

## Techniques immunologiques sans marquage

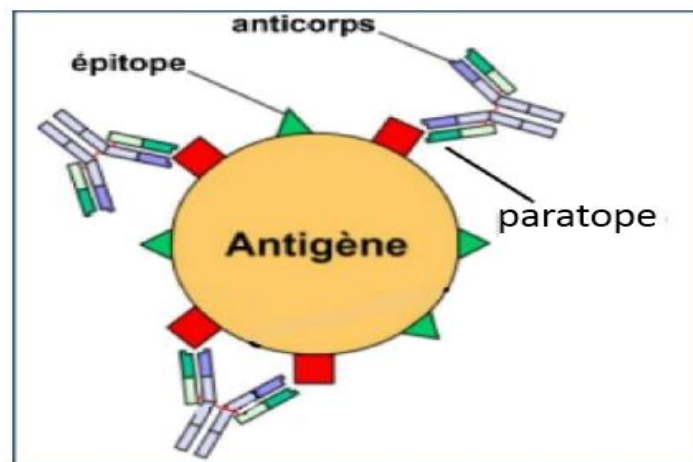
### I. Introduction :

Afin de **quantifier et/ou de détecter** la présence d'un Ag et/ou d'un Ac une variété de **techniques immunologiques** existe

Elles sont utilisées pour :

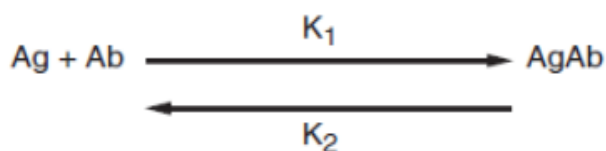
1. **Le diagnostic des maladies** : maladies auto-immunes, allergiques ou infectieuses
2. **Le contrôle du niveau d'une réponse immunitaire humorale** : post-infectieuse, post- vaccinale ou post-transplantation
3. **L'identification de molécules d'intérêt biologique ou médicale**
  - Ces techniques diffèrent entre elles par **leur rapidité** et **leur sensibilité**, leur caractère **qualitatif ou quantitatif**
  - Toutes les techniques immunologiques sont basées sur la formation des complexes immuns Ag- Ac

CI = Ag - Ac spécifique → Interaction épitope - paratope



### I. Réaction Ag-Ac :

- ❑ Toutes les réactions antigène-anticorps sont :
  - ✓ **Réversibles** : basée sur 4 types de liaisons **non-covalentes**
  - ✓ **Régies par la loi d'action de masse**: stipule que les réactifs libres sont en équilibre avec les réactifs liés
    - ✓ Liaisons ionique
    - ✓ Liaisons hydrogènes
    - ✓ Liaisons hydrophobes
    - ✓ Liaisons de van der Waals



A l'équilibre

$$K_1/K_2 = [\text{AgAb}]/[\text{Ag}][\text{Ab}] = K_a$$

**Ka** : la constante d'équilibre concernant **un seul site d'interaction** Ab et Ag → **Afinité**

➤ L'association des multiples affinités que peut avoir un Ac pour un Ag → **Avidité**

• L'interaction des paratopes- épitopes dépend de 02 caractéristiques de l'Ac:

#### 1. Affinité :

la force d'attraction initiale qui existe entre un seul site Fab sur une molécule d'Ac et un seul épitope ou site de détermination sur l'Ag correspondant

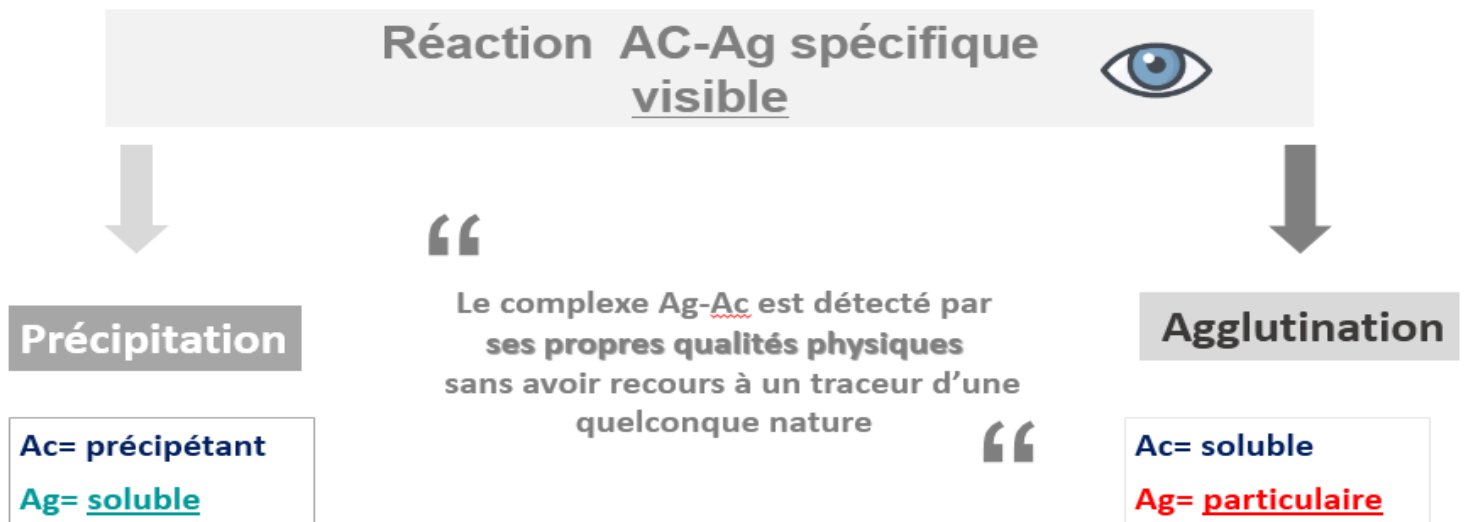
#### 2. Avidité :

Représente la somme de toutes les forces d'attraction entre un antigène et un anticorps

Comment révéler l'interaction Ag-Ac(CI)?

- Techniques immunologiques : tests manuels OU tests automatisés
- Visualiser la réaction Ag – Ac par deux types de techniques:
  - ✓ Sans marquage
  - ✓ Avec marquage

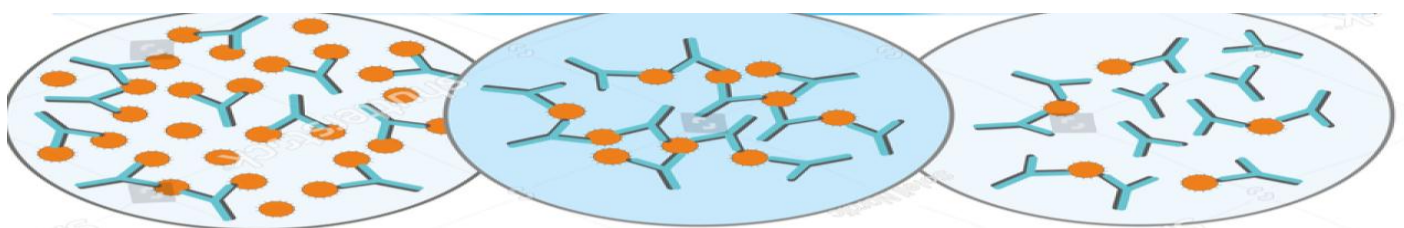
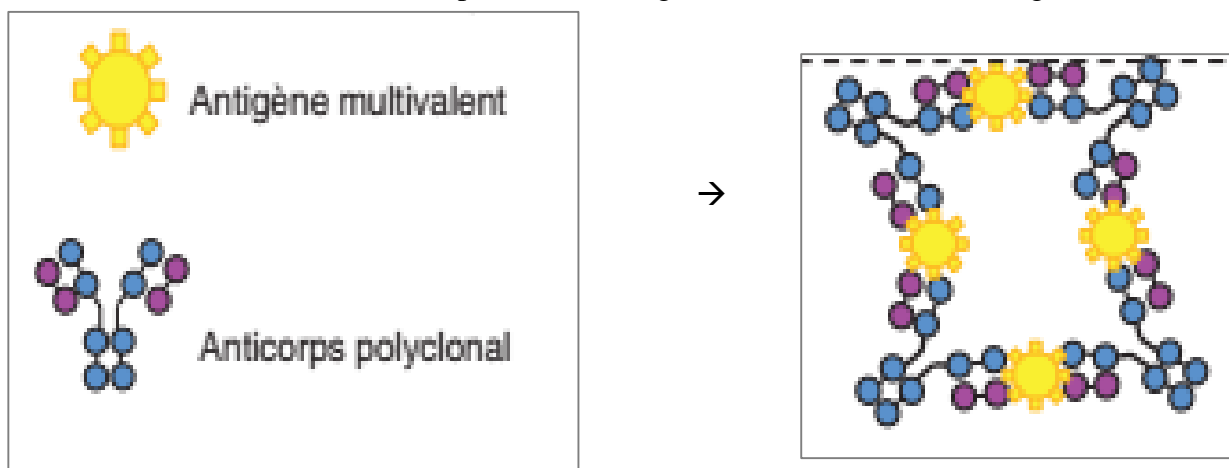
## II. Techniques sans marquage :

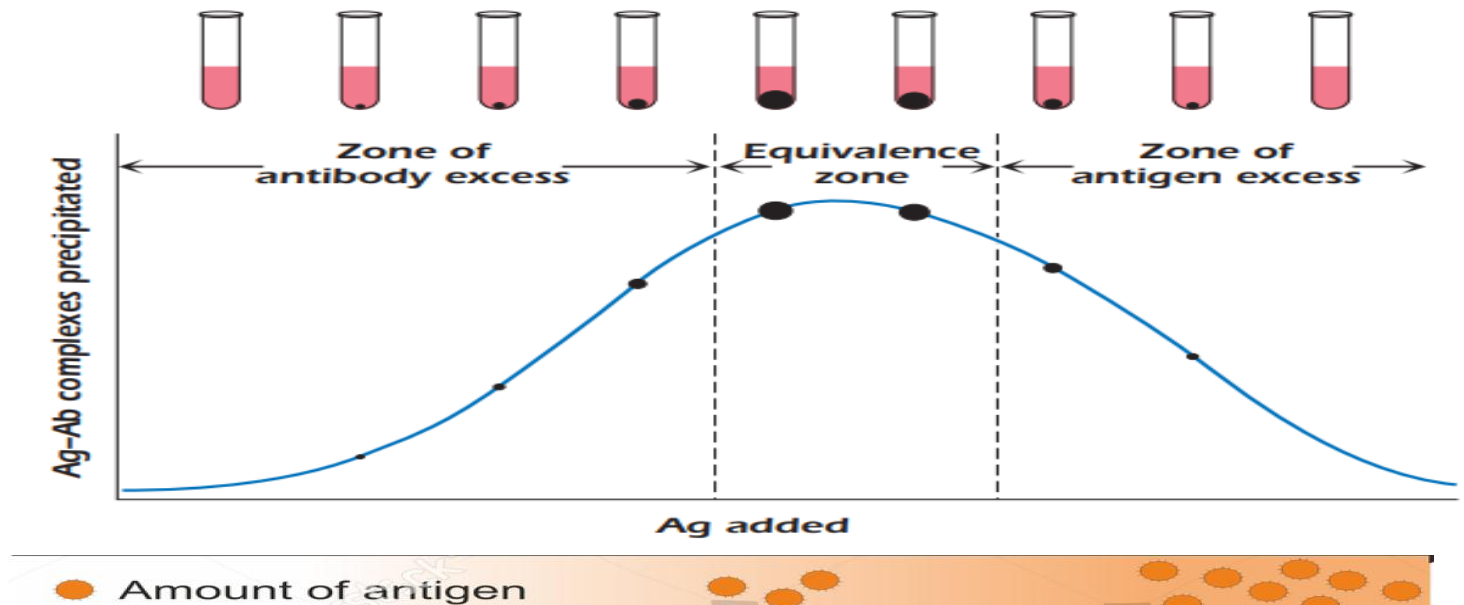


## Techniques basées sur la réaction d'immuno- précipitation :

### I. Réaction d'immuno- Précipitation ????????

- ❑ Met en jeu des antigènes solubles et des **anticorps spécifiques précipitants**
  - La formation de complexes immuns aboutit à un **édifice multimoléculaire** qui peut dans certaines conditions précipiter en solution
- ✓ Les antigènes sont **solubles** et **multivalent**
- ✓ Les anticorps sont **précipitants**, **polyclonaux**( IgG +++, IgA++, IgM)
- ✓ Les **concentrations de l'Ag et de l'Ac** doivent être dans la zone d'équivalence
  - Formation d'un complexe immun Ag-Ac sous forme d'un réseau grand et stable





La courbe de précipitation montre comment la quantité de précipitation varie en fonction de la concentration d'antigène lorsque la concentration d'anticorps est maintenue constante.

**ZONE D'ÉQUIVALENCE** • La précipitation optimale se produit lorsque le nombre de sites multivalents de l'antigène et de l'anticorps est approximativement égal. • Chaque anticorps se lie à plus d'un antigène et vice versa, formant un réseau ou treillis stable.

• **HYPOTHÈSE DU TREILLIS** – formulée par Marrack o Basée sur les hypothèses selon lesquelles chaque molécule d'anticorps doit avoir au moins deux sites de liaison et l'antigène doit être multivalent. Lorsqu'ils se combinent, cela donne un treillis multimoléculaire qui augmente de taille jusqu'à ce qu'il précipite hors de la solution.

**PROZONE** • Zone d'excès d'anticorps ; aucun réseau ni liaisons croisées ne se forment. Généralement, un seul site sur une molécule d'anticorps est utilisé et de nombreuses molécules d'anticorps libres restent en solution. •

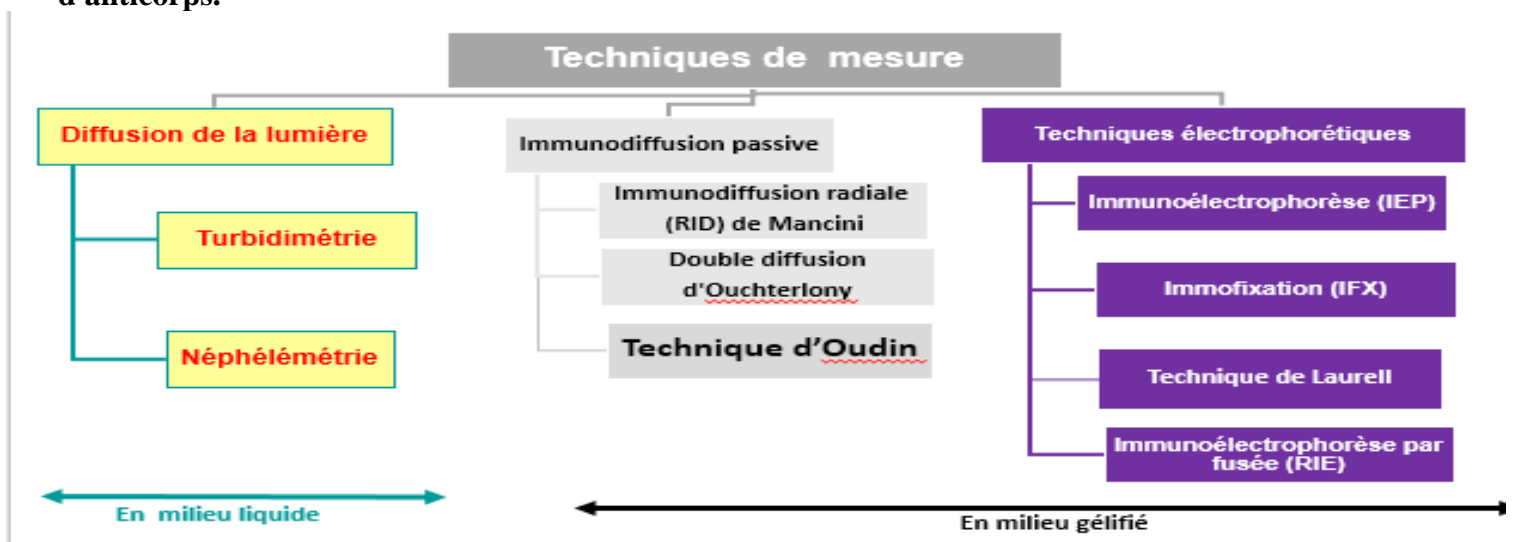
**DILEMME** : la prozone est une cause de réactions faussement négatives.

• **MESURE CORRECTIVE** : l'échantillon (anticorps) est dilué avant de refaire le test.

**POSTZONE** • Zone d'excès d'antigène ; aucun réseau ni liaisons croisées ne se forment. Chaque site d'anticorps disponible est lié à un seul antigène.

• **DILEMME** : la postzone est une cause de réactions faussement négatives.

• **MESURE CORRECTIVE** : le nouveau test est effectué sur un échantillon de patient supplémentaire prélevé environ une semaine plus tard, ce qui donne le temps à une production supplémentaire d'anticorps.



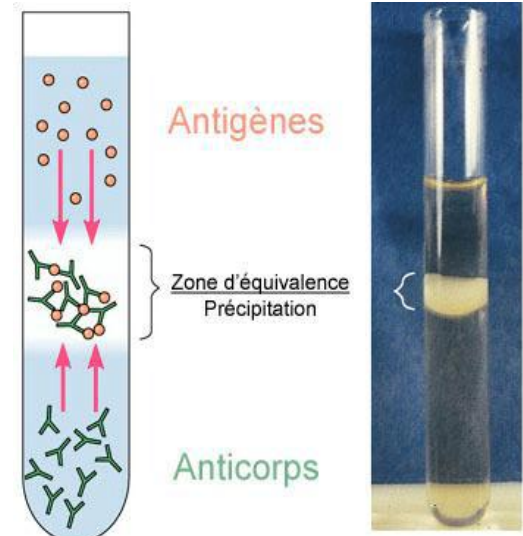
**Méthodologie:**

- Selon le milieu dans lequel se déroule la réaction :
- Ces réactions peuvent s'observer : \* Soit en milieu liquide \* Soit en milieu gélifié.

Selon le procédé : \* Techniques passives \* Techniques accélérées par un champ électrique

**A. Immuno-précipitation en milieu liquide****1. Test de l'anneau ou Ring-test :**

- Mettre en présence dans un étroit tube vertical un sérum contenant les anticorps recherchés et l'antigène correspondant
- Sans les mélanger de façon à laisser s'opérer la diffusion des molécules dissoutes entre les deux solutions
- Dans la zone d'équivalence, si les concentrations des deux entités sont adéquates, on observe la formation d'un anneau de précipitation blanchâtre à l'interface entre les deux solutions
- Traduit la formation de complexes immuns
- Si on introduit dans un tube de faible diamètre un Ag et un antisérum dirigé contre cet Ag, on voit se former un précipité à l'interface des 2 solutions
- cette technique qualitative visualise rapidement des CI

**2. Diffusion de la lumière****▪ Techniques quantitatives**

- Permettant la quantification des CI formés en se basant sur un des phénomènes suivants:

- ☐ Néphélémétrie
- ☐ Turbidimétrie

**▪ Techniques automatisables**

- Dosage des protéines spécifiques dans les différents liquides biologiques

- la mesure de lumière transmise produit un signal décroissant avec la taille du complexe immun
- La néphélémétrie, avec un angle précis, la lumière dispersée par les complexes immuns insolubles, qui se comportent comme des particules.
- La dispersion de la lumière par des particules en suspension est fonction de leur taille.

**Mesure de la turbidité ou de la nébulosité d'une solution.**

**• CE QU'ELLE**

- MESURE : réduction de l'intensité lumineuse due à la réflexion, à l'absorption ou à la

**diffusion**

- VALEURS ENREGISTRÉES : unités d'absorption (rapport de la lumière incidente à celle de la lumière transmise)

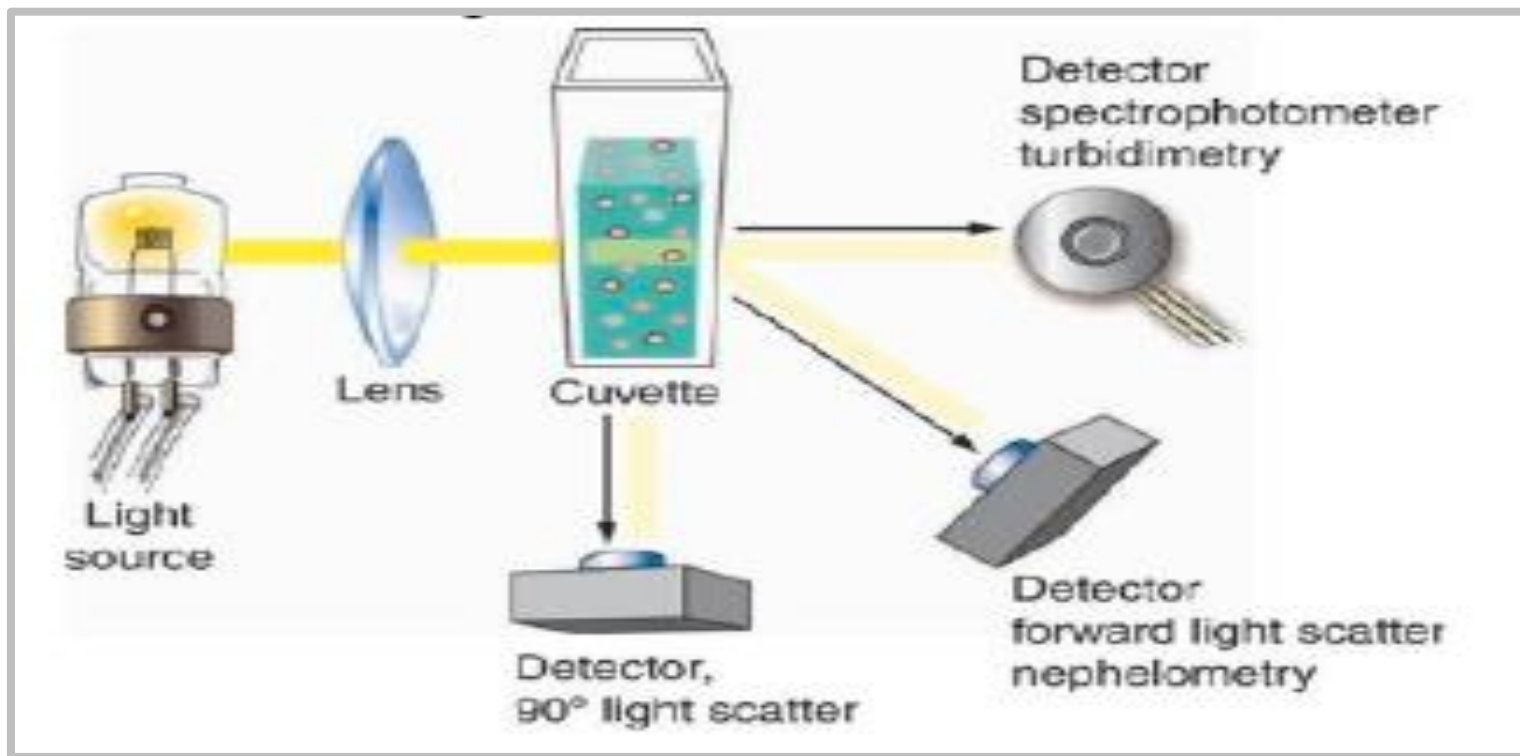
- INSTRUMENT : spectrophotomètre ou analyseur de chimie clinique automatisé

- MILIEU : liquide (solution)

**Néphélométrie**

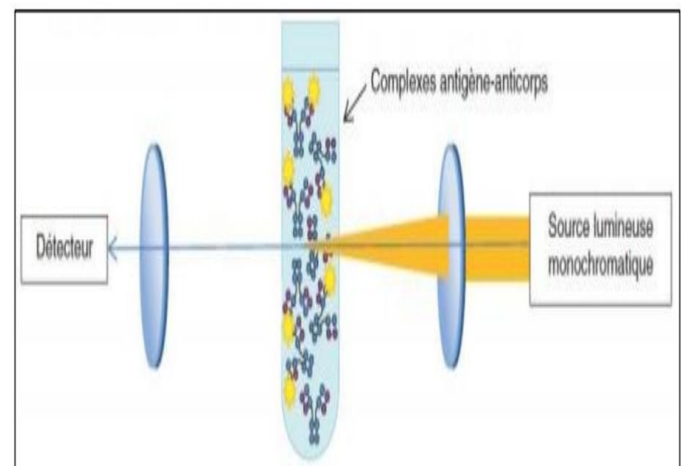
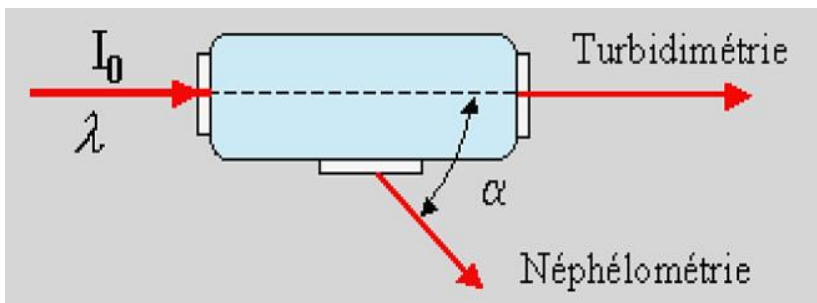
Mesure de la concentration d'une suspension en comparant sa transparence avec celle d'un témoin ; turbidité d'un milieu ; observation de la lumière diffractée selon un angle par rapport à la direction incidente.

De l'élément Néphél-, avec l'interfixe -o- et métrie, du grec νεφέλη (neféli – nuage, nuée).



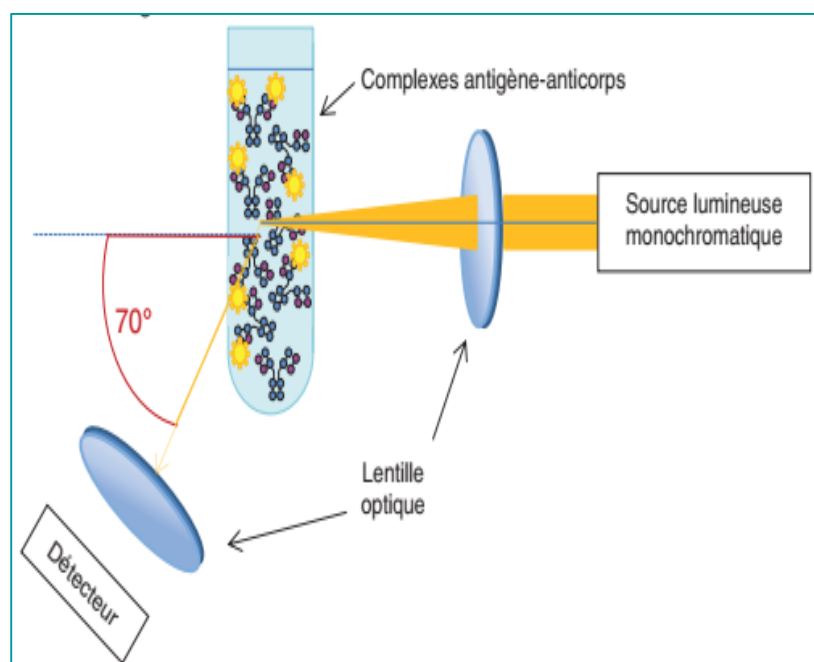
### TURBIDIMETRIE

- Dans ce cas on mesure **l'intensité de la lumière transmise** transversale
- Elle est inversement proportionnelle à la quantité des CI formés



### Néphélométrie :

- Les CIs insolubles formés se comportent comme des particules, dispersent la lumière
- Un **rayon LASER** traverse la cuve contenant d'éventuelles particules du précipité Ac/Ag
- les particules **diffraction la lumière avec un angle précis**
- **la lumière diffractée est mesurée** à la sortie par un photomultiplicateur (détecteur)
- L'intensité de la lumière diffractée est proportionnelle à la quantité des CI formés et donc à la concentration de la substance à doser





## 2. Immuno-précipitation en milieu liquide :

Turbidimétrie/Néphélémtrie :

### Application:

**Dosage quantitatif des protéines dans les différents liquides biologiques**

- ✓ PPA: CRP
- ✓ Ig: G/A/M/E
- ✓ CLL sériques/ Freelite test
- ✓ Fractions du Cpt
- ✓  $\alpha$  antitrypsine.....

### Avantages :

- **Spécificité des réactions**
- **Une grande sensibilité**
- Automatisation (gain de temps)

### Inconvénients :

- Caractéristiques optiques du sérum

## B. Immuno -précipitation en milieu gélifié :

### • Passives et celles accélérées par un champ électrique

- Les Ag et Ac **diffusent** dans le milieu gélifié
- La précipitation est obtenue dans la région du gel où l'Ag et l'Ac se trouvent dans des proportions permettant la formation du **réseau**
- Le gel utilisé retient les précipités dans ses mailles
- Le gel peut être vierge c'est-à-dire sans réactif ou incorporé de l'Ag ou de l'Ac
- Révélation du précipité à l'œil nu avec ou sans coloration après plusieurs heures à quelques jours de la réaction

**IMMUNODIFFUSION PASSIVE** • Utilise un milieu de support tel qu'un gel pour démontrer la précipitation Ag-Ab.

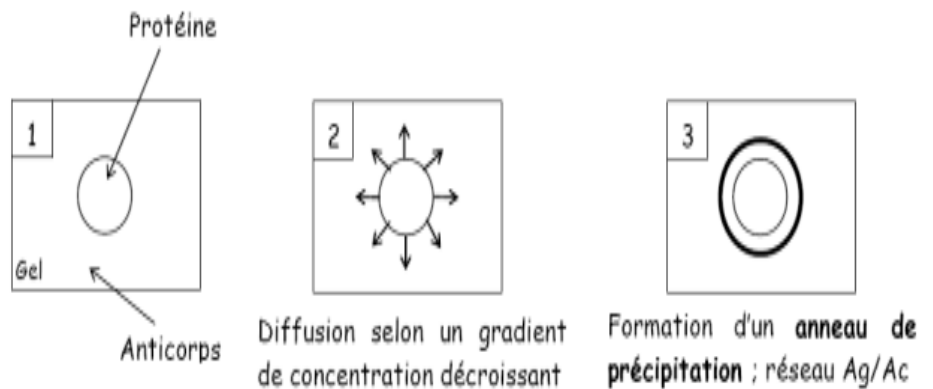
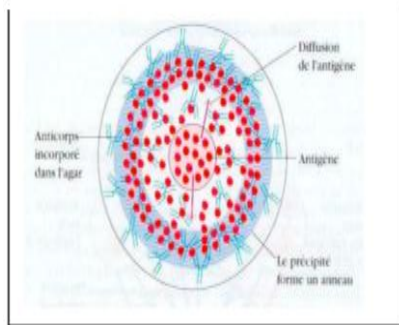
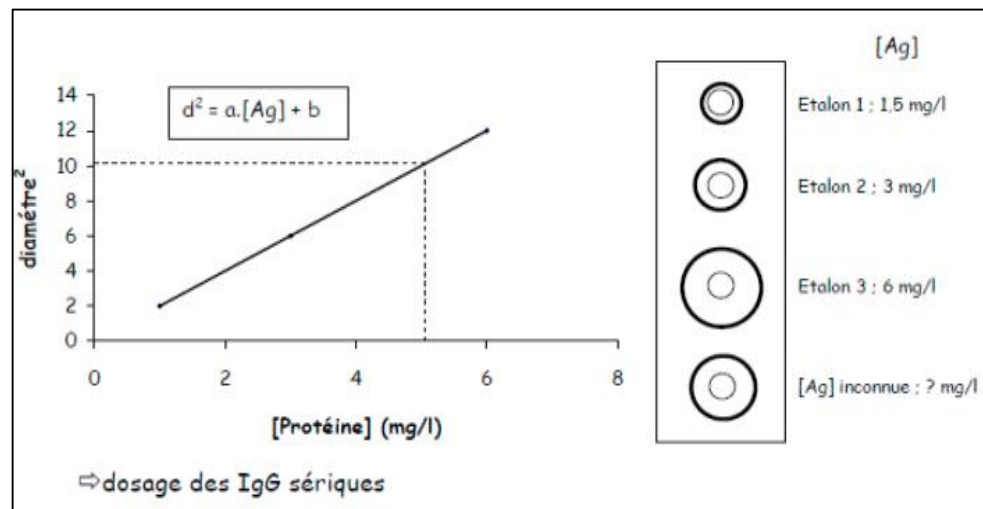
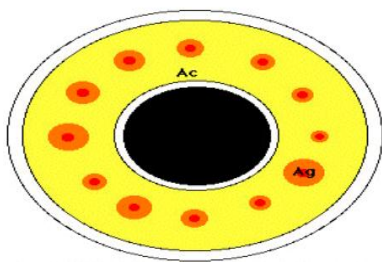
• **MÉTHODE** : La combinaison Ag-Ab se produit par diffusion et aucun courant électrique n'est utilisé pour accélérer le processus. • **MILIEU** : 0,3-1,5 % d'agar ou de gel d'agarose (agar purifié), stabilise la diffusion et permet la visualisation des bandes de précipitation. o L'agarose est préférée à l'agar, car l'agar a une forte charge négative, tandis que l'agarose n'en a presque pas. • **Facteurs affectant le taux de diffusion** o Taille des particules – Diminue le taux o Température – Augmente le taux o Viscosité du gel – Diminue le taux o Quantité d'hydratation – Augmente le taux

### **1/ Immunodiffusion radiale de Mancini**

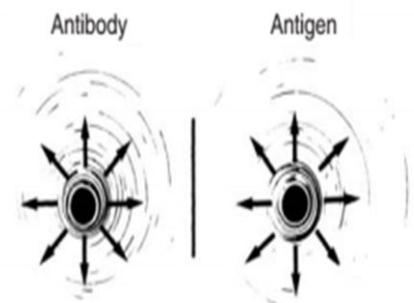
### **Immunodiffusion passive**

- Technique qualitative ou quantitative
- Le gel est **incorporé** de l'Ac
  - L'Ag est déposé dans un puits creusé dans le gel, il diffuse (pendant 2- 10 jours) dans de l'agar contenant une dilution donnée de l'Ac
  - une précipitation visible se produit dans la zone d'équivalence sous forme **d'anneaux dont le diamètre est proportionnel à la concentration**
    - Elle est longue (**48H**) et peu sensible non adaptée aux faibles concentrations

Pour la méthode du point final ou la méthode cinétique, il est essentiel d'utiliser un antisérum monospécifique avec une affinité assez élevée. Cela augmente la clarté de la réaction de précipitation. De plus, la précision du test est directement liée à la mesure précise des échantillons et des normes. Les sources d'erreur comprennent le remplissage excessif ou insuffisant des puits, l'entaille des côtés des puits lors du remplissage, le déversement de l'échantillon en dehors des puits, une durée et une température d'incubation inappropriées et une mesure incorrecte.

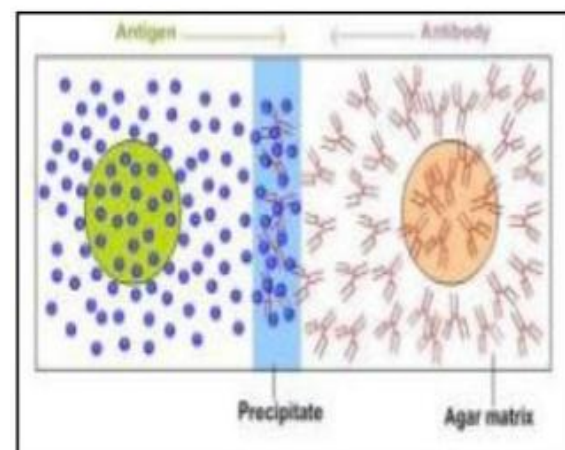
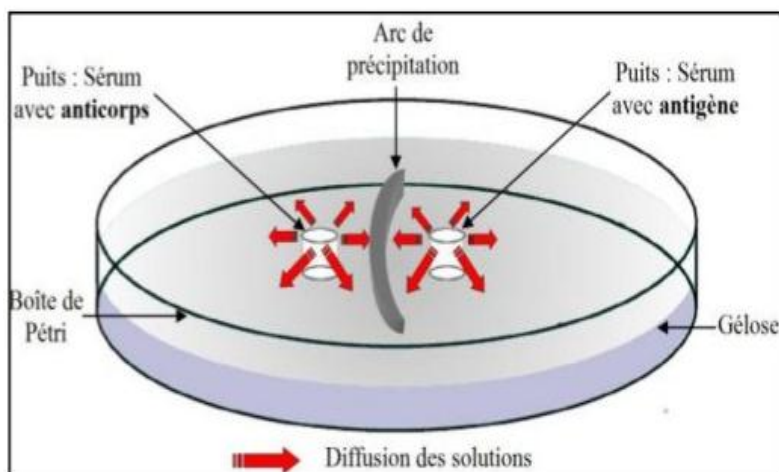
**a. Test qualitatif :****b. Test quantitatif:****2/Double diffusion d'Ouchterlony****❑ L'immunodiffusion double :**

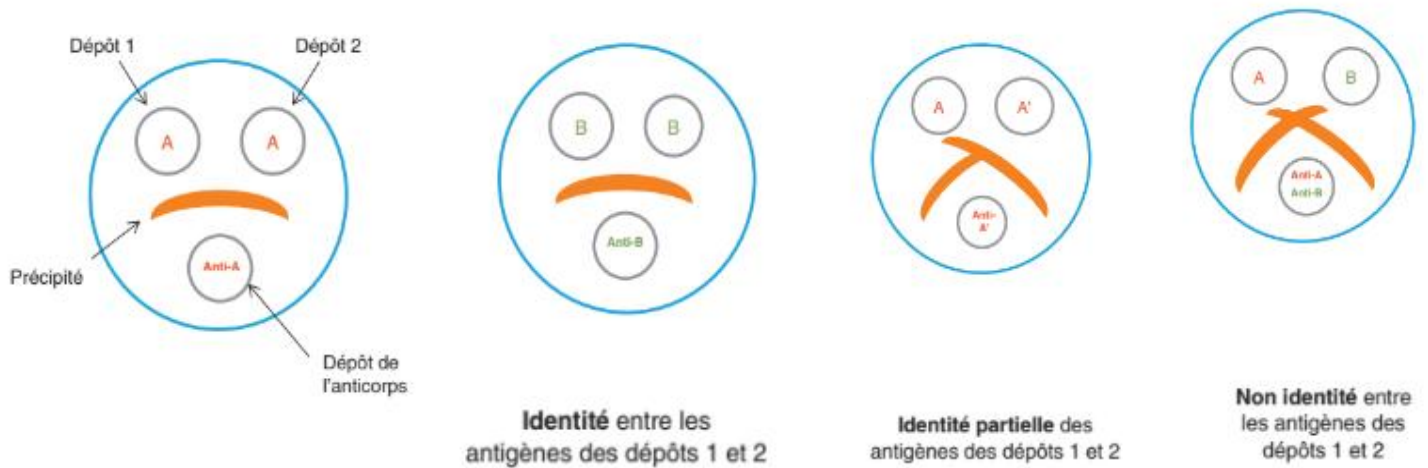
- L'Ag et l'Ac diffusent indépendamment à travers un milieu semi-solide en deux dimensions
- Les plaques d'Ouchterlony sont configurées avec un puits central entouré de 04 à 06 puits extérieurs équidistants
- La diffusion dure 48h, aux concentrations optimales (zone d'équivalence)
- Il y a formation d'une ou plusieurs lignes de précipitation

**Immunodiffusion passive**

Les Ag et les Ac sont déposés dans les puits et diffusent passivement dans la gélose.

La diffusion dépend de la taille des molécules et de la concentration du gel. Plus ces paramètres sont élevés moins la diffusion est importante.





Les molécules diffusent uniquement en fonction de leur masse moléculaire et il se forme des lignes de précipitation pour chaque système antigène–anticorps aux zones d'équivalence respectives

Cette méthode permet, en déposant plusieurs solutions antigéniques différentes en regard d'un antiserum monospécifique au sein d'une rosace de six puits périphériques disposés autour d'un puits central, d'analyser les identités entre les différents constituants.

### Technique qualitative.

❖ Elle permet de:

- Déterminer la pureté d'une solution antigénique
- Déterminer l'identité (totale ou partielle) ou la non identité entre 2 solutions antigéniques

### Exemple d'application : la recherche et identification de la protéinurie de Bences-Jones

- **Qualitative**
- Difficile interprétation

On constate que : · Les lignes issues de deux systèmes Ag-Ac identiques fusionnent pour ne plus former qu'une seule ligne continue : réaction d'identité. · Les lignes issues de deux systèmes Ag-Ac qui ont des épitopes en commun, donnent une image en éperon correspondant à une réaction d'identité partielle. · Les lignes formées par deux systèmes Ag-Ac indépendants se coupent donnant une réaction de non identité. Il s'agit donc d'une technique qualitative et comparative avec diffusion de plusieurs jours qui permet de : \* Vérifier la pureté d'une solution. \* Rechercher une protéine dans un mélange. \* Vérifier la possibilité de présence d'épitopes communs entre deux protéines

## 1. Immunoélectrophorèse ou IEP

### Accélérées par un champ électrique

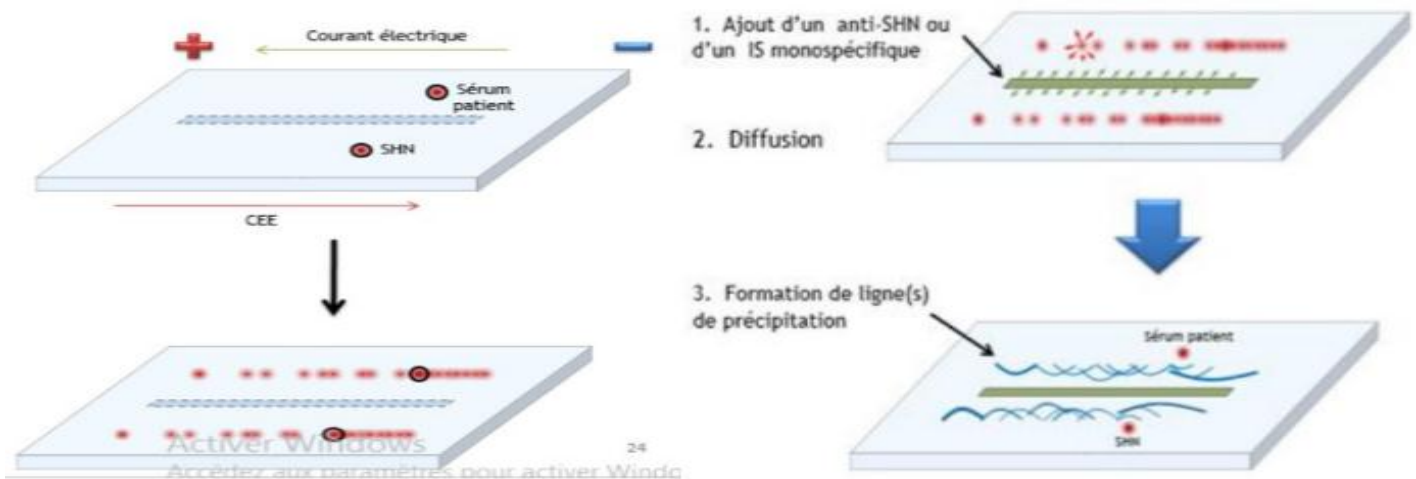
- Permet d'identifier des antigènes dans un mélange en fonction de leur mobilité électrophorétique
- Il s'agit d'une technique qualitative
- Elle est utilisée essentiellement dans le typage des CMs dans les gammopathies monoclonales
- **Technique réalisée en deux temps:**

**1ère étape:** électrophorèse des protéines

**2ème étape:** immunodiffusion ou immunoprécipitation

- Met en jeu une séparation électrophorétique des protéines dans un gel d'agarose, suivie d'une double diffusion selon une direction perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique contre un antiserum
- Formation d'arcs de précipitation
- On peut utiliser des antisérums globaux reconnaissant les protéines majeures du sérum ou des antisérums spécifiques

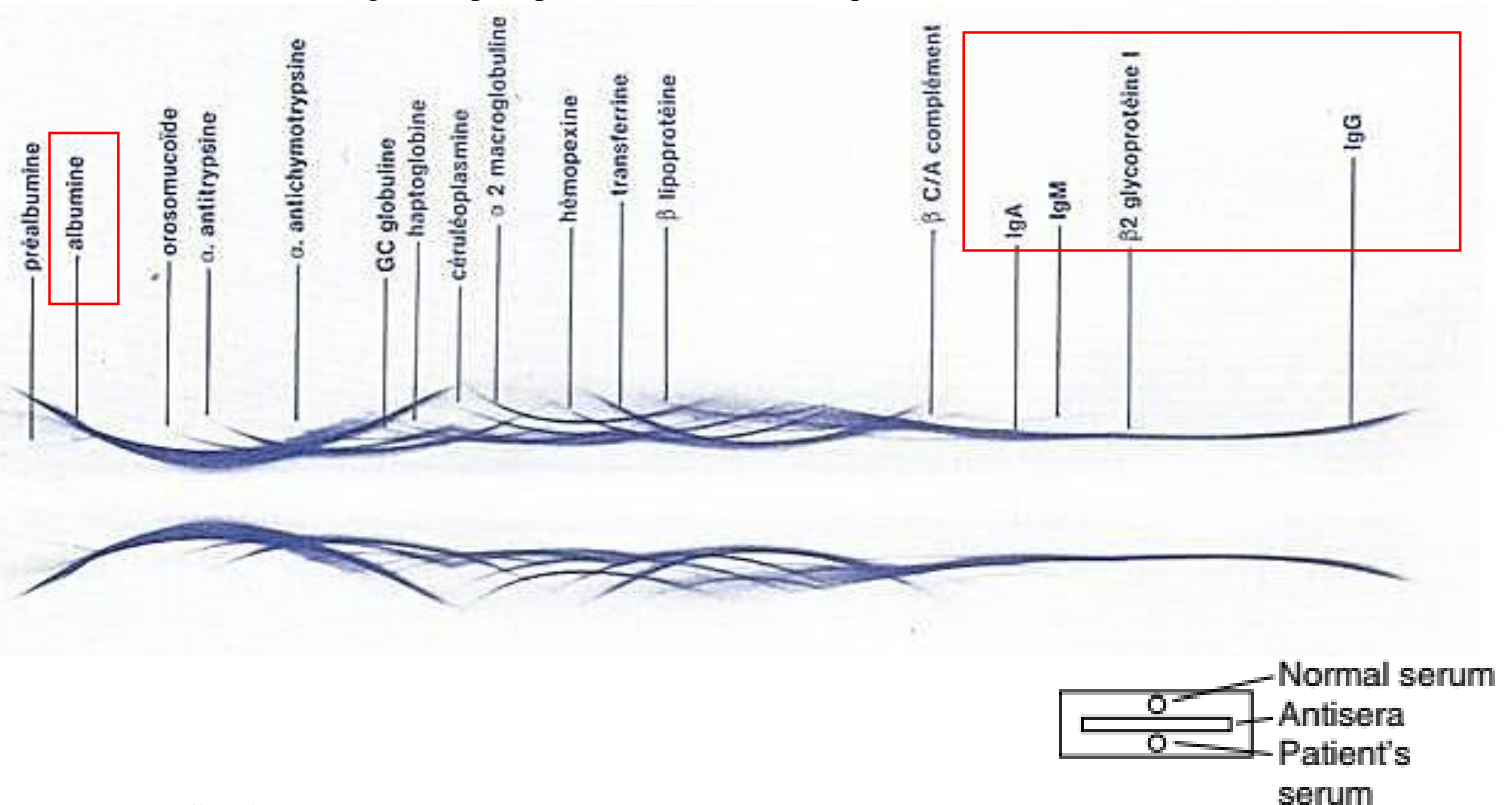




Elle combine une électrophorèse et une immunodiffusion d-ouble

i- Electrophorèse . séparation des constituants d'un mélange d'Ag selon leur charge électrique et leurs poids moléculaires.

i• Immunodiffusion : dépôt des immuns sérums dans la gouttière centrale, diffusion de l'Ac et l'Ag l'un vers l'autre et formations de lignes de précipitation dans la zone d'équivalence.



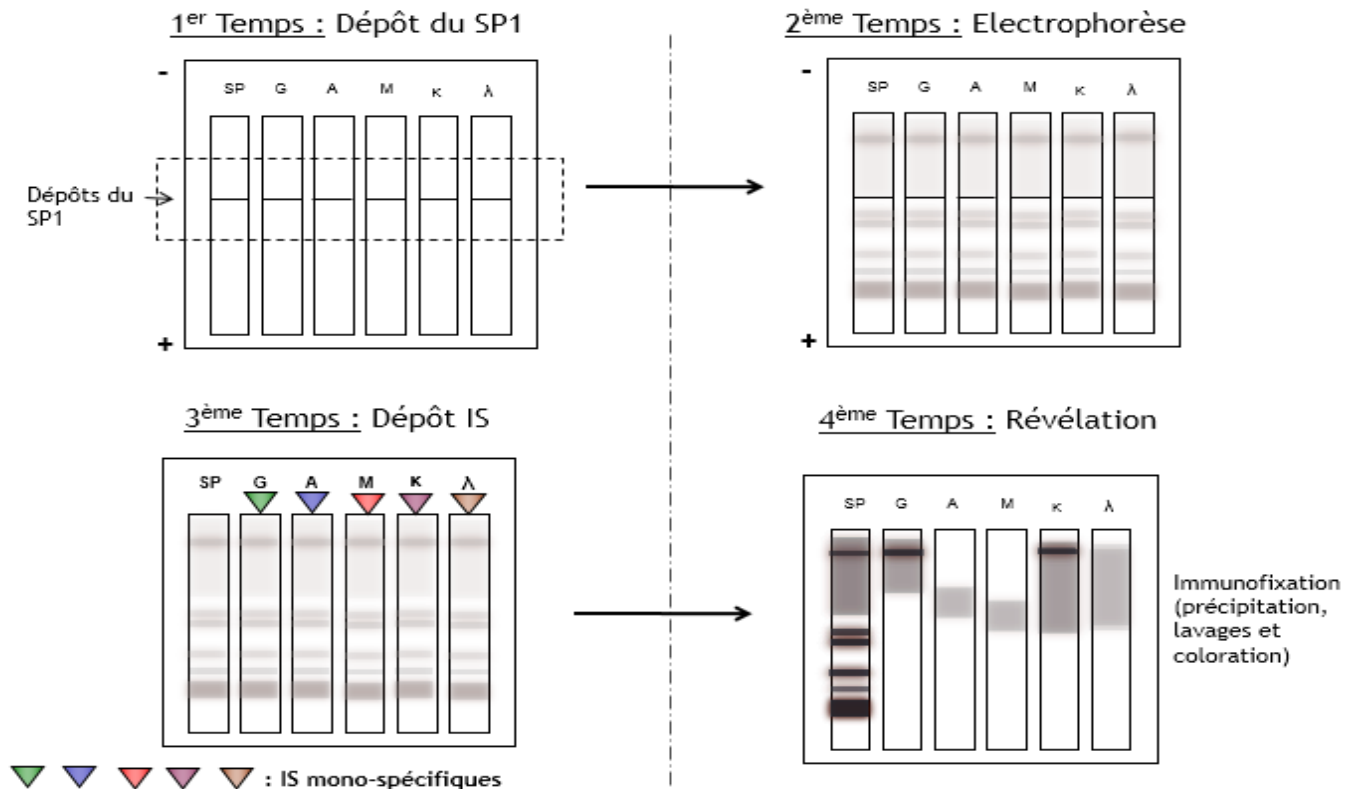
## 2. Immunofixation

- C'est une technique proche de l'IEP mais plus rapide

Qualitative, et réalisée en deux temps :

1. **Électrophorèse** : un mélange est soumis en plusieurs pistes à une séparation électrophorétique
  2. **Immunoprécipitation** : chaque piste électrophorétique est incubée avec un antisérum monospécifique qui précipite la fraction correspondante
- L'IFX est **plus sensible** que l'IEP et utilisée uniquement pour la recherche des composants monoclonaux au cours du diagnostic des gammopathies monoclonales

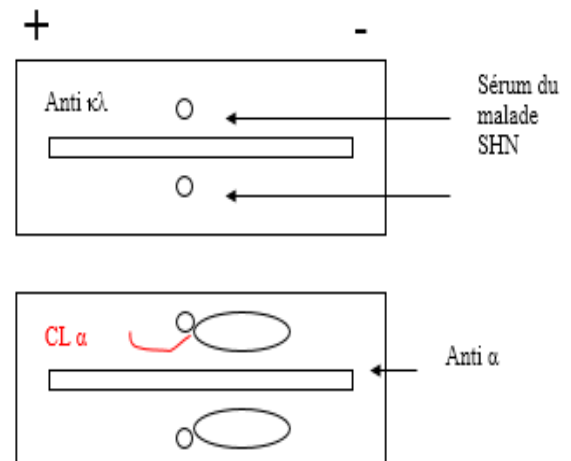
## Immunofixation



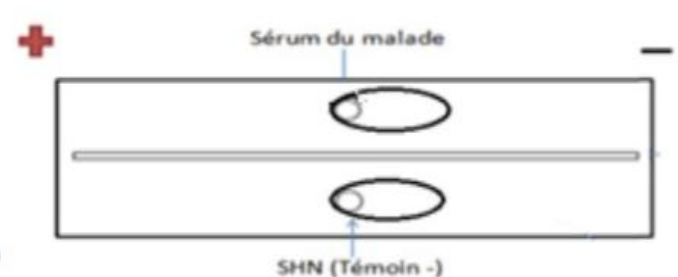
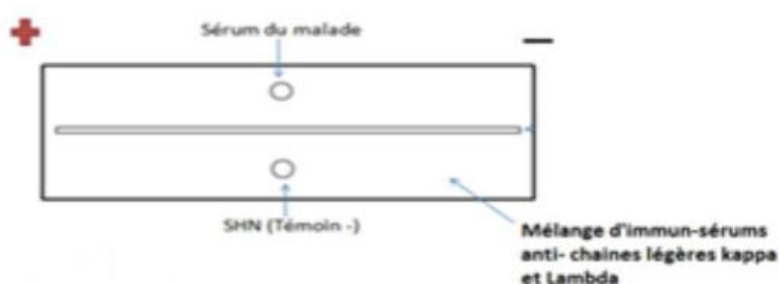
## II. Immuno-précipitation dans un milieu de support

### Immuno-sélection

- on incorpore des sérums anti-chaînes légères kappa et lambda
- On creuse un puits pour y déposer le sérum du malade, en parallèle un autre puits pour le témoin (sérum humain normal : SHN)
- Après séparation électrophorétique, on dépose dans la rigole centrale des antichaînes lourdes alpha
- Après diffusion et coloration, la présence de la chaîne lourde alpha est objectivée par la présence d'une ligne supplémentaire de migration anodique (les Ig entières ayant été précipité par les anti chaînes légères)
- **MCL: M.E.E chaîne lourdes**



- La maladie des chaînes lourdes alpha (lymphome méditerranéen) est caractérisée par la production de chaînes lourdes non associées aux chaînes légères
- Dans un premier temps : Electrophorèse au sein du gel incorporé d'anti-K et anti-λ
- Précipitation des toutes les Ig entières du sérum s/f d'obus



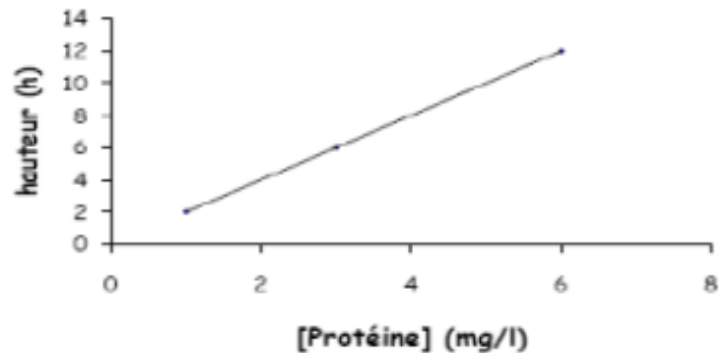
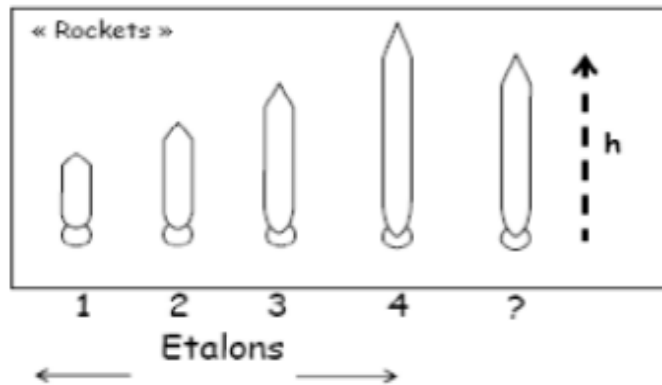
- **Dans un 2<sup>ème</sup> temps** : l'ajout de l'anti-IgA et sa diffusion entraîne la précipitation des chaînes lourdes alpha non précipitées précédemment, sous forme d'une ligne de migration anodique, traversant l'obus.

#### 4. Technique de Laurell Accélérées par un champ électrique

- A le même principe que la technique de Mancini
  - Mais la réaction est accélérée par un champ électrique
- Technique quantitative permettant le dosage des protéines spécifiques

**Le précipité se traduit par des fusées de précipitation**

- Remplacée par la néphélémétries



La hauteur des «fusées» (lignes de précipitation) est proportionnelle à la [Ag].

### Techniques basées sur la réaction d'immuno- Agglutination :

#### Immuno- agglutination

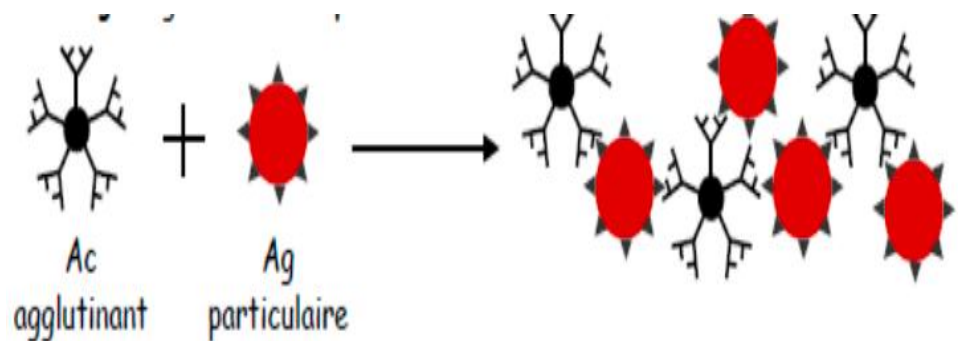
**Réaction d'agglutination :**

- C'est l'**agrégation**, c'est à dire la **réunion en amas**, de particules support d'un Ag sous l'action d'Ac spécifiques
- Ces **particules** (érythrocytes, germes, particules de latex.....), **portant l'Ag** se réunissent sous l'action de l'Ac en amas
- L'amas est **visibles** à l'œil nu ou sous microscope à faible grossissement

**Le principe d'une réaction**

**d'agglutination est de mettre des antigènes sur un élément figuré** (cellules, érythrocytes, particules, bactéries) des particules de latex

sont recouvertes d'antigènes solubles qui est fixé grâce au glutaraldéhyde à des hématies formolées de mouton. C'est une méthode très utilisée en association avec l'immunoélectrophorèse



#### Paramètres intervenant dans l'agglutination

##### 1. Nombre de sites à la surface de la particule

L'Ag doit porter au moins deux épitopes

##### 2. Innocence de la température

La température est directement liée à l'isotype de l'Ac étudié :

- IgM = Ac à optimum thermique froid : Ac froids (4°C)
- IgG = Ac à optimum thermique chaud : Ac chauds (37°C)

## 3. PH : neutre

## 4. Concentrations de l'Ag et de l'Ac

L'agglutination est utilisée comme un **test qualitatif** de la présence d'Ac dans le sérum

Permet également de titrer les Ac

Phénomène de prozone

- c'est l'absence d'agglutination à forte concentrations d'Ac :
- le nombre de sites de liaison de l'Ac peut excéder celui des épitopes antigéniques
- Les Ac ne se lient à l'Ag que d'une façon univalente,
- il n'y a donc pas de formation de l'agglutination
- Le même phénomène de prozone se produit également en excès d'Ag

**Phénomène de zone:**

Ce phénomène est observé dans le sérodiagnostic de Wright (brucellose) qui se manifeste aux faibles et aux fortes dilutions (absence d'agglutinations)

**mécanisme** : sujets possèdent deux types d'AC

- ✓ IgG non agglutinants
- ✓ IgM fort pouvoir agglutinant
- ✓ Faibles dilutions les IgGaturent les sites Ag

**Immuno- agglutination**

- Techniques d'immunoagglutination active ou directe ou naturelles
- Techniques d'immunoagglutination passive ou conditionnées

**A. Réaction d'agglutination (et d'hémagglutination) active :**

- Elle résulte d'une union spécifique entre un **AC agglutinant** et un **Ag propre à la particule**
- Elle peut se faire en tubes, en microplaques ou sur lames
- Elle peut être qualitative ou quantitative

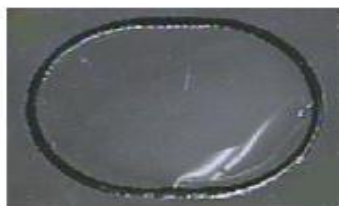
➤ **Quantitative : La dernière dilution où l'on observe une agglutination**

- **Exemples d'applications :**

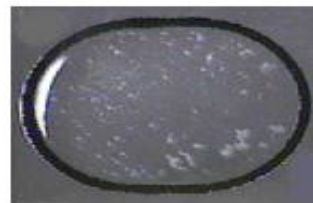
- Sérodiagnostic d'affections microbiennes
- Groupages sanguins

**Technique sur lame : Exemple du sérotypage des antigènes O, H et Vi chez *Salmonella***

- Si la souche possède l'antigène correspondant à l'antisérum testé, il se forme des agglutinats visibles à l'œil nu (parfois plus visibles si on regarde la lame par dessous)



Test négatif



Test positif

**Reaction d'agglutination en tubes: méthodes quantitatives**

- Sérodiagnostic de Widal et Felix : Salmonelloses
- Sérodiagnostic de Wright: la brucellose
- Sérodiagnostic de Martin et Petit : les leptospiroses





### Hémagglutination :

- Réaction entre des **antigènes portés par des cellules : GR** et les **anticorps spécifiques correspondants**
- Elle est utilisée en immuno-hématologie pour la détermination des **groupes sanguins ABO**
- C'est une méthode **qualitative**
- Deux épreuves :
  - \***sérique : Simonin** (détermination des hémagglutinines)
  - \***globulaire : Beth-Vincent** (détermination des antigènes érythrocytaires)

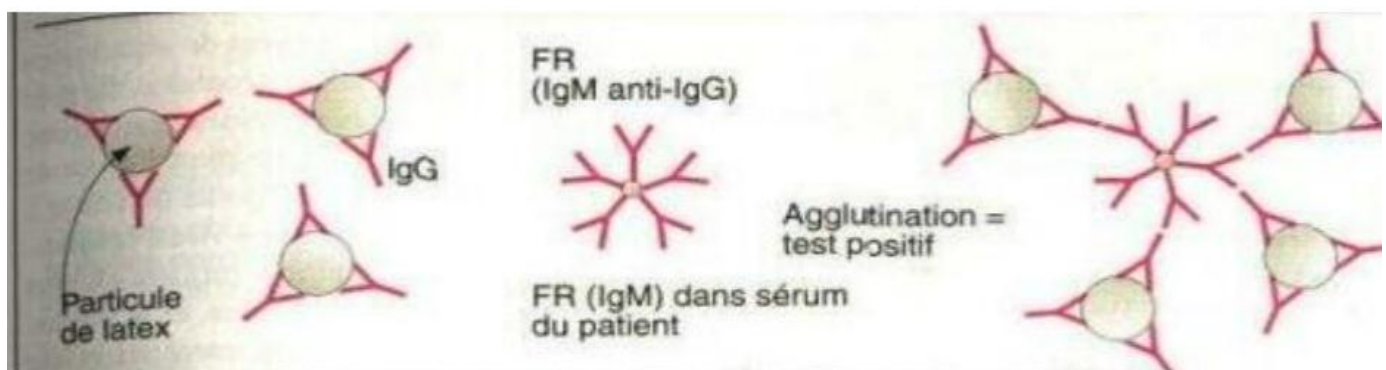
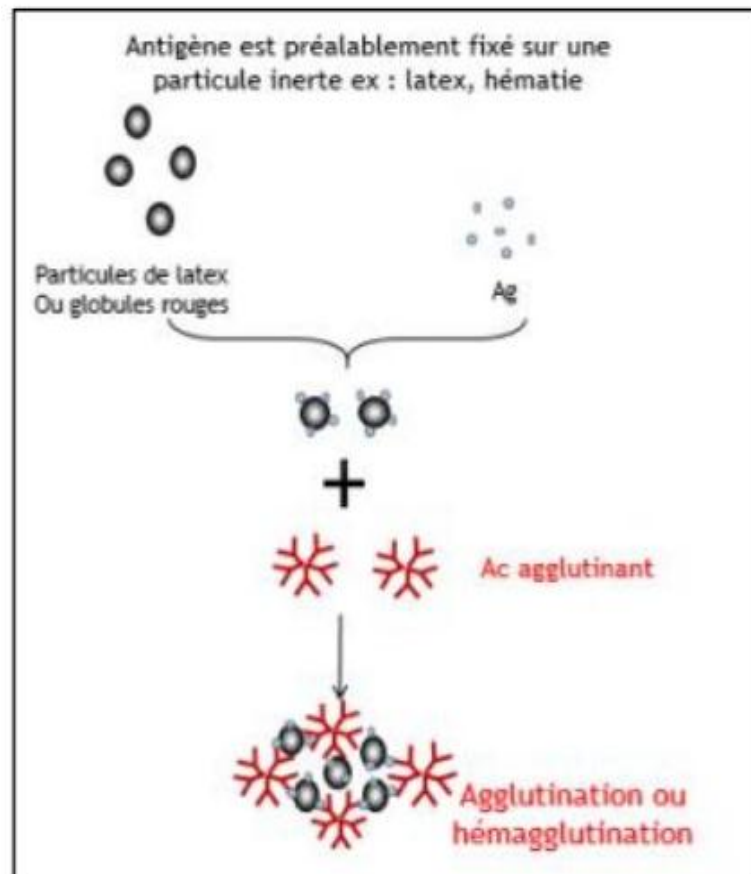
### B. Réaction d'agglutination indirecte ou passive :

- L'Ag soluble est fixé sur une particule
- Elle est réalisée entre un AC et un Ag **normalement soluble**,
- Mais rendu particulaire par fixation sur un support
  - ✓ Les billes de Latex
  - ✓ Les hématies de mouton

#### ❑ Recherche du facteur rhumatoïde

(IgM anti-IgG rencontrée chez les patients atteints de certaines maladies comme la polyarthrite rhumatoïde) par

- **Test au latex** : les IgG humaines sont fixées sur des particules de latex
- **Test de Waaler-Rose** les IgG sont fixées sur des globules rouges de mouton
- **Test au latex** : les IgG humaines sont fixées sur des particules de latex
- **Test de Waaler-Rose** les IgG sont fixées sur des globules rouges de mouton





❑ **Test de coombs direct: recherche d'anticorps présents sur les hématies des malades dans l'exploration de la MHNN**

Principe:

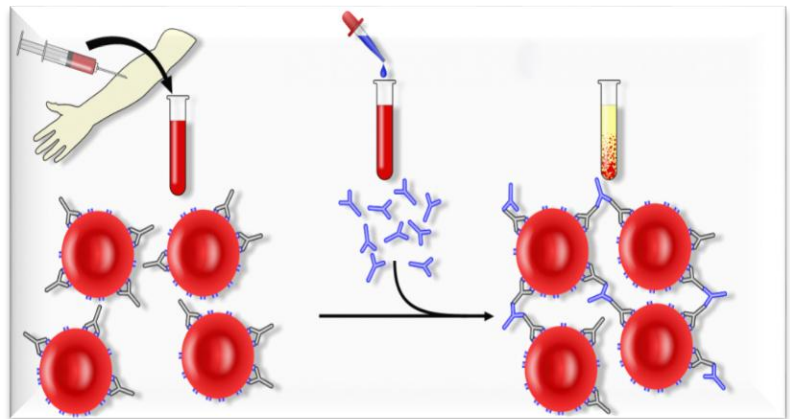
- ❖ On recherche dans ce cas l'agglutination des hématies du malades après addition d'anticorps anti-Ig humaines (IgM ou IgG) ou bien d'anticorps anti-C3

❑ **Test de coombs indirect : recherche d'anticorps présents sur les hématies des malades dans l'exploration de la MHNN**

Principe:

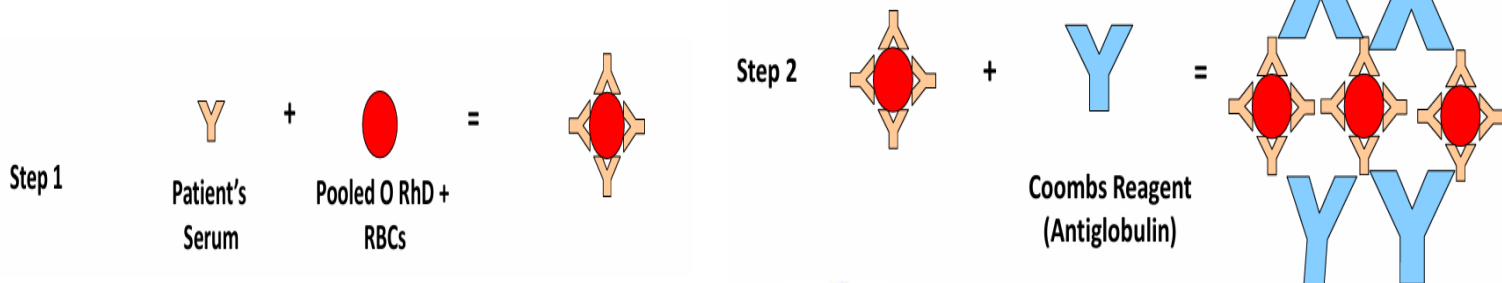
- ❖ On recherche dans ce cas les anticorps anti-GR dans le sérum du malade
- ❖ La fixation éventuelle des anticorps sur les GR tests est elle-même révélée par l'ajout d'antiglobuline
- ❖ Le titre de l'agglutinant est l'inverse de la dilution donnant une réaction positive
- ❖ **Test de Coombs Direct = Test direct à l'antiglobuline:**

Detects in vivo sensitization of red cells



**Test de Coombs Indirect:= Test indirect à l'antiglobuline:**

Detects free antibodies in the serum



**Indirect:**

Recherche d'Ig anti-hématies dans le sérum de la mère

Il survient quand le receveur possède des Ac préformés contre les Ag du greffon (tissu revascularisé directement après la transplantation)

Les réactions les plus graves sont dues aux **Ag ABO** exprimées sur les cellules rénales (Ac + Complément dans les vaisseaux sanguins)

Les molécules **HLA** peuvent être responsables de ce type de réaction.

Afin de prévenir le rejet on s'assure d'une **compatibilité ABO** et on réalise un **cross-match** (test de compatibilité) : leucocytes du donneur + sérum du receveur + Complément

immédiatement après la transplantation, les anticorps se lient aux antigènes sur l'endothélium vasculaire du greffon, activent les systèmes du complément et de la coagulation, provoquent des lésions de l'endothélium et la formation d'un caillot.

Destruction rapide et irréversible de greffon suite à des thromboses vasculaires.

## Techniques immunologiques avec marquage

### Réaction AC-Ag spécifique invisible :

#### ➤ Marqueur

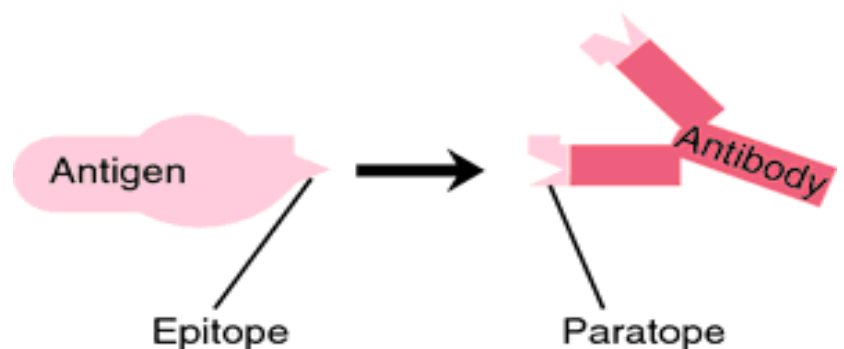
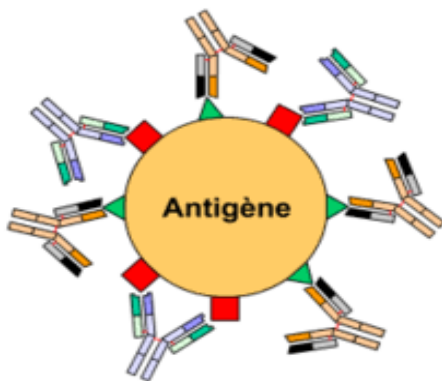
- ➔ Enzymes: ELISA
- ➔ Fluorant: IF, CMF
- ➔ Chimiluminescence
- ➔ Radioactif : RIA

- Techniques d'immunofluorescence
- Techniques immuno-enzymatiques
- Techniques radio-immunologiques
- Techniques de chimiluminescence

### Introduction :

#### Réactions Antigène-Anticorps :

- 1 **La spécificité**: C'est l'aptitude de l'Ac à ne réagir qu'avec l'Ag et rien qu'avec cet Ag. Un paratope reconnaît un seul épitope.
  - 2 **L'affinité**: C'est la tendance avec laquelle un épitope réagit avec un anticorps.
  - 3 **La réversibilité**: Les forces de liaison faible rendent compte de la réversibilité de la réaction.
- Un maximum de liaison Ag - Ac n'est obtenu qu'après un temps d'incubation.



Elles sont très utilisées en :

- recherche fondamentale et appliquée
- analyse médicale, pour le dosage de nombreuses substances (Ag, Ac, hormones, marqueurs tumoraux, médicaments...) dans les différents liquides biologiques

### Identification et/ou dosage d'un Antigène (Ag) :

- Cellules
- Agents infectieux
- Protéines
- Hormones
- Médicaments

Mise en évidence et/ou

### Titrage d'un Anticorps (Ac) :

- Sérologies infectieuses
- Maladies auto-immunes
- Allergies
- Transplantation

Réactions Antigène-Anticorps :**Sans Marquage :**

Immunoprécipitation (en milieu liquide)

Immunodiffusion (en milieu gélifié)

Agglutination

**Avec Marquage :**

Immunofluorescence

Immuno-enzymatiques

Radio-immunologique

Chimiluminescence

Techniques immunologiques :**Avec Marquage**

## • Réactions Antigène-Anticorps utilisant un réactif associé à un Marqueur:

✓ Antigène\*

✓ Anticorps \*

➤ Ce Traceur = marqueur est détectable

➤ Permettant de révéler la liaison antigène-anticorps spécifique

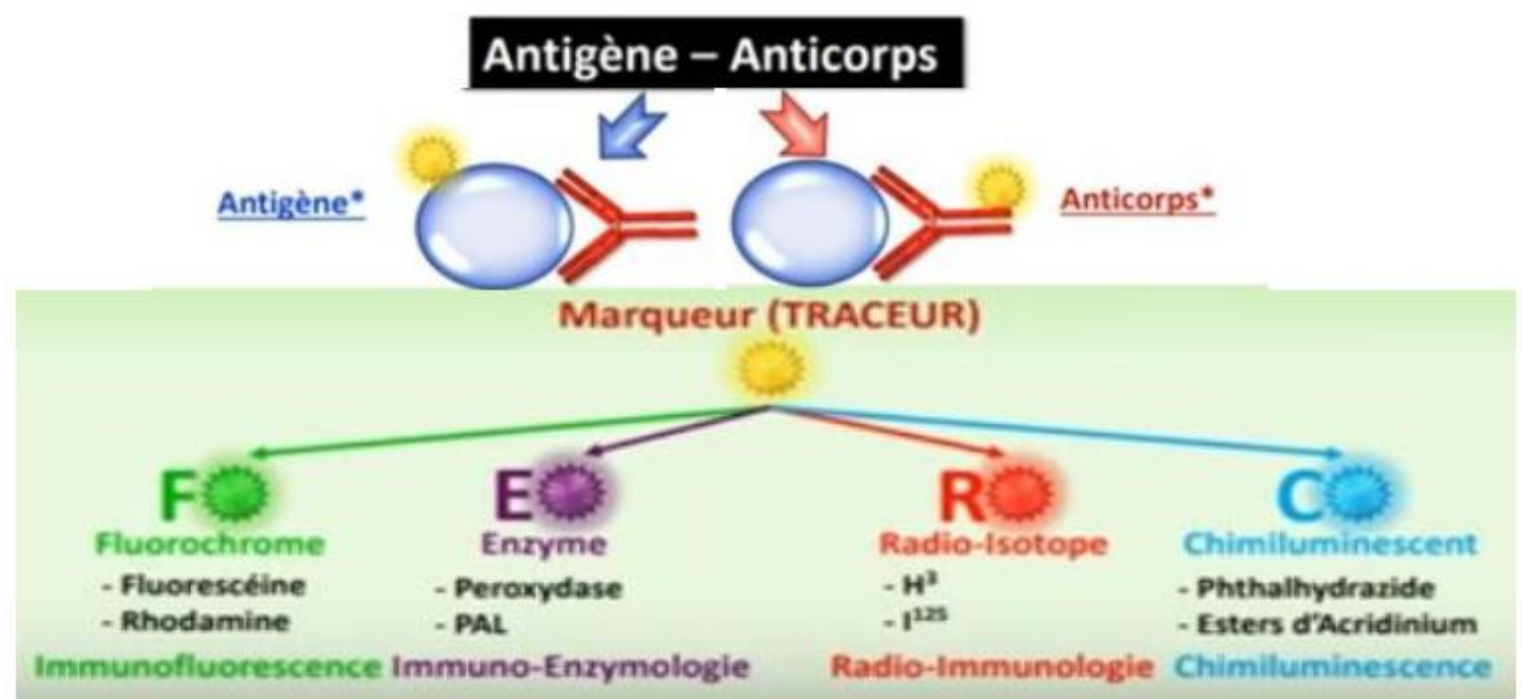
➤ Le marquage ne doit pas modifier la spécificité de la réaction Ag-Ac (le marquage se fait en dehors des régions de complémentarité)

➤ Les marqueurs augmentent la sensibilité d'une immuno-analyse

➤ permettent de déceler des quantités plus faibles de cible que les méthodes qui ne les utilisent pas

04 types de marqueurs sont utilisables:

- Des enzymes
- Des fluorochromes
- Des composés chimiluminescents
- Des radio-isotopes

Réactions Antigène-Anticorps :

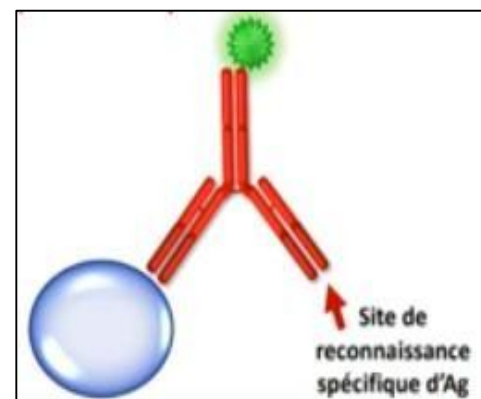
Techniques d'immunofluorescence :Aspects fondamentaux :Phénomène de fluorescence

- **Les Ac** pouvaient être marqués par des molécules qui ont la propriété d'être **fluorescentes**:  
**Fluorophores/Fluorochromes**
- Elles absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde (**excitation**) passent à un état excité, et qui, pour revenir à l'état fondamental, émettent une lumière d'une longueur d'onde différente de celle absorbée (**longueur d'onde d'émission**) ( $\lambda_{\text{émise}} > \lambda_{\text{absorbée}}$ )
- La fluorescence est un phénomène physique caractérisé par l'émission d'une lumière de plus faible énergie que celle absorbée

1944: Albert Coons



- Lorsque des **Ac** sont **marqués par un fluorochrome**, les complexes immuns contenant ces AC marqués sont détectés par **l'émission de lumière colorée** s'ils sont excités par une lumière de longueur d'onde adéquate
- La lecture est réalisée au **microscope à fluorescence équipé d'une source de lumière UV**

2. Fluorochromes**Caractéristiques : chaque corps fluorescent possède 3 caractéristiques:****1. Spectre d'excitation:**

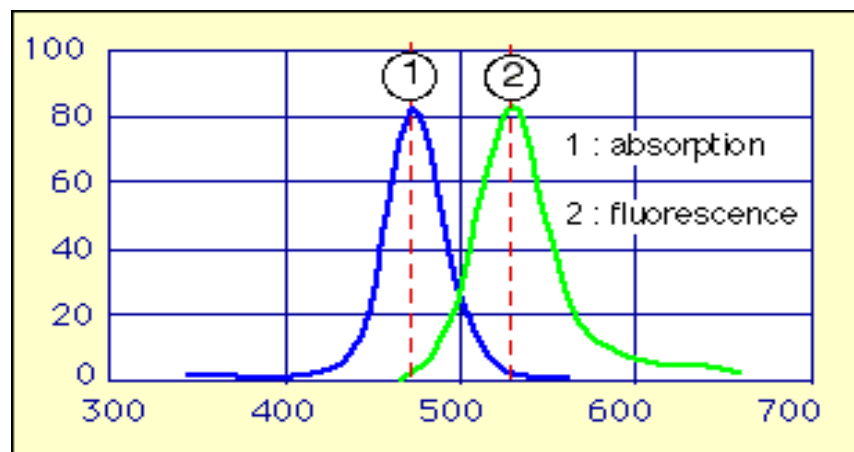
Seuls certains rayonnements de quantum d'énergie précis sont absorbés, état de base  
Etat excité → Energie

**2. Spectre d'émission:**

Le retour à l'état de base s'accompagne de l'émission de photon de lumière particulière pour chaque corps fluorescent

**3. Rendement quantique:**

Le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés

**Principaux fluorochromes utilisés :**○ **L'isothiocyanate de fluorescéine (ou FITC) :**

- ✓ Le plus fréquemment utilisé
- ✓ Absorbe la lumière bleue à  $\lambda = 480\text{nm}$
- ✓ Emet une fluorescence verte
- ✓  $17\text{nm}$

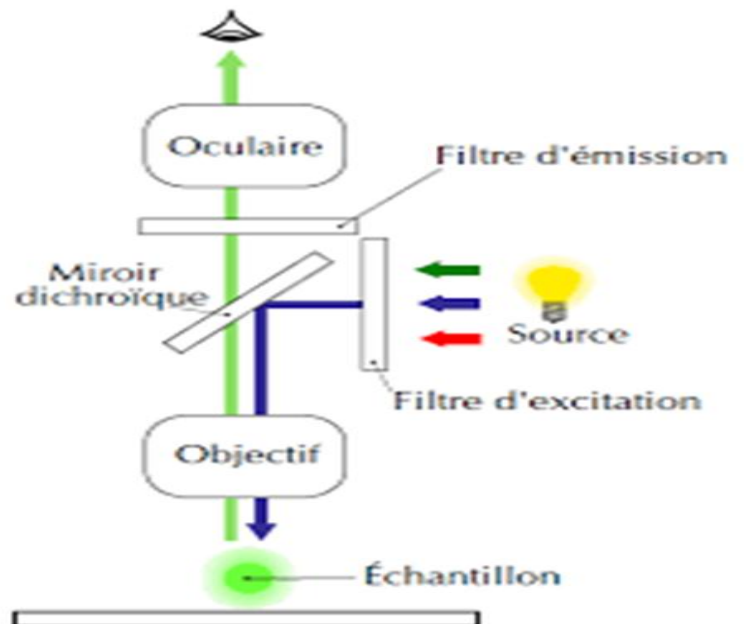
○ **L'isothiocyanate de rhodamine :**

- ✓ Absorbe à  $\lambda = 550\text{nm}$  et émet à  $\lambda = 580\text{nm}$  (**rouge orangé**)
- ✓ Souvent utilisée dans les doubles marquages (avec la fluorescéine), du fait des couleurs différentes émises par les deux fluorochromes

- **La phyco-érythrine:** absorbe **30 fois plus** la lumière que la fluorescéine et émet une fluorescence **rouge intense**, souvent utilisée dans la cytométrie de flux

### 3. Les systèmes optiques de détection de fluorescence

- Une **source de lumière** : est équipé d'un jeu de filtres correspondant au fluorochrome utilisé
- Un **filtre d'excitation** permettant la sélection de la longueur d'onde absorbées par le fluorochrome utilisé
- Un **miroir dichroïque** réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon
- Un **filtre d'émission** ne laissant passer par transmission que les radiations émises par le fluorochrome



## II. Méthodes

### Immunofluorescence sur frottis ou sur coupe

Immunofluorescence Directe (IFD)

Immunofluorescence Indirecte (IFI)

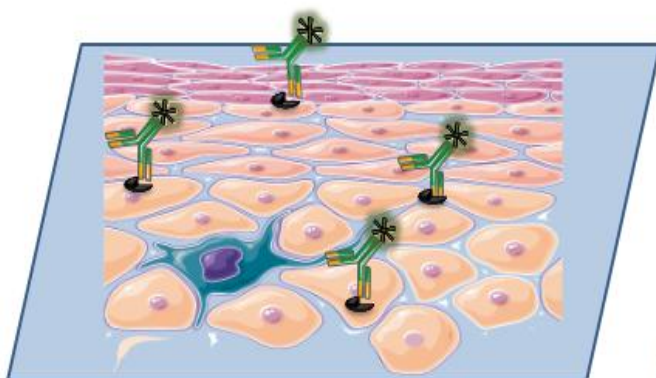
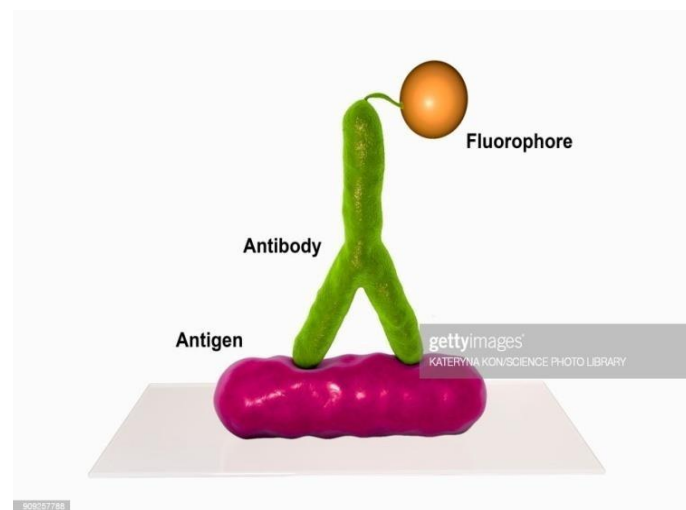
### Immunofluorescence Directe (IFD) :

Mise en évidence de l'Antigène

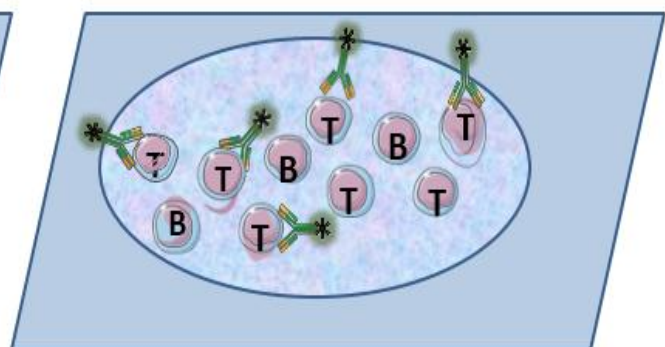
- Elle consiste à fixer directement l'anticorps marqué sur la **préparation antigénique** étudiée
- Après lavage la lecture est effectuée au microscope à fluorescence

### Applications:

- Identifier un **germe**
- Analyser dans une biopsie tissulaire les **dépôts d'immunoglobulines et de complément**
- Le **phénotypage des populations LB et LT**



Recherche de dépôts de composants du complément



phénotypage des populations lymphocytaires B et T



## Immunofluorescence Indirecte (IFI) :

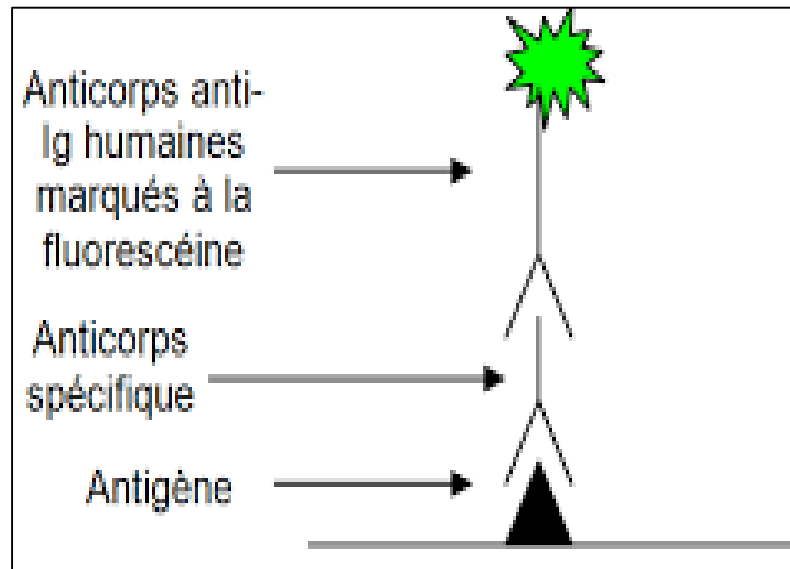
### Mise en évidence de l'Antigène

### Mise en évidence de l'Anticorps dans le sérum

- La fixation de l'Ac primaire non marqué spécifique de l'Ag recherché, est **révélée** grâce à une **antiglobuline (Anti-Ac) fluorescente**
- Les antiglobulines proviennent d'un mélange de sérums obtenus après immunisation d'animaux avec les  $\gamma$ globulines d'origine humaine

### Avantages :

- **Plus grande sensibilité** que la méthode directe (**4 à 10 fois supérieure**)
- Car de multiple molécules de fluorochrome se lient à chaque molécule d'Ac primaire (Le 1<sup>er</sup> Ac sert ici d'Ag avec plusieurs sites Agénik)



Mise en évidence de l'Antigène

- **1<sup>er</sup> temps** : Mise en présence de l'Ag (coupe tissulaire, frottis cellulaire) avec le sérum à tester

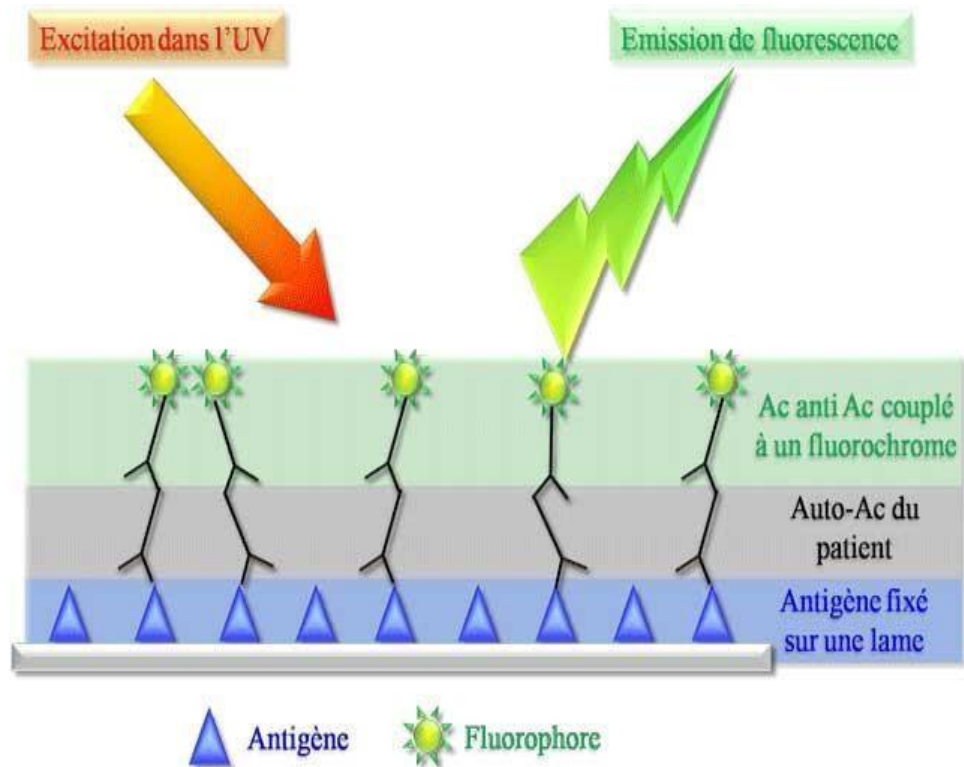
### Elimination par lavage des Ac non fixés

- **2<sup>ème</sup> temps** : Addition de l'**immun-sérum anti-immunoglobulines humaines conjugué à un fluorochrome** (Le conjugué

### Elimination des anti-Ig non fixées par de nouveaux lavages

- **Lecture au microscope à fluorescence**

### Mise en évidence de L'Anticorps dans le sérum

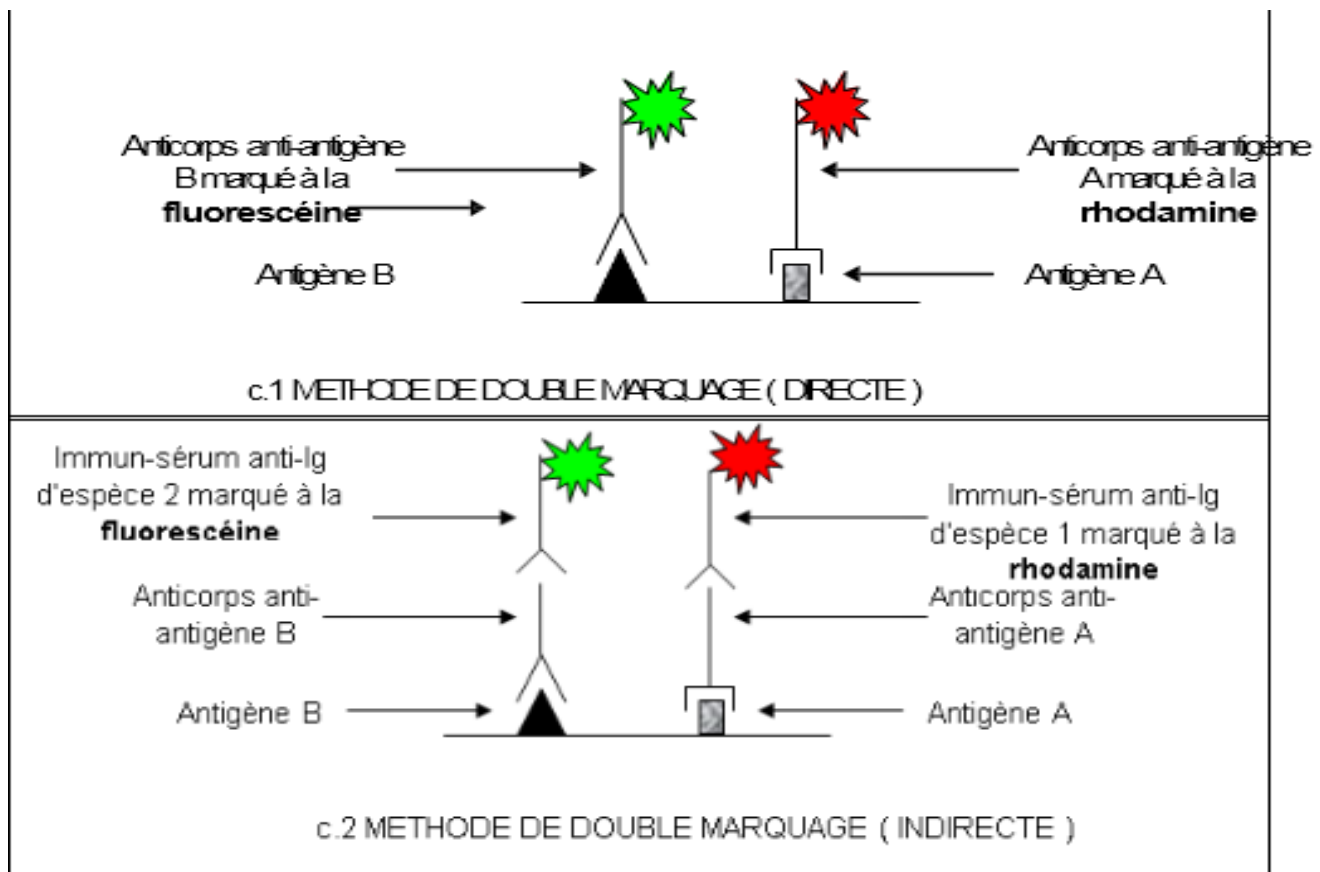


## Méthodes de double marquage :

- Utilisation de **plusieurs marqueurs fluorescents** dans **la même réaction**
- Permet l'identification et l'étude de **plusieurs systèmes antigène-anticorps en même temps**, permettant un **double**, un **triple marquage** et **même plus**

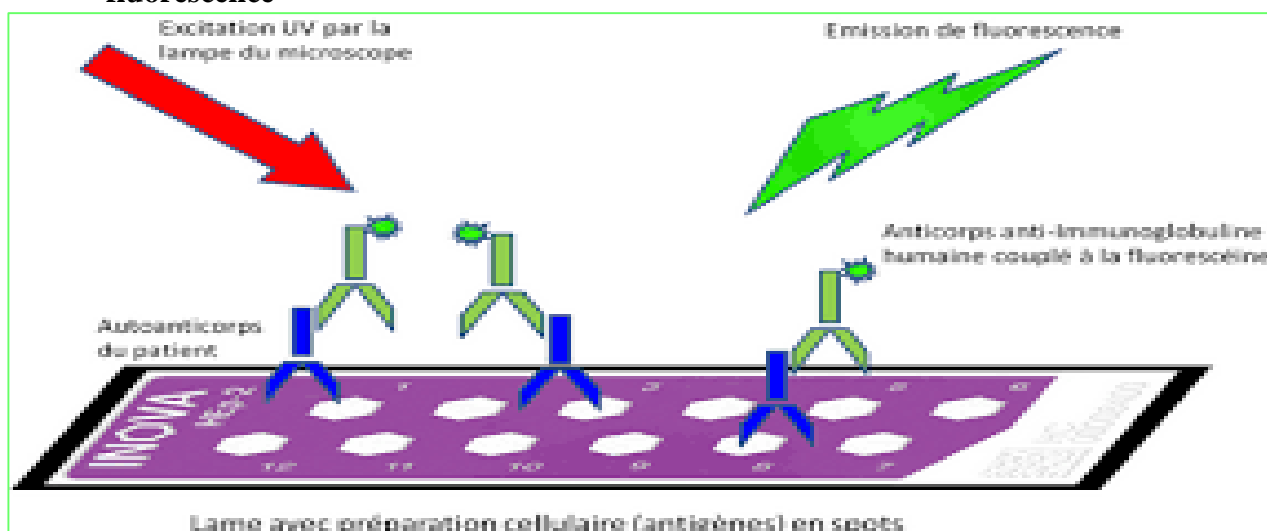
**Exemple :** Utilisation de 02 fluorochromes distincts (fluorescéine et rhodamine par exemple) : double marquage direct et surtout indirect

- Plus souvent utilisée lorsque la lecture est effectuée en **cytométrie en flux**



## 1-Autoimmunité

- IFI permet de détecter **les auto-Ac** avec les avantages suivants:
- Facilité d'exécution
- Bonne sensibilité
- Détection de **plusieurs Ac à la fois**
- L'IFI, sur frottis cellulaire ou coupe d'organe est **la méthode de routine la plus utilisée** pour dépister de nombreux Ac
- **C'est une technique semi quantitative:** On choisira pour chaque type d'auto-Ac la dilution initiale à partir de laquelle les titres des auto-Ac deviennent cliniquement significatifs (Exp: AAN: 1/80, AMA:anti-mito: 1/40, AEA: 1/10)
- Une fluorescence perceptible d'auto-Ac est suivie d'une dilution du sérum de  $\frac{1}{2}$  en  $\frac{1}{2}$  jusqu'à extinction de la fluorescence
- **Le titre de l'Auto-Ac recherché correspond à l'inverse de la dernière dilution donnant une fluorescence**



## 2-Microbiologie :

### Identification d'un microorganisme

- **IFD permet** l'identification des agents infectieux dans tous les liquides biologiques:

-**LCR:** Klebsiella pneumoniae, etc..

-**Gorge:** Streptocoque A,B,C,G

-**Prélèvement génitaux, urines, selles, etc**

### Recherche d'Ac anti-microorganisme

- **IFI permet:**

-La détection d'anticorps circulants

-Evaluation de leurs taux

-Détermination de leurs classe

### En pratique sont réalisés:

-Le sérodiagnostic de la **toxoplasmose**

-La recherche d'Ac **anti-Tréponema pallidum**

## 3-Immunocytochimie

L'immunofluorescence permet:

### La caractérisation des lésions anatomo-pathologiques:

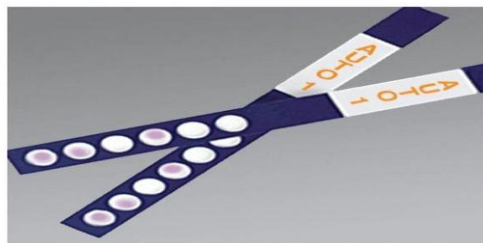
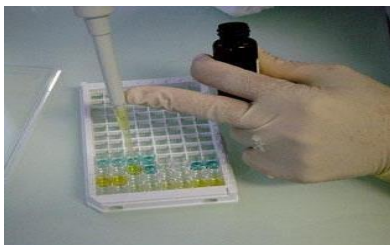
L'IFD permet de **déceler des dépôts** d'immunoglobulines ou de compléments **dans les tissus**

### L'identification d'une substance biochimique:

Pour identifier les cellules productrices d'une substance donnée grâce à la production

d'anticorps spécifiques vis-à-vis de cette substance, il est possible de montrer le lieu de synthèse de celle-ci

## Techniques Immuno-enzymatiques :

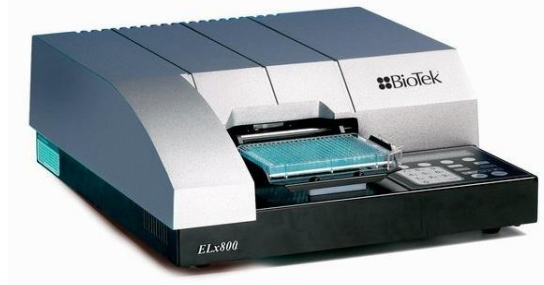
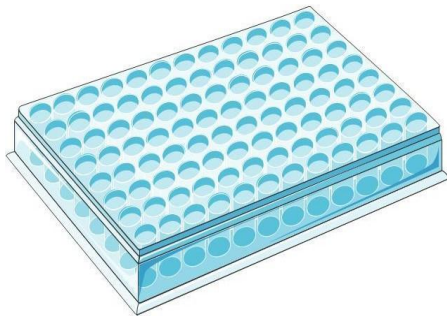
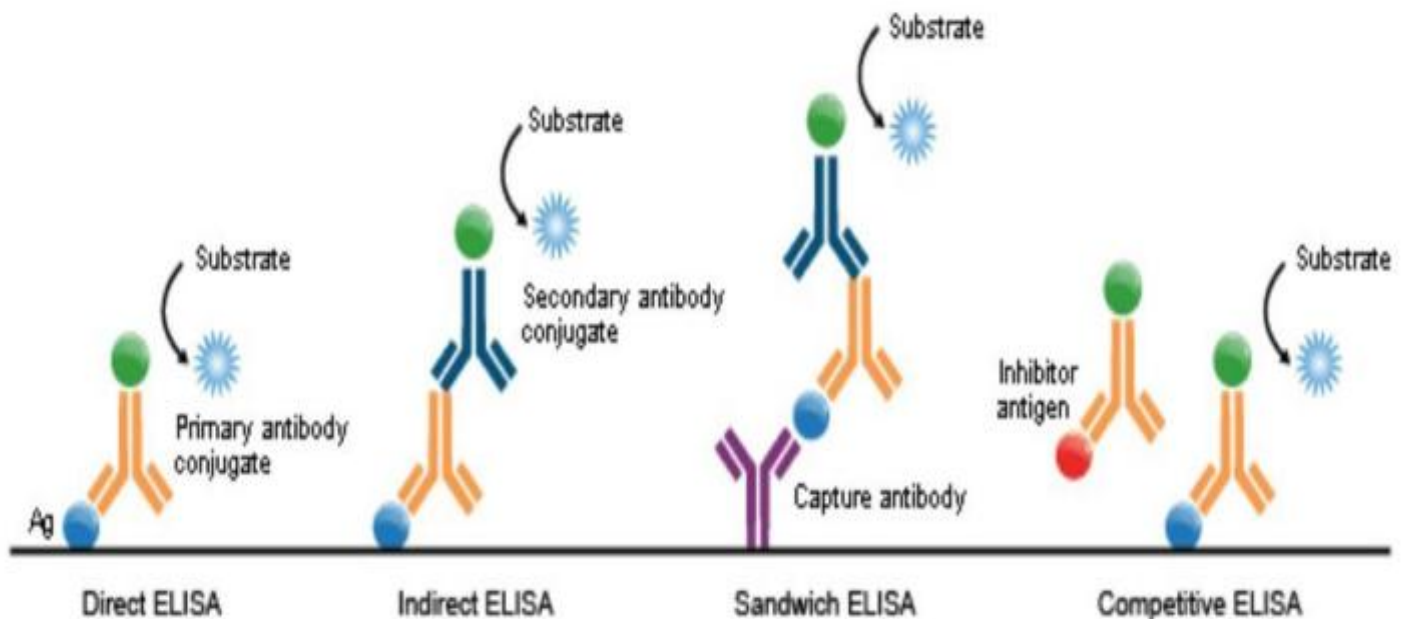


## I. Définition et principe

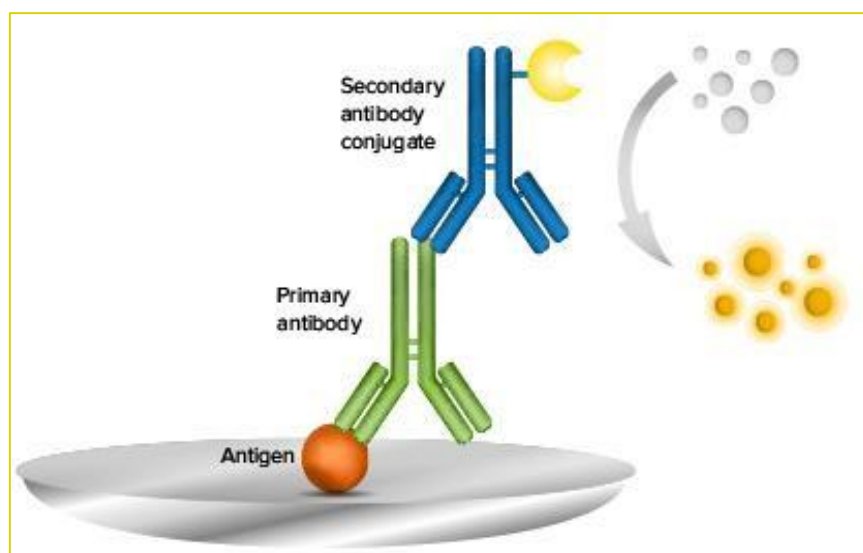
- Techniques immunologiques dans lesquelles **un des constituants (Ag ou Ac) est marqué par une enzyme**
- Les enzymes communément utilisées:
  - ✓ **phosphatase alcaline**
  - ✓ **peroxydase**
  - ✓ **β- galactosidase**
- **Le marquage par ces enzymes ne doit pas affecter ni la spécificité ni l'affinité des Ac ni la structure de l'Ag**
- Pour chaque **enzyme utilisée**, il faut ajouter dans le milieu **un substrat chromogène** qui, lorsqu'il est dégradé par l'enzyme donne **un produit de couleur différente et absorbant de la lumière à une certaine longueur d'onde**
- Technique:
  - ✓ **Qualitative** ( lecture à l'œil nu)
  - ✓ **Quantitative** ( mesure de la **densité optique** grâce à la spectrophotométrie)

**Techniques quantitatives ELISA Enzym-Linked Immonosorbent Assay**

- Techniques **largement** utilisées
- **Bonne sensibilité, spécificité**
- Réalisées dans des plaques de microtitration dont le matériau permet la fixation des protéines (Ag ou Ac)
- **Plusieurs variantes méthodologiques:** par compétition, indirecte, type sandwich
- La révélation de la réaction Ag-Ac repose sur **la mesure de la densité optique du produit généré à l'aide d'un spectrophotomètre** (lecteur de plaques ELISA)
- La détermination de concentration est assurée par l'utilisation d'une **courbe d'étalonnage**

**ELISA : variantes méthodologiques****ELISA indirecte**

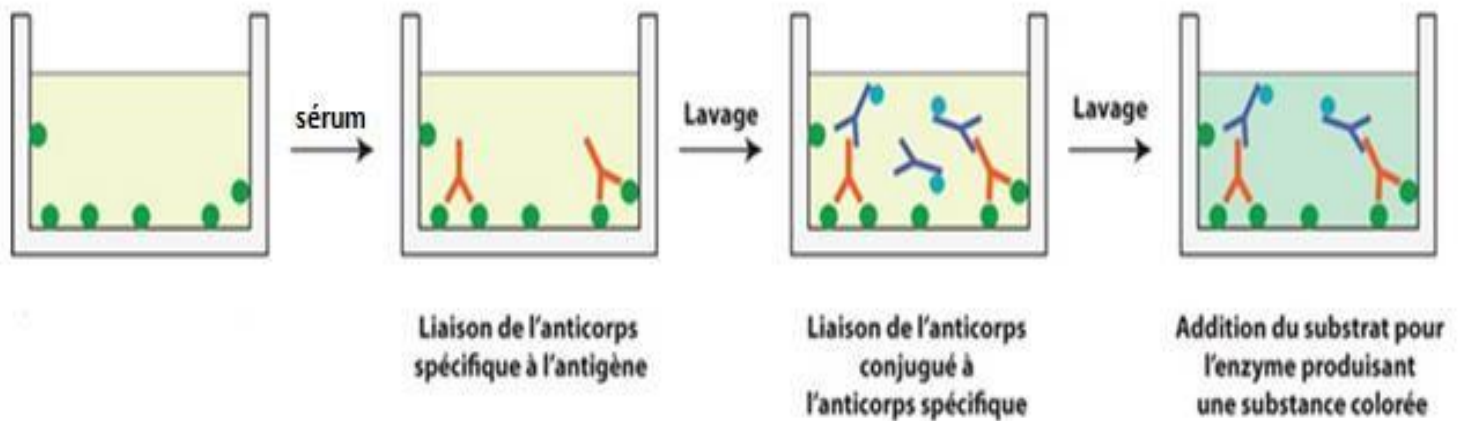
- Utilisée pour la recherche des **Ac**
- Peut être quantitative ou qualitative
- L'Ac recherché est fixé à la plaque grâce à l'interaction des Fab avec l'Ag présent dans la plaque
- L'ajout d'un autre **Ac marqué** dirigé contre le Fc de l'Ac recherché permet de visualiser la réaction





**En pratique**

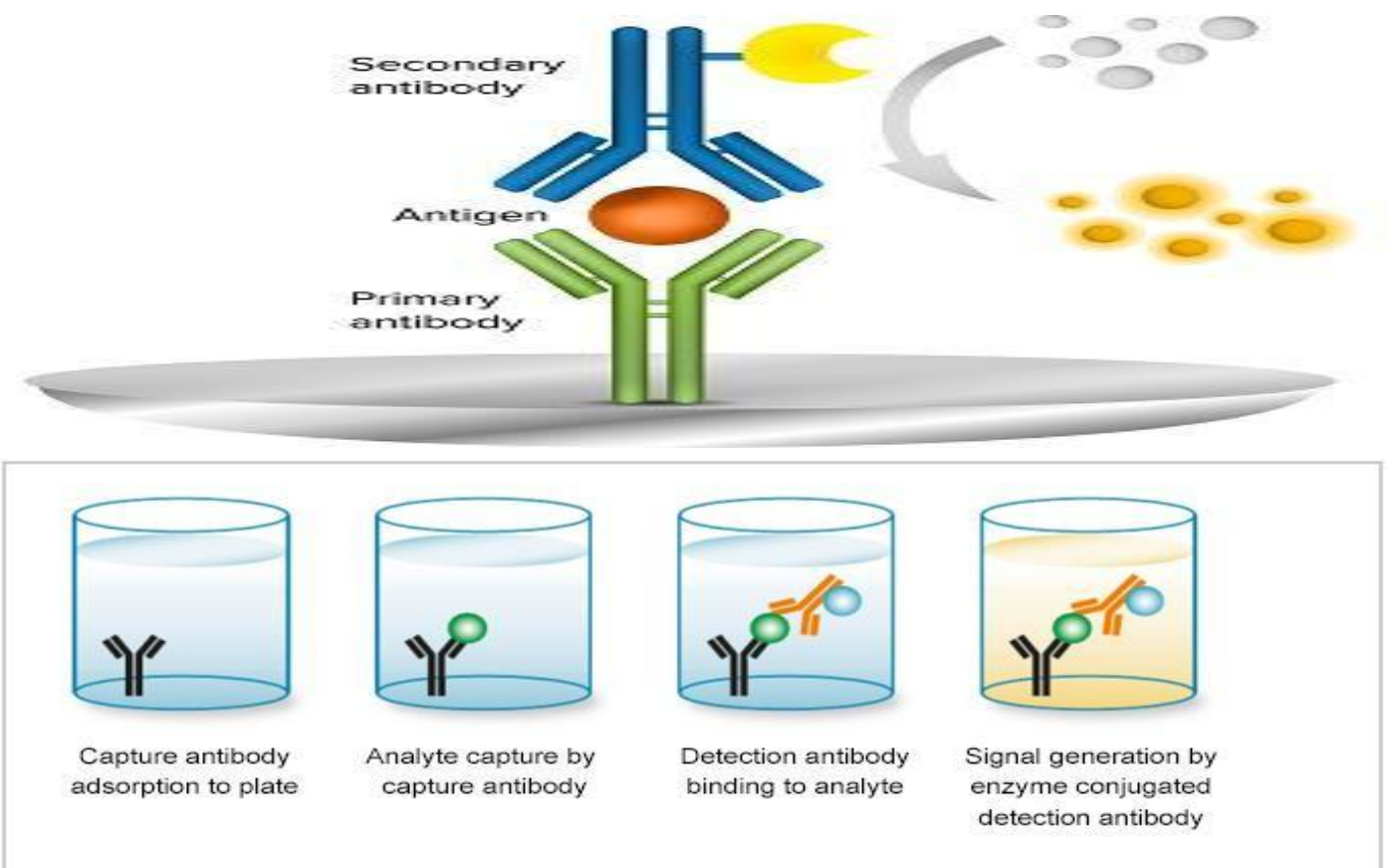
- On distribue l'échantillon biologique dans les puits de la plaque préalablement tapissés par l'Ag
- Après incubation, on effectue **un lavage** afin d'éliminer tout ce qui ne s'est pas fixé
- On ajoute un **anticorps anti-immunoglobulines humaines marqué par une enzyme (Conjugué)**
- Après incubation, on réalise **un deuxième lavage** pour éliminer l'excès du conjugué
- On ajoute **le substrat** de l'enzyme
- Après incubation, on arrête la réaction à l'aide d'une solution acide et on mesure la DO avec le lecteur de plaque



La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré

**ELISA Sandwich :**

- Ac 2 reconnaît épitope 2 sur l'Ag
- Ac 1 reconnaît épitope 1 sur l'Ag



La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré

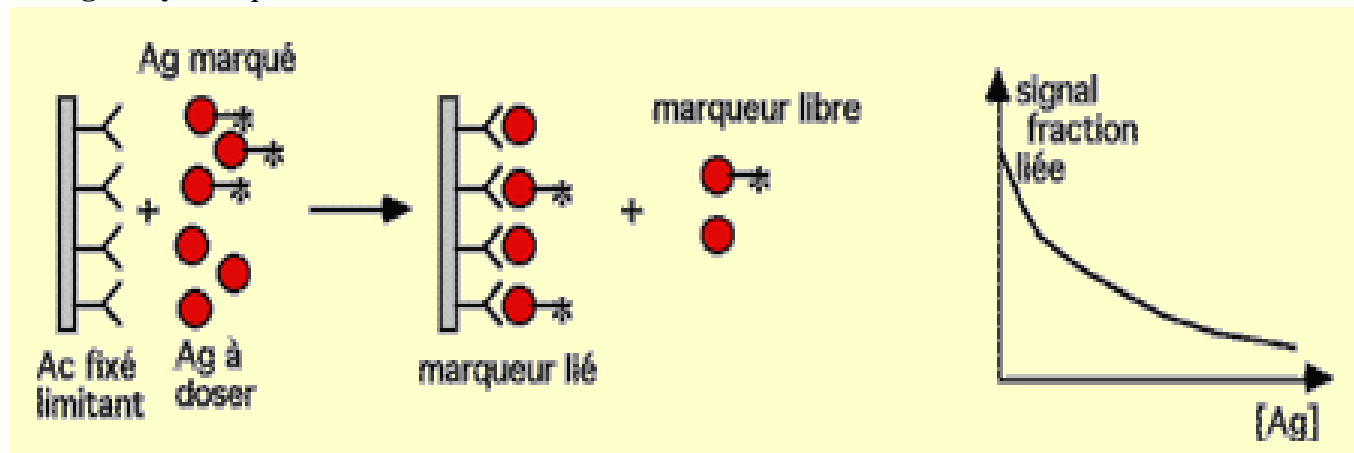


## ELISA par compétition

Exemple: dosage d'un Ag

### Principe:

- basé sur une compétition entre **Ag marqué** et l'**Ag non marqué** vis-à-vis de **sites limités d'Ac**
- **Ac: quantité limitée**
- **Ag-Enzyme : quantité constante limitée**

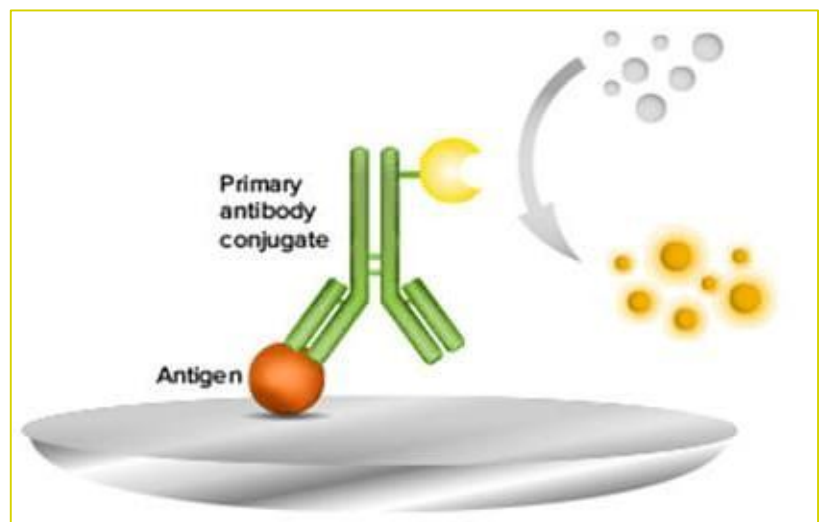


La DO est indirectement proportionnel à la quantité d'Ag mesuré

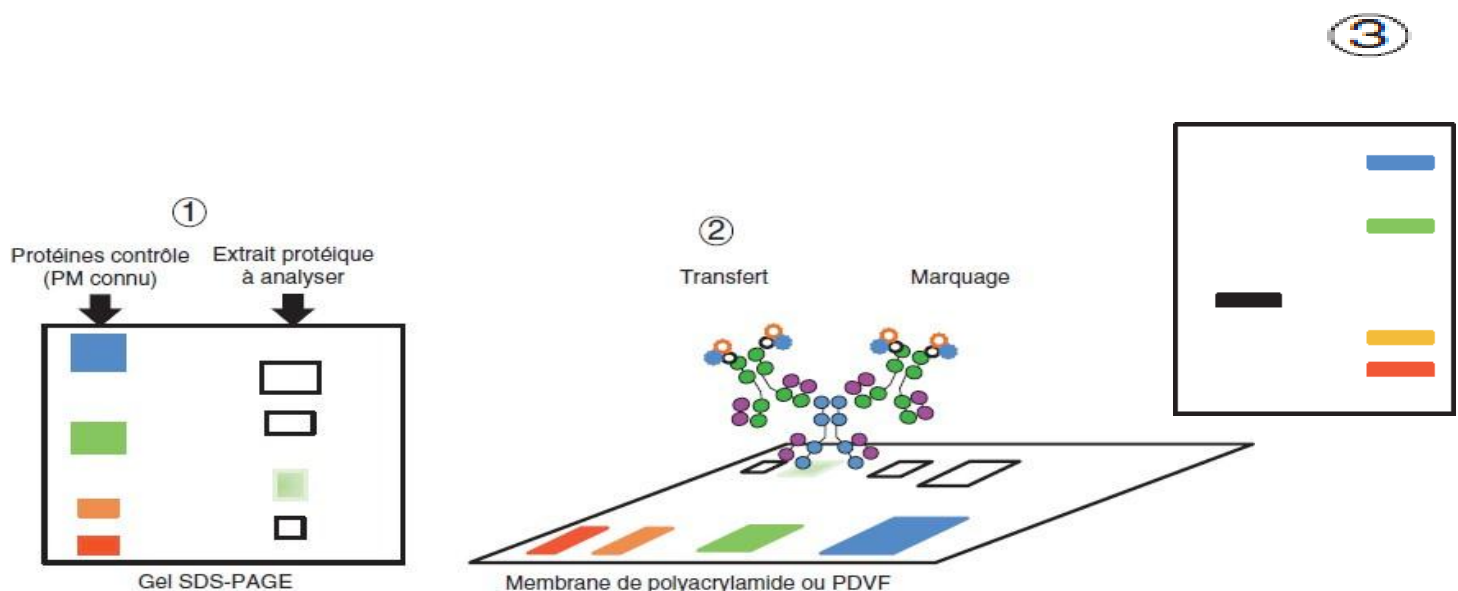
## Techniques qualitatives

### ELISA Directe

- Utilisée en **immunohistochimie**
- Recherche d'Ag présent dans un tissu à l'aide d'un **anticorps spécifique conjugué à une enzyme**
- Lecture au microscope optique

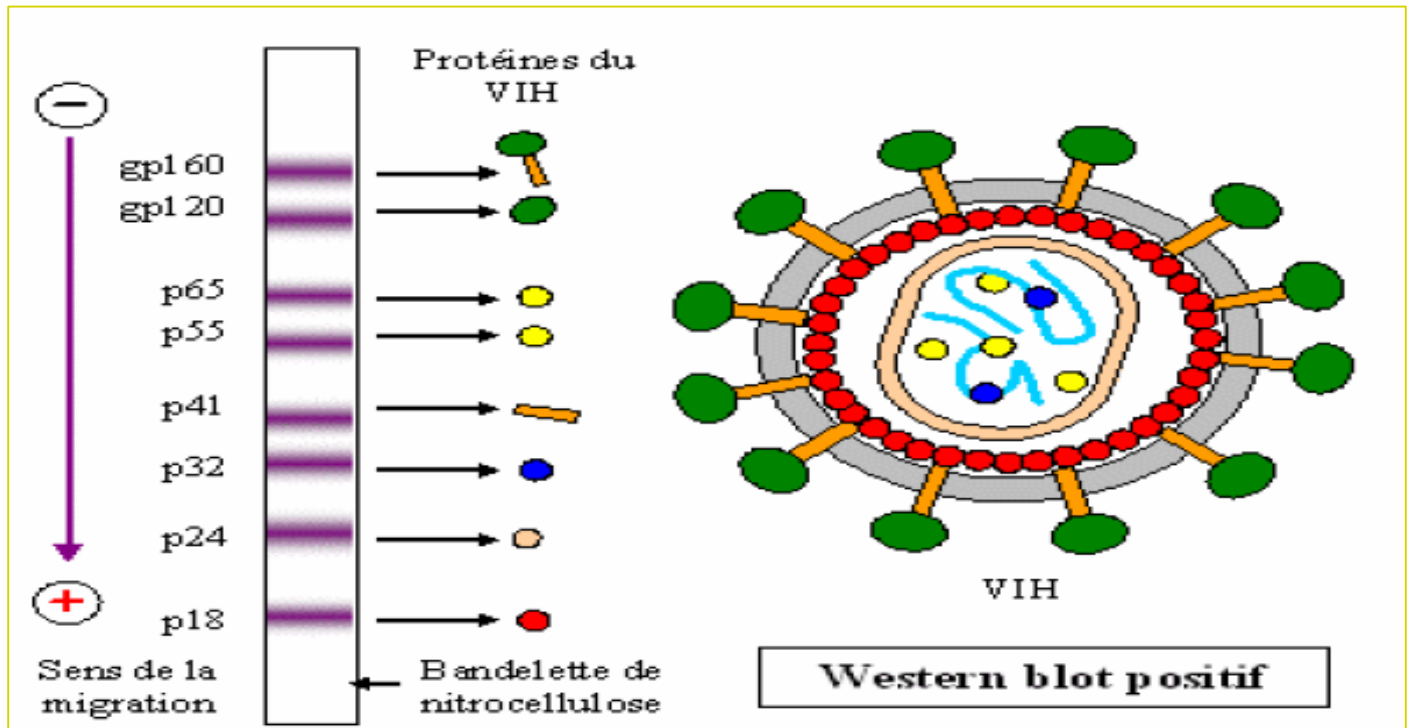


## Western Blot (Immuno empreinte)



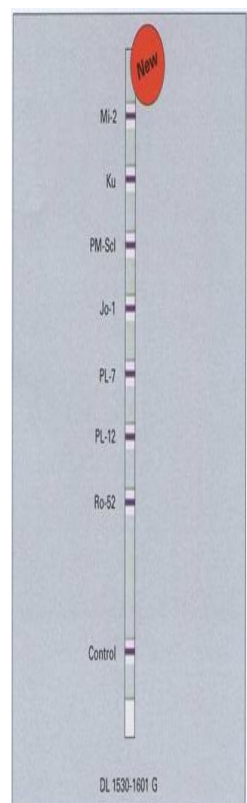
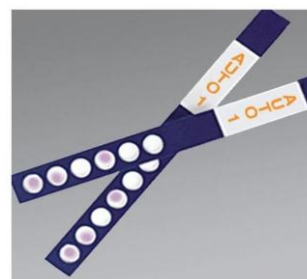
- réalisée sur des **membranes de nitrocellulose**
- La préparation des membranes passe par deux étapes:
  - Séparation électrophorétique** par SDS-PAGE (Haute résolution)
  - Transfert des bandes d'Ag sur la membrane de nitrocellulose (blotting)**
  - Détection de la protéine d'intérêt** est ensuite réalisée sur la membrane, de manière:
  - Directe** grâce à des **anticorps spécifiques couplés à un traceur**
  - Indirecte** en utilisant un anticorps spécifique et **un anticorps secondaire couplé à un traceur enzymatique** (permettant la production d'un précipité coloré)
- Cette technique est **qualitative**, voire **semi-quantitative**

**En clinique** : la confirmation d'un diagnostic sérologique positif d'infection par le VIH nécessite un western-blot



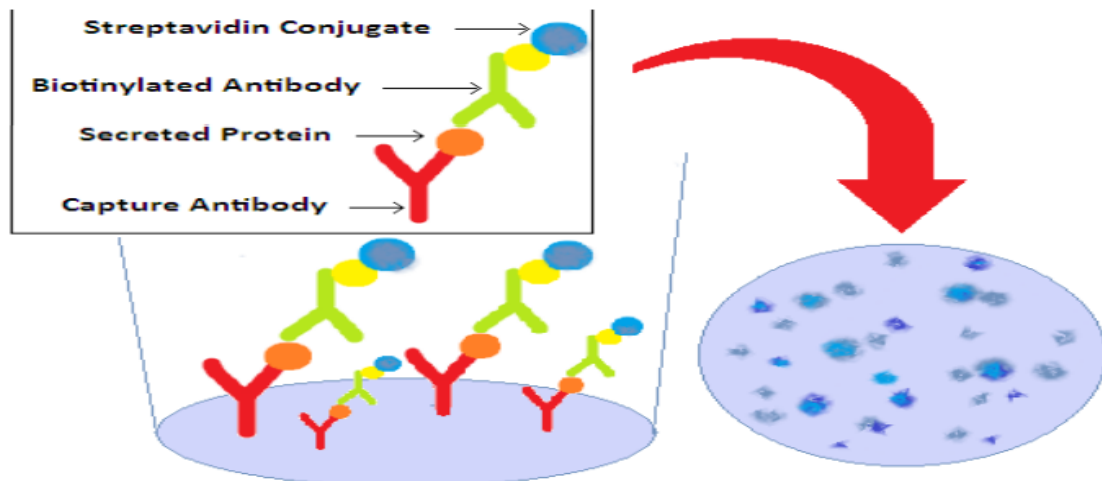
### Immunodot :

- Immunodot (Dot-blot) technique dérivée du western-blot
- Les antigènes, sont directement déposés sur des bandelettes de nitrocellulose
  - Pas de séparation préalable des protéines sur gel
  - Technique immunoenzymatique de type indirect
- Utilisée pour la détection d'Ac
- Un résultat positif se présente sous forme d'un cercle ou trait coloré

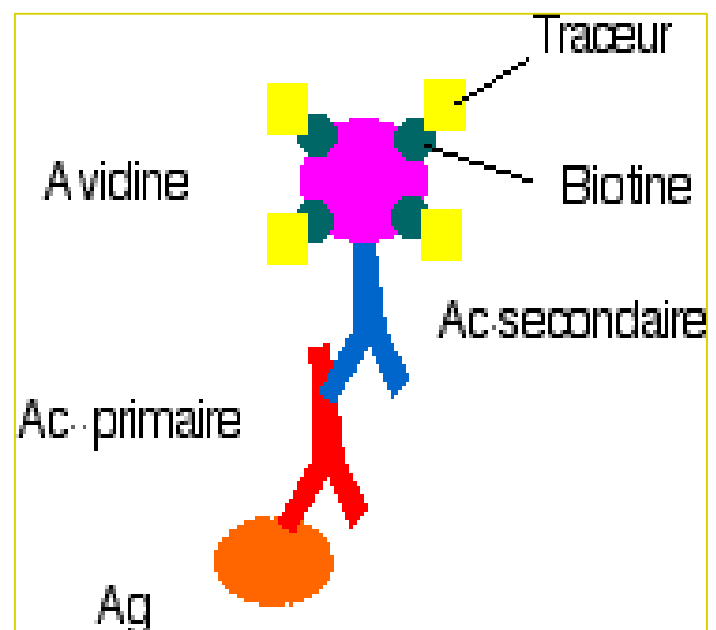
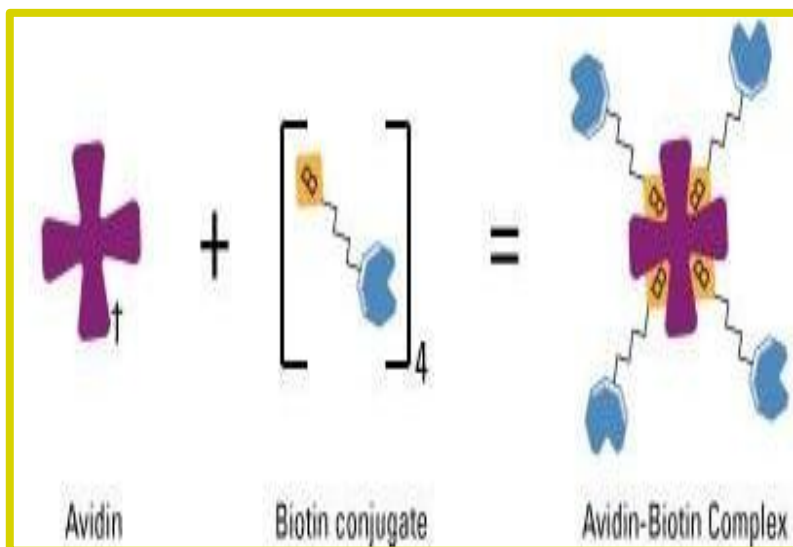


Elispot :

- Variante de la technique Elisa utilisée pour la détection **des cellules productrices de cytokines**
- Le puits de la plaque est couvert d'**Ac anti-cytokine recherchée** dans lequel **sont cultivées les cellules du patient**
- Les cytokines produites seront captées par **les Ac présents dans le puits** dans l'endroit de leur production
- On continue les étapes de l'ELISA sandwich habituelle
- **Le résultat positif** se traduit par l'apparition de **spots colorés dont chacun correspond à une cellule productrice**

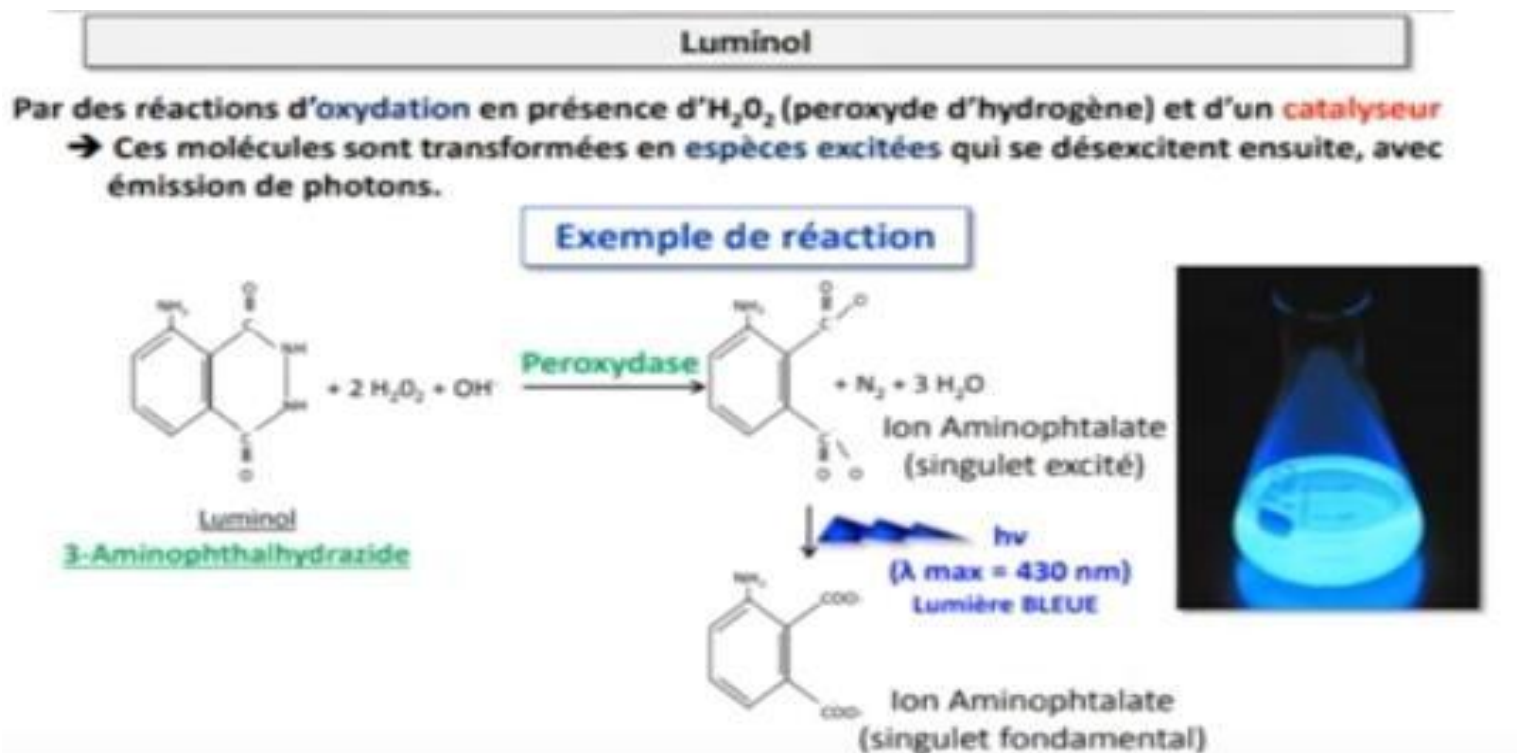
**Techniques qualitatives****Elispot**Amplification du signal :**Système streptavidine/biotine**

- **Streptavidine**: protéine microbienne caractérisée par **sa forte affinité pour la biotine**
- Chaque molécule de streptavidine peut **fixer quatre** molécules de biotine
- **Biotine**: vitamine se fixant à la streptavidine de manière **non-covalente** mais avec une forte affinité
- Ce système est utilisé pour **augmenter la sensibilité** des techniques ELISA
- En marquant l'Ag ou l'Ac par la streptavidine puis on ajoute l'enzyme fixée à la biotine

**Système streptavidine/biotine**

Techniques de chimiluminescence :Principe

- ❑ La **chimiluminescence**, ou **chimioluminescence**, est la production de lumière à la suite d'une réaction chimique
- **Exp:**



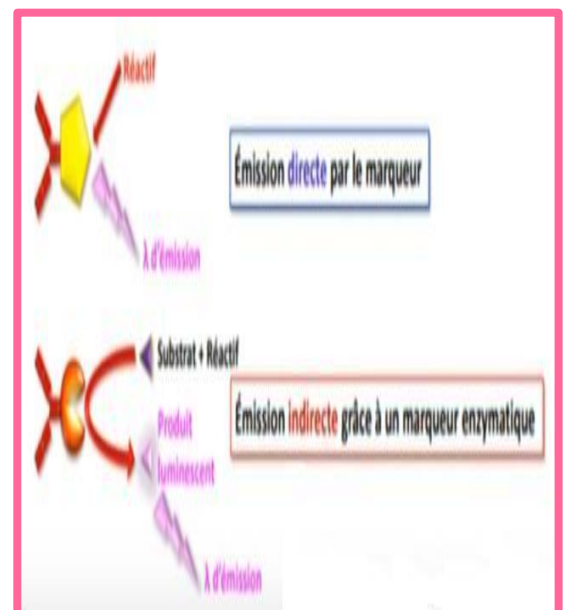
La lecture est rapide, car l'émission lumineuse est fugace et d'intensité maximale fluctuante (variable au cours de la réaction)

Il est impératif donc que la lecture se fasse par un automate.

- La chimiluminescence se caractérise **seulement par un spectre d'émission**
- L'émission de la lumière **commence directement après le début de la réaction Chimique**

L'émission lumineuse peut provenir soit:

- Du marqueur (**Luminophore**)
- D'une molécule transformée par une enzyme spécifique utilisée comme marqueur

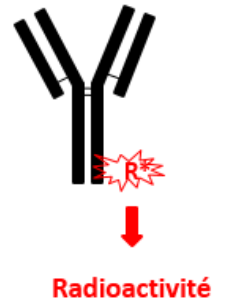
**Techniques Radio-immunologiques**Principe :

- Méthode de dosage et d'analyse quantitative
- Réaction antigène-anticorps **associée à un marqueur radioactifs (un radio- isotope)**
- Caractérisée par sa **grande sensibilité** et sa **grande spécificité**

**Les marqueurs radioactifs :** émettent un signal physique directement détecté par la mesure de la **radioactivité** dont l'amplitude est **proportionnelle** (directement ou inversement) à la quantité du marqueur radioactif

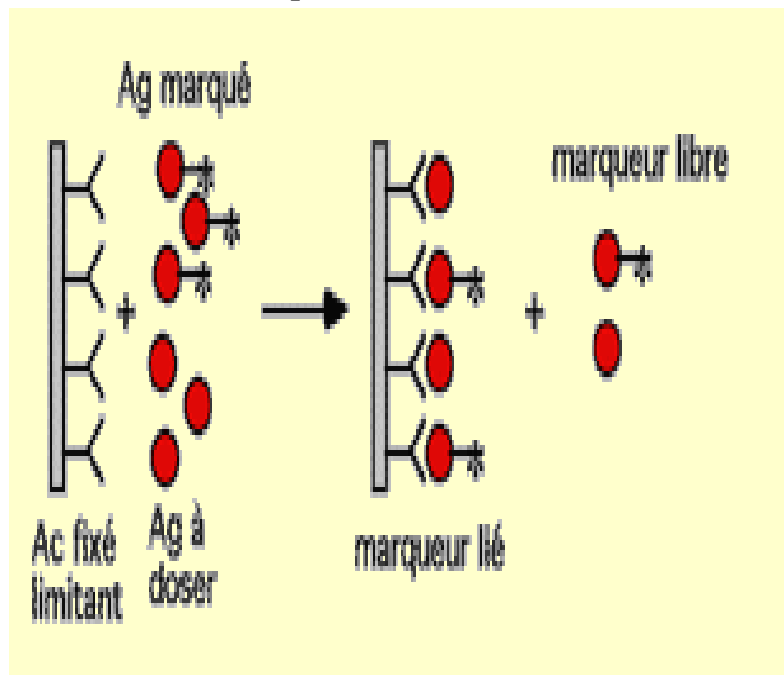
### Les isotopes radioactifs utilisés

- $^{125}\text{I}$  : émetteur  $\gamma$ ,  $E = 35 \text{ KeV}$ ,  $T = 60 \text{ j}$  (c'est le plus utilisé)
- $^3\text{H}$  (**Tritium**) : émetteur  $\beta$ ,  $E = 19 \text{ KeV}$ ,  $T = 12,3 \text{ ans}$

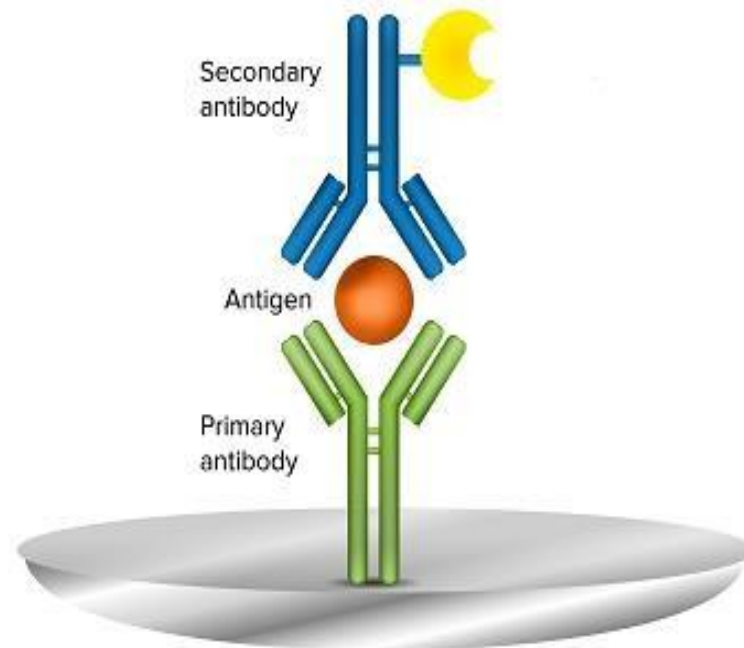


### Techniques Radio-immunologiques

#### Par compétition



#### Sandwich



#### Par compétition

### Immuno-précipitation en milieu liquide (Test de Farr) :

- Test de Farr est une technique de dosage RAI :
  - Pour la détection des **Ac anti-ADN**
  - Utilise de l'**ADN db marqué par un radio-isotope**
  - **Elle se déroule en 4 étapes :**
    1. Incubation du **sérum du patient** avec l'**ADN double brin marqué**
    2. Séparation des complexes immuns par précipitation et centrifugation
    3. Elimination de l'**ADN double brin** marqué non lié à un anticorps
    4. Mesure de la radioactivité (proportionnalité entre la radioactivité mesurée et la quantité d'anticorps présents dans le sérum)

### Test de Farr

Ces techniques ont été progressivement supplanté par l'emploi de marqueurs non isotopiques (enzymatiques et luminescents) offrant une plus grande facilité d'emploi **sans les restrictions réglementaires liées à la manipulation des produits radioactifs**

