

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

L'étude du système immunitaire nécessite l'utilisation d'un grand nombre de techniques et procédés basés en particulier sur les anticorps, dont les applications sont très importantes en biologie.

Des techniques immunologiques qui mises en évidence ou à la recherche:

- **Des antigènes** présentes dans les cellules - dans les tissus - dans les liquides biologiques (sérum, urines...) utilisant des anticorps –polyclonaux – monoclonaux.
- **Des anticorps** essentiellement dans le sérum - plus rarement dans les autres liquides biologiques (salive...) utilisant des antigènes correspondant.

Le choix de la technique est en fonction de :

- La concentration de l'antigène ou de l'anticorps.
- La Forme de l'antigène (soluble ou particulaire)
- La localisation de l'antigène ou de l'anticorps

VIII .1. Principe de base

Les techniques immunologiques reposent sur **une réaction antigène-anticorps**

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 **complexe- immun**.

Le complexe –immun est le produit qui sera mis en évidence dans toutes les techniques immunologiques.

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

VIII .2. Méthodes de détection des antigènes et des anticorps

Le but de ces techniques immunologiques est de pouvoir détecter la présence (ou absence) d'un Ac ou Ag dans un milieu (méthode qualitative). Certaines méthodes peuvent, en plus de l'aspect qualitatif, nous renseigner sur la quantité d'Ac ou d'Ag présent dans le milieu, permettant ainsi des dosages (méthode quantitative). Il existe 2 grands groupes de réaction :

- **Les réactions produisant un " signal " directement visible** : méthode de précipitation et d'agglutination
- **Les réactions ne produisant pas de " signal " :** méthode de marquage.

VIII .2. 1. Méthodes de précipitation

Les réactions d'immunoprécipitation utilisent des Ag solubles qui vont réagir in vitro avec un Ac possédant plusieurs sites antigéniques (au moins bivalent), pour former un réseau macromoléculaire de grande taille. Une macromolécule (ou molécule polymère) est une très grande molécule, qui possède une masse moléculaire relativement élevée. Plus le réseau macromoléculaire sera de grande taille, plus il aura tendance à précipiter. Pour cela, il existe un rapport optimal Ag/Ac pour lequel la taille du réseau sera maximale (zone d'équivalence). Lorsqu'un des réactifs est en large excès par rapport à l'autre, il y a un risque de redissolution de complexe immun (phénomène de zone).

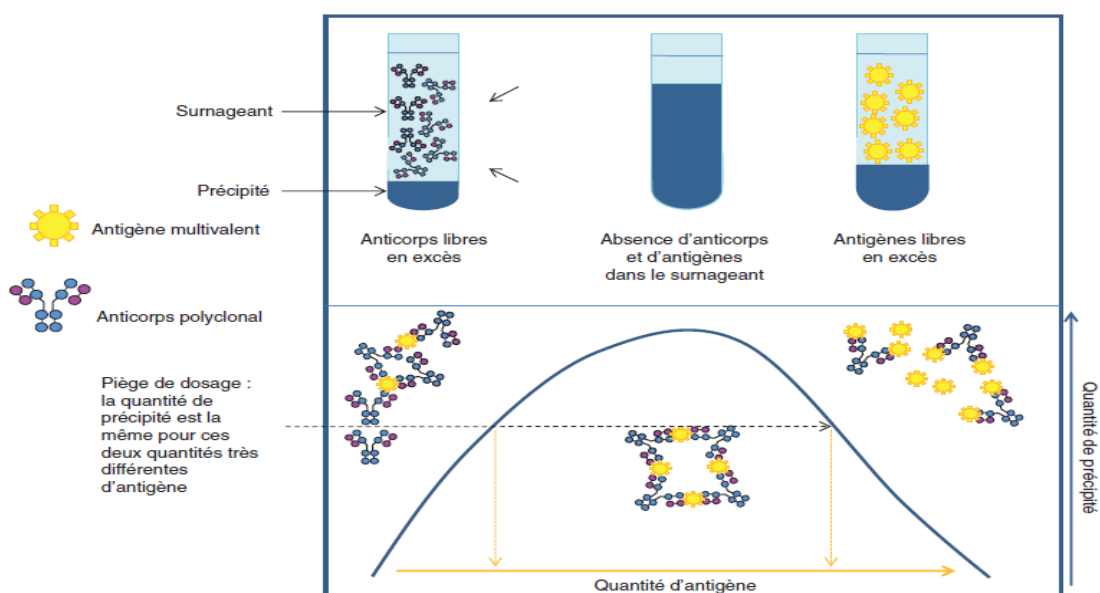


Figure 29: Courbe de précipitation

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

Deux principes optiques d'appareillages automatisables, basés sur la déviation d'un faisceau monochromatique laser au contact des particules de précipité, ont été développés :

1. **Turbidimétrie** : la mesure de lumière transmise produit un signal décroissant avec la concentration d'antigènes.

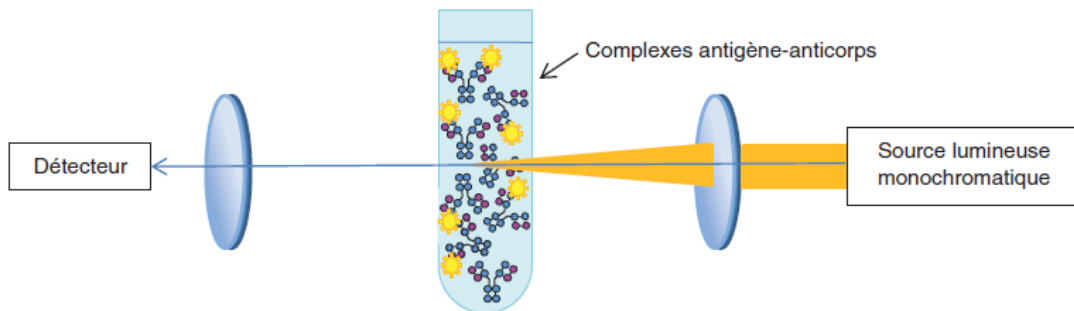


Figure 30: Principe de la Turbidimétrie.

2. **Néphélémétrie** : la mesure de la dispersion de la lumière produit un signal croissant avec la concentration d'antigènes.

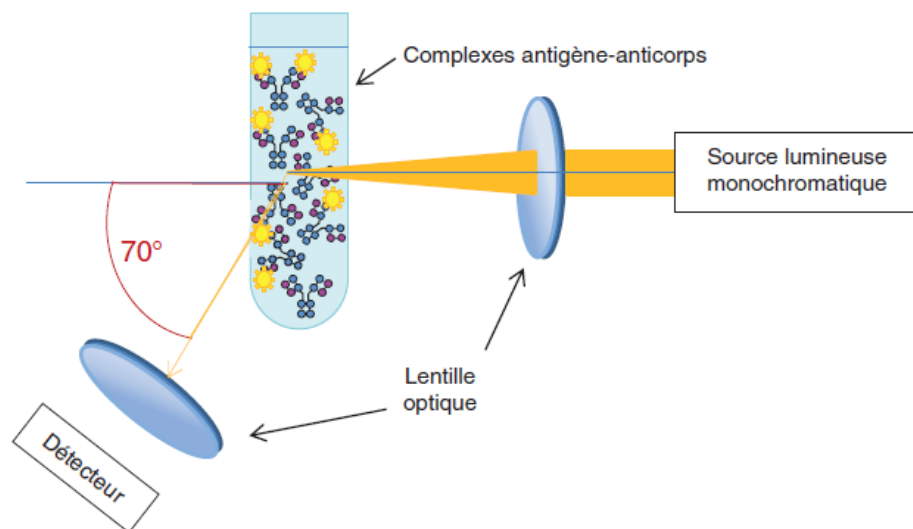


Figure 31: Principe de la Néphélémétrie.

Exemples d'applications

- **En recherche** : l'immunoprécipitation en milieu liquide est couramment utilisée pour l'étude de protéines. Les extraits protéiques à analyser (e.g. milieu de culture, lysat cellulaire) sont incubés avec les anticorps. Cette étape permet la formation des complexes antigène-anticorps. Les complexes sont séparés

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

par simple centrifugation, ou grâce à un anticorps anti-immunoglobulines ou une protéine liant le Fc des immunoglobulines, couplés à des billes.

- **En clinique :** la néphélométrie est utilisée en pratique courante pour le dosage des protéines sériques, dont les isotypes majeurs des immunoglobulines (IgG, IgA, IgM et accessoirement IgD) et certains composants du complément (C3, C4, C1-inhibiteur et facteur B). Les techniques avec particules de latex permettent le dosage des facteurs rhumatoïdes, de certaines sous-classes d'IgG et des chaînes légères libres.

VIII .2. 2. Méthodes d'agglutination

Les réactions d'immunoagglutination utilisent des Ag insolubles en suspension (non pas en solution). Ces Ag vont réagir spécifiquement avec des Ac multivalents pour former des réseaux de particules insolubles qui deviennent alors visible à l'oeil nu. Cette méthode est largement appliquée à la détermination des groupes sanguins et à la détection d'Ac. (Hémagglutination).

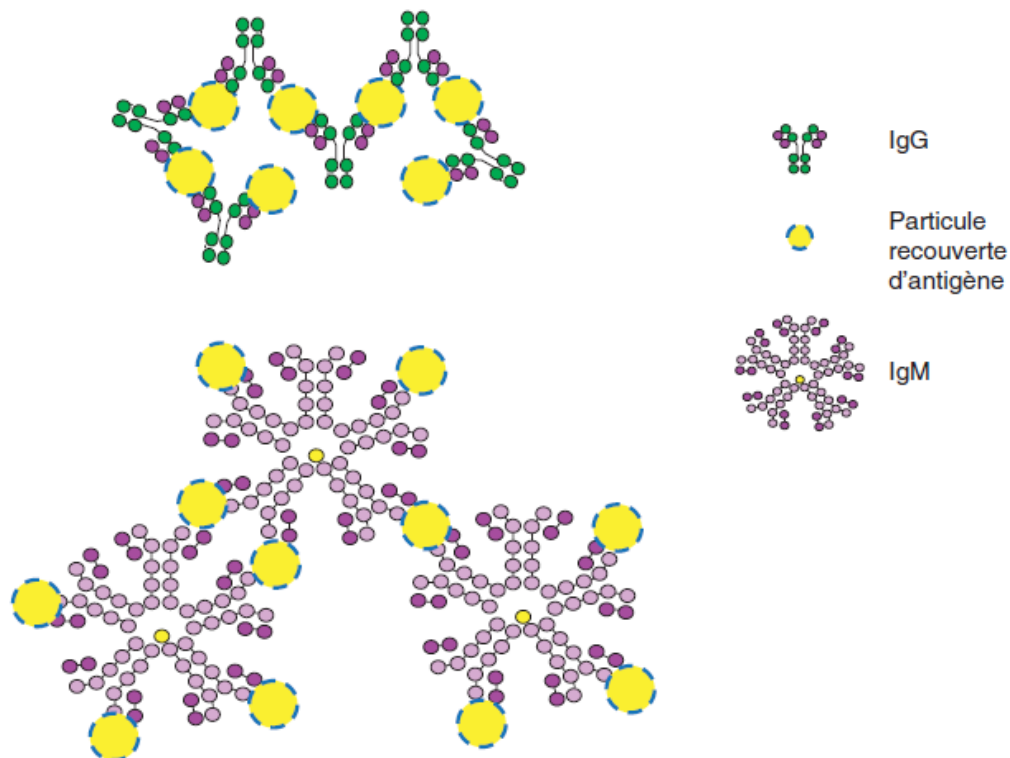


Figure 32: Exemple d'agglutination directe avec des anticorps agglutinants de type IgG et IgM.

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

Exemples d'applications

- **En recherche :** cette technique peut être appliquée à de nombreuses combinaisons antigène anticorps.
- **En clinique :**
 - les groupes sanguins sont déterminés par agglutination active ou directe. Ce type de réactions est également appliqué aux sérogroupages bactériens (e.g. Salmonella, Shigella, E. coli entéro-pathogènes) ;
 - la recherche d'anticorps anti-hématies est réalisée dans le cadre des anémies hémolytiques par les tests de Coombs directs ou indirects ;
 - l'agglutination passive est utilisée par exemple pour la recherche d'anticorps antitoxoplasme dans un sérum après fixation d'un antigène soluble de toxoplasme sur des billes de latex ;
 - la néphélométrie microparticulaire est utilisée pour le dosage des facteurs rhumatoïdes.

VIII .2. 3. Immunoélectrophorèse

Cette méthode est une combinaison de l'électrophorèse des protéines et de l'immuno-précipitation. L'échantillon et un standard de référence sont d'abord séparés par électrophorèse. Puis on fait diffuser un antisérum perpendiculairement à la séparation électrophorétique. Dans la région d'équivalence, la formation de complexes immuns mène à l'apparition de lignes de précipitation précises. L'intensité, la forme et l'endroit des arcs de précipitation servent à identifier les protéines. L'immunoélectrophorèse est appliquée en cas de suspicion de gamma pathies mono- ou polyclonales. Les immunoglobulines polyclonales sont distribuées de façon homogène dans la fraction des gammaglobulines après séparation électrophorétique. En revanche, les immunoglobulines monoclonales forment un pic local dans la fraction des gammaglobulines (gradient M) ; ce dernier se manifeste sous forme d'incurvation dans l'arc de précipitation

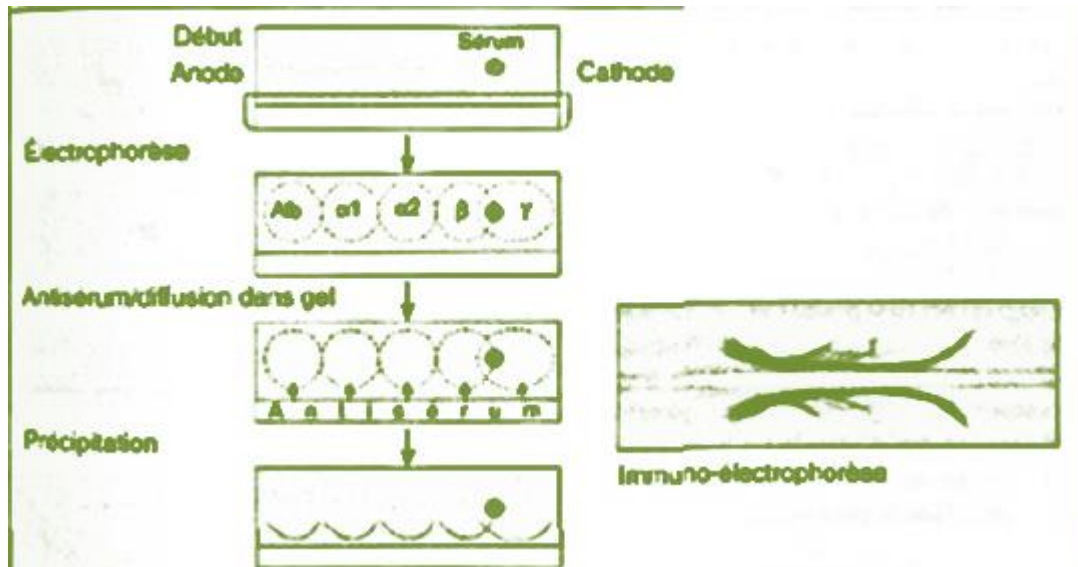


Figure 33: Représentation schématique des étapes de l'immunoélectrophorèse.

VIII .2. 4. 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 complexes immuns non précipitant et non agglutinant. Le grand principe du marquage est de fixer sur un des réactifs une substance qui permettra d'identifier les complexes immuns recherchés. Les marqueurs les plus utilisés sont :

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

Les signaux émis sont détectés (méthode qualitative) et peuvent être mesurés (méthode quantitative).

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

A. L'immunoenzymologie: plus connue sous le nom d'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Dans cette réaction, l'antigène ou l'anticorps est marqué avec une enzyme, qui permet de transformer un substrat incolore en produit coloré. Le temps de réalisation varie de moins d'une heure à plusieurs heures. La lecture est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre.

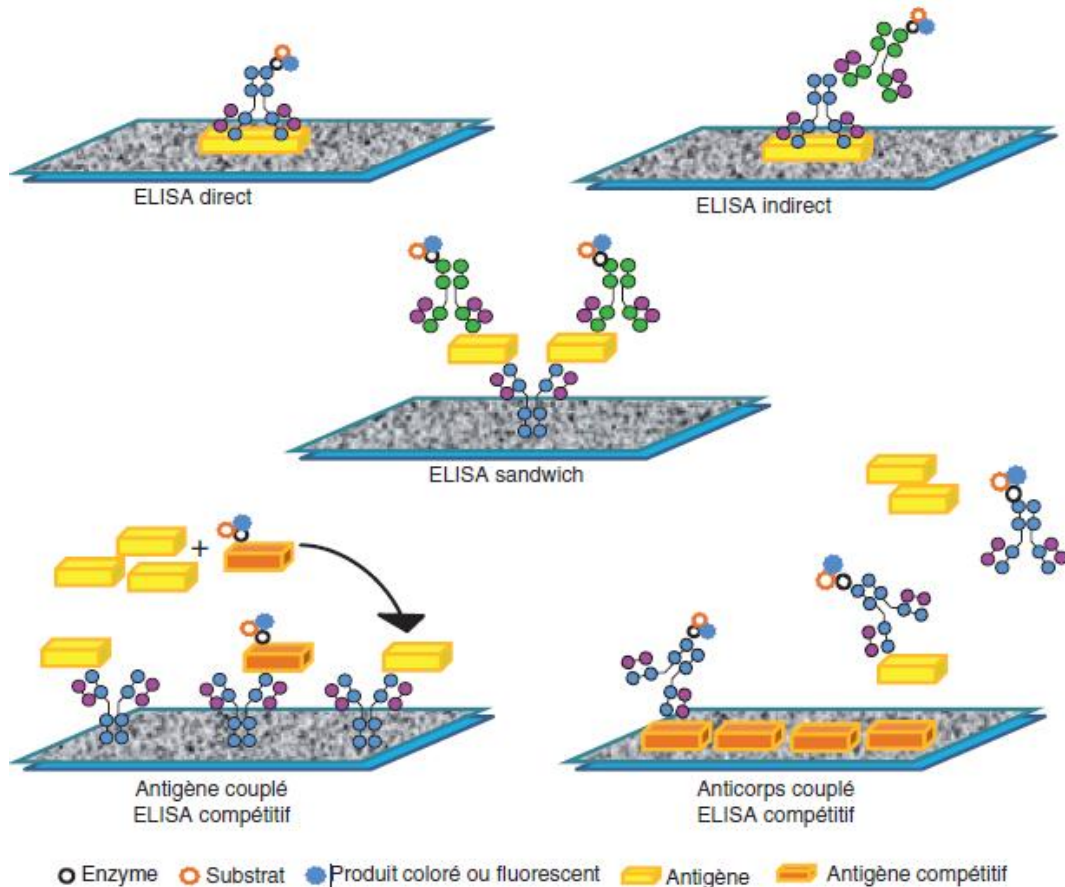


Figure 34: Représentation schématique des différents types d'ELISA.

Exemples d'applications

L'ELISA est une technique très couramment développée dans le domaine du diagnostic biologique ou en recherche fondamentale.

- **En recherche :** le dosage de protéines d'intérêt dans des surnageants ou lysats cellulaires est réalisé fréquemment en ELISA.

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

- **Applications industrielles et vétérinaires** : ces techniques sont également appliquées dans le contrôle qualité des produits finis ou en cours de production, ainsi qu'en épidémiologie et contrôle vétérinaire.
- **En clinique** : l'ELISA est très utilisée pour le sérodiagnostic des maladies infectieuses et pour le diagnostic et le suivi de maladies auto-immunes.

B. La radioimmunologie: connue aussi sous le nom de RIA (Radio-Immuno-Assay) basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif. Les techniques radio immunologiques ont pu être mises au point à la suite de la découverte des radioisotopes qui constituent des traceurs très sensibles. Ces techniques ont été initialement développées pour le dosage de l'insuline, puis d'autres hormones. Pendant longtemps, l'iode-125 a été le seul marqueur radioactif utilisé dans la mise au point et la réalisation des immunodosages de substances présentes à des concentrations très faibles dans les liquides biologiques et les tissus. Il a 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. La sensibilité des techniques radio-immunologiques est de l'ordre du pmol/L ou du ng/mL. Cette sensibilité permet le dosage de certaines hormones stéroïdes, de vitamines, de médicaments, de marqueurs tumoraux ou d'auto-anticorps.

C. L'immunofluorescence: l'immunofluorescence directe se sert d'anticorps marqués par le réactif fluorescent, alors que l'immunofluorescence indirecte s'appuie sur un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome pour révéler la fixation de l'anticorps primaire spécifique de l'antigène. L'immunofluorescence directe permet de détecter deux antigènes ou plus simultanément. En revanche, l'immunofluorescence indirecte possède une sensibilité supérieure pour la détection d'antigènes faiblement exprimés, puisque plusieurs molécules de l'anticorps secondaire peuvent se lier à une molécule d'anticorps primaire. La membrane cellulaire peut être perméabilisée par fixation afin de permettre la détection d'antigènes cytosoliques. L'immunofluorescence est également utilisée pour l'analyse de cellules en suspension, de sections de tissus ou de préparations obtenues à l'aide de cytocentrifugeuses.

Chapitre VIII: Les principaux tests en immunologie

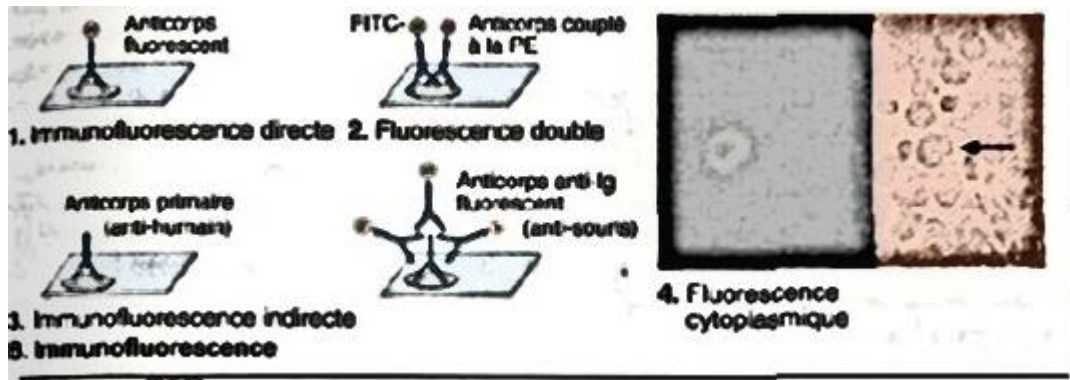


Figure 35: Représentation schématique des différents types de l'immunofluorescence.

Tableau 4. Caractéristiques des différents fluorochromes et tandems les plus utilisés en immunofluorescence

Fluorochrome	Tandem	Couleur	Laser d'excitation	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Sensibilité
FITC : isothiocyanate de fluorescéine	Non	Vert	Bleu	495	519	Moyenne
PE : phycoérythrine	Non	Jaune	Bleu	480/565	578	Forte
PE-Cy5 : phycoérythrine-cyanine 5	Oui	Rouge	Bleu	480/565/650	670	Bonne
PE-Cy7 : phycoérythrine-cyanine 7	Oui	Rouge	Bleu	480/565/743	767	Bonne
PerCP-Cy5.5 : peridinin-chlorophylle/cyanine 5.5	Oui	Rouge	Bleu	490	675	Moyenne
ECD : phycoérythrine-Texas red	Oui	Orange	Bleu	486	620	Forte
Cy5 : Cyanine 5	Non	Rouge	Rouge	650	670	Moyenne
Cy5.5 : Cyanine 5.5	Non	Rouge	Rouge	675	694	Moyenne
APC : allophycocyanine	Non	Rouge	Rouge	650	660	Forte
APC-Cy7 : allophycocyanine-cyanine 7	Oui	Rouge	Rouge	650/755	767	Faible
Pacific blue	Non	Bleu	UV/violet	403	455	Faible
Krome Orange®	Non	Orange	UV/violet	398	528	Forte
Horizon V500	Non	Bleu-vert	UV/violet	415	500	Forte