saturés de mélatonine radioactive. L'ajout de mélatonine non radioactive va générer une compétition. Plus il y aura de mélatonine froide dans le tube et plus la compétition est forte. L'anticorps va donc se décharger de sa mélatonine radioactive. Et ensuite on récupère l'anticorps et on compte la radioactivité qui lui est associée.



2.2 IMMUNO-DOASAGE AVEC MARQUEUR ENZYMATIQUE : L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

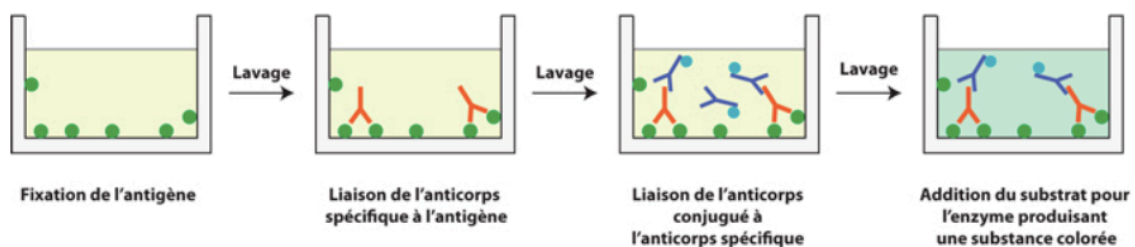
La technique ELISA, plus simple et moins coûteuse a presque totalement remplacé la RIA. La révélation du test n'utilise pas, comme dans la RIA de radioéléments mais est liée au clivage par une enzyme, d'un substrat incolore en un produit coloré.

Le principe de l'ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

- **D'un antigène connu spécifique à l'anticorps recherché**
- D'un échantillon à analyser
- **D'un anticorps secondaire anti Ig couplé à une peroxydase**
- **Du substrat spécifique à l'enzyme.**

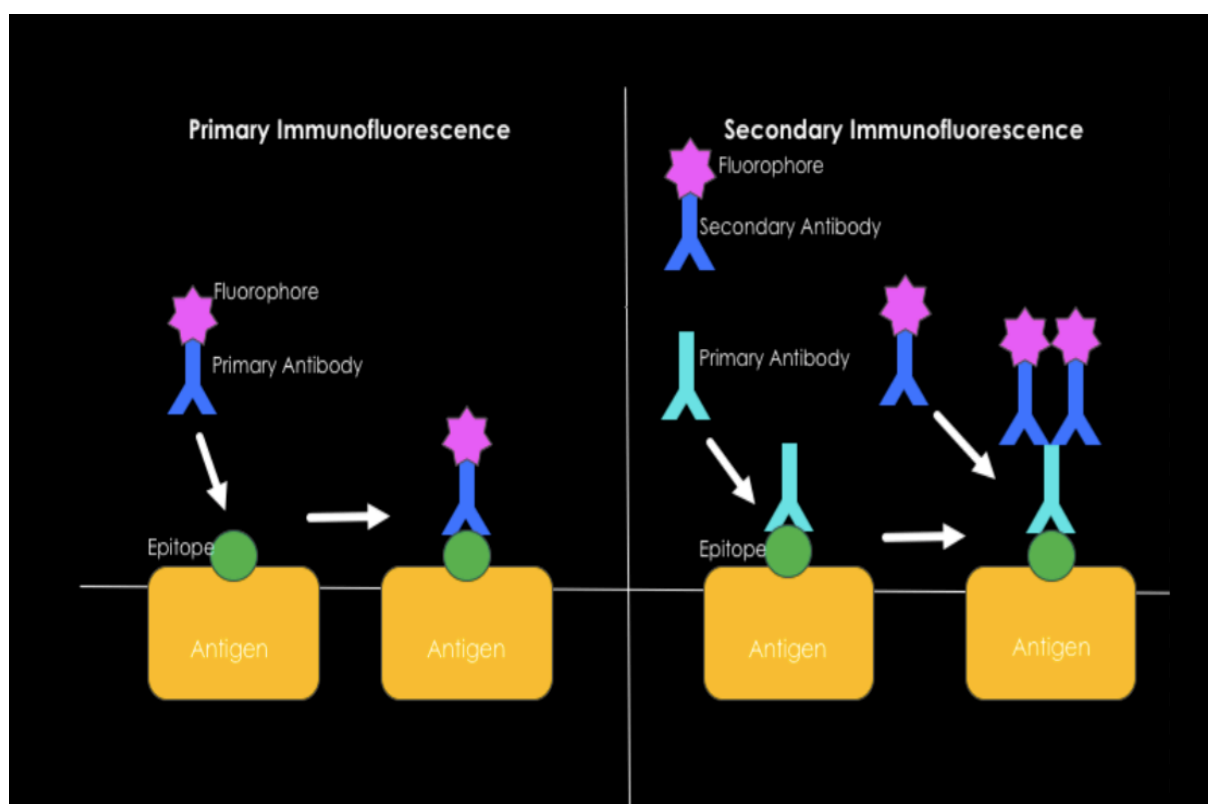
Le test comporte quatre étapes principales :

- **Fixation de l'antigène :** L'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.
- **Fixation de l'anticorps à doser :** On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d'anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.
- **Fixation de l'anticorps de détection :** On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anticorps anti Ig qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- **Révélation :** On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.



2.3 IMMUNO-DOASAGE AVEC MARQUEUR FLUORESCENT : IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE ET INDIRECTE

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 est fixé de façon covalente à l'anticorps spécifique et permet la détection directe de l'antigène à analyser. On peut en outre utiliser des Ac anti-Ig fluorescents pour détecter des anticorps fixés sur l'antigène tissulaire on parle alors dans ce cas d'immunofluorescence indirecte. La lecture des coupes tissulaires ou des cellules ainsi marquées est réalisée à l'aide d'un microscope UV à fluorescence.



3. IMMUNO TRANSFERT OU WESTERN BLOTTING

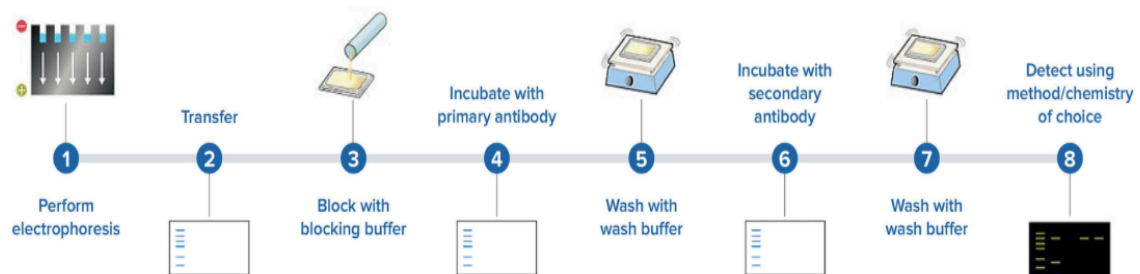
Le **Western Blot** (aussi appelé immunotransfert) est une technique employée pour analyser des protéines individuelles dans un mélange protéique (par ex., un lysat de cellules). Dans le cadre du Western blot (immunotransfert), le mélange protéique est soumis à une électrophorèse sur gel dans une matrice porteuse afin de trier les protéines par **taille**, **charge**, ou toute autre différence au sein des bandes individuelles de protéines. Les bandes de protéines séparées sont ensuite transférées vers une membrane porteuse. Ce procédé porte le nom de **transfert**. Les protéines adhèrent à la membrane de la même manière qu'elles ont été

séparées en raison des interactions entre les charges. Les protéines de cet immunotransfert peuvent ensuite être utilisées pour être liées à l'anticorps en vue de la détermination.

On utilise des anticorps pour détecter des protéines cibles sur le Western blot (immunotransfert). Les anticorps sont conjugués à des marqueurs **fluorescents** ou **radioactifs** ou encore à des **enzymes** pour provoquer une réaction suite à l'ajout d'un réactif, entraînant une coloration ou une émission de lumière qui favorise la détection.

Flux de travail d'un test Western Blot

Voici les étapes utilisées pour un test Western Blot typique :



4. REACTIONS D'AGGLUTINATION

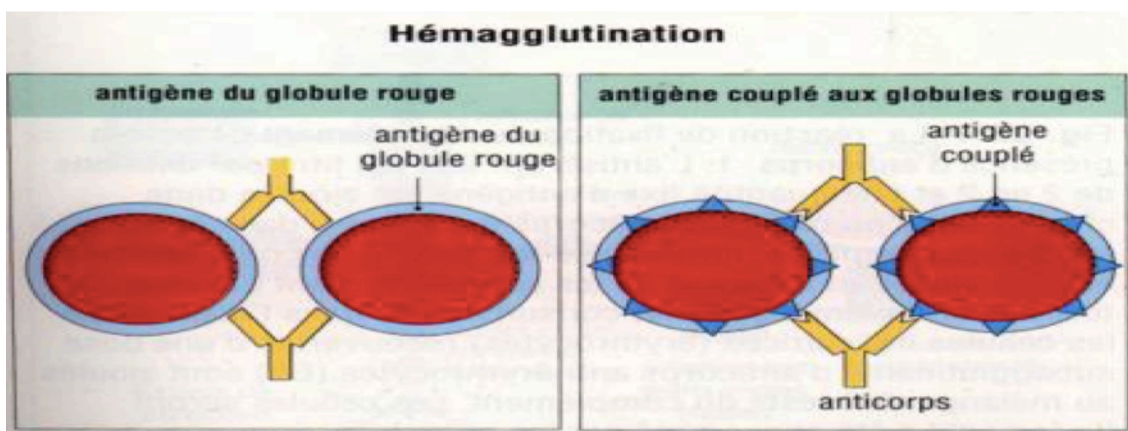
Lorsque l'antigène est présent à la surface d'une grosse particule, les anticorps peuvent induire son agglutination. Elle est de réalisation particulièrement aisée avec les bactéries et les érythrocytes, ces derniers pouvant être utilisés directement ou comme support d'antigènes solubles fixés à leur surface (hémagglutination passive) Ce principe est couramment utilisé pour la détermination des groupes sanguins et est appelé réaction d'hémagglutination directe. Dans ce cas, l'agglutination est induite en incubant des anticorps anti-A ou anti-B avec des hématies du sujet à grouper. Si le sujet possède à la surface de ses globules rouges l'antigène A (patient du groupe A), on observera une agglutination avec les anticorps anti-A mais pas avec les anticorps anti-B.

	Groupe A	Groupe B	Groupe AB	Groupe O
Globule Rouge				
Anticorps			Aucun	
Antigène	Antigène A	Antigène B	Antigène A et B	pas d'antigène

Antigènes et anticorps spécifiques des groupes sanguins.

4.1 Hémagglutination passive ou indirecte

Des hématies ou des particules inertes peuvent être recouvertes d'antigène et utilisées dans un test d'hémagglutination passive. Le couplage sur des hématies peut être obtenu par différents moyens, dont les plus classiques consistent à traiter les hématies par l'acide tannique, ce qui les rend capables de réagir spontanément avec des antigènes solubles comme des protéines ou des acides nucléiques, ou à les incuber avec les antigènes en présence de glutaraldéhyde. Les hématies jouent ici le rôle de support figuré inerte n'intervenant pas dans la réaction antigènes-anticorps. La présence d'anticorps agglutinants sera alors décelée par l'agglutination des hématies sur lesquelles l'antigène a été fixé.

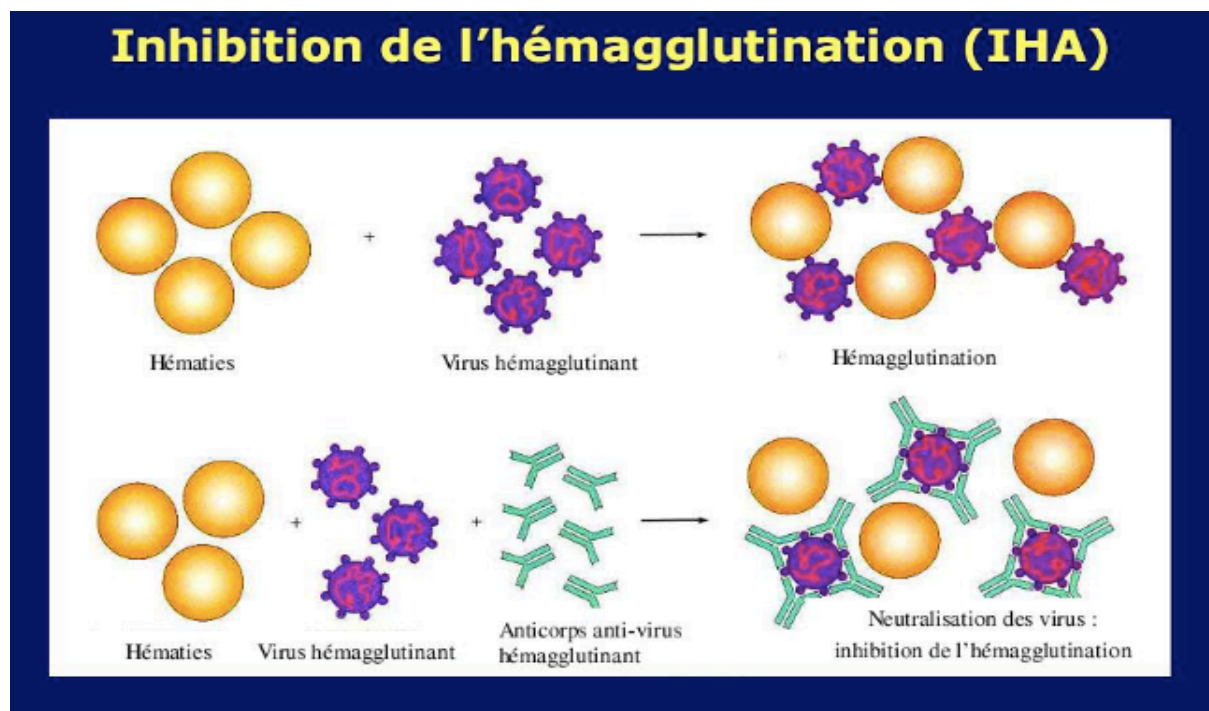


4.2 Inhibition de l'hémagglutination

Un grand nombre de virus possèdent des hémagglutinines sur leur enveloppe. Ils vont ainsi provoquer l'agglutination des globules rouges. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination met en jeu **un antigène viral** et **des anticorps antiviraux**, dirigés contre cette hémagglutinine, et les **récepteurs portés par les hématies**. Dans cette réaction, les anticorps antiviraux protecteurs se fixent sur le virus et empêchent sa combinaison avec les récepteurs des hématies introduites dans le deuxième temps de la réaction.

1- Si les anticorps reconnaissent leur antigène, le complexe immun formé neutralise la capacité hémagglutinante du virus et on aboutit à une hémagglutination négative.

2- Dans le cas où les anticorps ne correspondent pas au virus isolé, le complexe immun ne se forme pas et le virus peut induire une hémagglutination.



5. REACTIONS UTILISANT LE COMPLEMENT

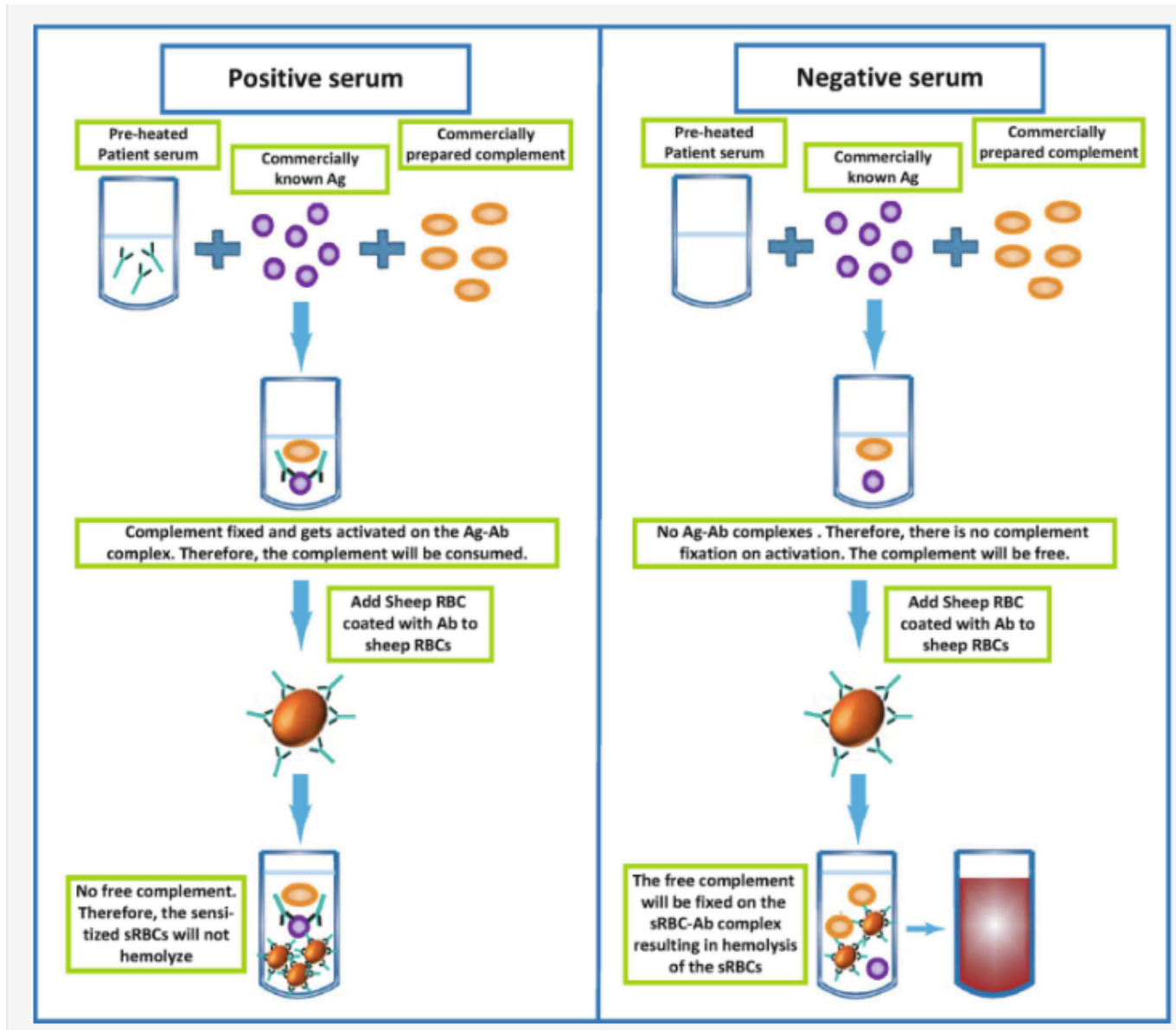
Le système du complément est un système de protéines sériques qui réagissent avec les complexes antigène-anticorps. Si cette réaction se produit sur une surface de cellule, cela se traduira par la formation de pores transmembranaires et donc la destruction de la cellule. Les étapes de base d'un **test de fixation du complément** sont les suivantes :

- le sérum est prélevé; les individus ont naturellement différents niveaux de protéines du complément dans leur sérum. Pour annuler tous les effets que cela pourrait avoir sur le test, les protéines du complément dans le sérum du patient doivent être détruites et remplacées par une quantité connue et standardisée de protéines du complément ;
- le sérum est chauffé de telle manière que toutes les protéines du complément, mais aucun des anticorps, en son sein sont détruits. Ceci est possible parce que les protéines du complément sont beaucoup plus sensibles à la destruction par la chaleur que les anticorps,
- une quantité connue et standardisée de protéines du complément est ajoutée au sérum. Ces protéines sont souvent obtenues à partir de sérum de cobaye,
- l'antigène d'intérêt est ajouté au sérum ;
- des globules rouges (GR) de mouton qui ont été pré-liés à des anticorps anti- globules rouges de mouton sont ajoutés au sérum. **Le test est considéré comme négatif si la solution devient rose et positif autrement**

Test positif : si le sérum contient des anticorps contre l'antigène d'intérêt, ils se lieront à l'antigène pour former des complexes antigène-anticorps. Les protéines du complément réagiront avec ces complexes et seront épuisées. Ainsi, lorsque les complexes anticorps-GR sont ajoutés, il n'y aura plus de complément dans le sérum et les GR resteront intacts au fond du tube.

Test négatif : si aucun anticorps contre l'antigène d'intérêt n'est présent, le complément ne sera pas épuisé et il va réagir avec les complexes anticorps-GR ajoutés à l'étape 4, conduisant à la lyse des globules rouges qui vont déverser leur contenu dans la solution, donnant ainsi une solution rose¹.

Le test peut être fait quantitativement en mettant en place une série de dilutions du sérum pour déterminer le facteur de dilution le plus élevé donnant un test positif (absence de lyse des globules rouges). Ce facteur de dilution correspond au « titre » en anticorps.



6. REACTIONS DE PRECIPITATION

6.1 Réaction de précipitation en milieu gélifié

Lorsqu'un antigène et un anticorps sont introduits dans un milieu gélifié en des points différents, ils diffusent et des précipités peuvent se former au point de rencontre si le rapport des concentrations d'antigène et d'anticorps s'y prête. On distingue, selon le type de support sur lequel le gel est appliqué, l'immunodiffusion en tubes ou en plaques.

- **Immunodiffusion en tube**

Le principe de la technique consiste à remplir un tube de verre avec un gel d'agar dans lequel un anticorps a été préalablement incorporé, puis à appliquer une solution d'antigène

dans le tube. L'antigène progresse rapidement par simple diffusion dans le gel en créant un gradient de concentration. Si la concentration initiale d'antigène est suffisante, un précipité se forme au niveau du front de progression de l'antigène.

- **Immunodiffusion sur plaque (technique d'Ouchterlony) : caractérisation de la classe d'anticorps monoclonaux.**

L'adaptation en plaque de verre de la technique d'immunodiffusion en tube a représenté un progrès technique important. Les tubes sont remplacés par des plaques dans lesquelles sont creusés des puits. Les solutions d'antigènes et d'anticorps, placées dans des puits différents, diffusent librement dans le gel et donnent lieu à des précipités à la zone d'équivalence. Cette technique en plaque est plus simple à mettre en œuvre que la technique en tube. Elle a surtout l'avantage de permettre la comparaison directe de différentes préparations d'antigène. Il suffit pour cela de placer les diverses préparations antigéniques dans différents puits disposés sur un cercle dont le centre est creusé d'un puits où la solution d'anticorps est introduite.

Lorsqu'une préparation d'antigène est introduite simultanément dans deux puits adjacents, **les traits de précipitation vont se rejoindre et fusionner**. C'est la **réaction d'identité**. Si au contraire, deux solutions antigéniques différentes sont disposées dans deux puits adjacents, **les traits de précipitation vont se couper**. C'est la **réaction de non identité**. Enfin, si deux solutions antigéniques donnent lieu à **des réactions croisées**, **les bandes vont fusionner mais on note cependant au delà du point de fusion des deux précipités, une projection qui prolonge le précipité formé par l'antigène**. C'est la **réaction d'identité partielle (formation d'un éperon)**.



a) Une réaction d'identité: les solutions 1 et 2 contiennent le même antigène A qui donne avec l'antisérum deux lignes de précipitation, qui sont identiques d'un point de vue sérologique.

b) Une réaction de non-identité: la solution 1 et la substance B de la solution 3 sont sérologiquement différentes, les complexes immuns précipitent indépendamment.

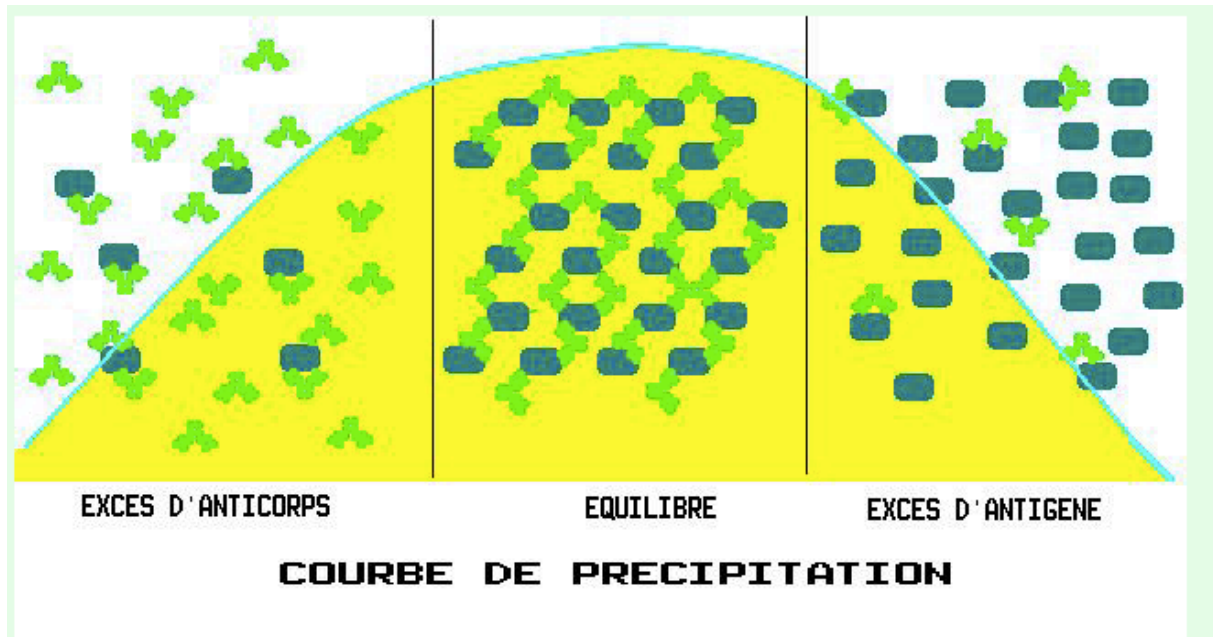
c) Une réaction d'identité partielle: les déterminants antigéniques de A (solution 1) existent aussi dans la substance C (solution 4), mais A possède aussi des déterminants antigéniques que C ne possède pas.

6.2 Réaction de précipitation en milieu liquide

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

En effet, dans la réaction de précipitation, si des quantités croissantes d'antigène soluble sont ajoutées à une quantité connue de sérum contenant l'anticorps à doser, on observe dans un premier temps une corrélation directe entre la quantité d'antigène apportée et la quantité de précipité. La courbe de précipitation atteint alors un maximum et si la quantité d'antigène augmente encore, on note que la quantité de précipité tend cette fois à diminuer.

- **Situation d'excès d'anticorps** : Lorsque de faibles quantités d'antigène sont ajoutées à l'anticorps, les complexes Ag/Ac sont formés dans des conditions où l'anticorps est en excès. Ainsi, chaque molécule d'Ag est couplée à plusieurs molécules d'anticorps.
- **Zone d'équivalence** : Au fur et à mesure que la quantité d'antigène augmente, certains anticorps vont pouvoir lier plusieurs antigènes différents. A la zone d'équivalence, lorsque toutes les molécules d'Ac sont liées à deux molécules d'antigènes différentes, il se forme alors un grand réseau qui favorise la réaction de précipitation.
- **Situation d'excès d'antigène** : Lorsque la quantité d'antigène est très élevée, seuls de petits complexes peuvent se former, la taille réduite de ces complexes favorise leur solubilité expliquant ainsi l'inhibition de la réaction de précipitation observée en excès d'antigène.



6.3 Néphélométrie

La précipitation de complexes antigène/anticorps en milieu liquide peut permettre un dosage très précis des antigènes. En effet, la formation de ces complexes entraîne une augmentation de la turbidité du milieu qui, à concentration d'anticorps constante, ne dépend que de la quantité de l'antigène à doser. Les variations de turbidité du milieu sont mesurées à l'aide d'un néphélomètre. Cet appareil possède un rayon laser dont le faisceau traverse la cuve où a lieu la réaction antigène/anticorps. L'augmentation de turbidité du milieu entraîne une déviation du faisceau qui est analysée par des photomultiplicateurs et comparée à la déviation obtenue avec des quantités connues d'antigène. On en déduit la quantité d'antigène présente dans l'échantillon à doser. Ce principe est couramment employé pour doser une multitude de protéines sériques comme par exemples les immunoglobulines ou les fractions du complément.