

MÉTHODES IMMUNOLOGIQUES

1. Principe général :

Les techniques immunologiques sont basées sur les réactions antigène-anticorps qui sont des réactions hautement spécifiques et sensibles due à la complémentarité stéréochimique des sites. Ces techniques consistent à l'utilisation des anticorps pour identifier ou doser des substances.

2. Réaction anticorps-antigène (AC-AG) :

2.1. Mécanisme :

L'AC est défini par deux propriétés :

1. Il s'agit d'une immunoglobuline caractérisée par deux chaînes lourdes et légères et un extrême polymorphisme du site AC.
2. Il est capable de se lier très spécifiquement à l'AG qui a suscité sa synthèse, par l'intermédiaire de sites particuliers : site AG (épitope) et site AC (extrémité N terminal).

En fait, l'AC possède toujours deux sites de liaison. Alors que l'AG possède de un à des centaines selon la taille.

2.2. Obtention des réactifs immunochimiques :

2.2.1. Préparation des AG :

L'obtention d'AC spécifique passe par l'immunisation d'animaux :

- La plupart des grosses molécules (protéines, polysides) sont directement antigéniques : immunogènes.
- Les petites molécules (stéroïdes, certains médicaments) n'entraînent pas de réponse AC (sont appelés donc haptènes), donc ils sont transformés en immunogènes par couplage chimique avec des grosses molécules (généralement des protéines).

2.2.2. Obtention d'AC polyclonaux :

Immunsation :

Les méthodes traditionnelles d'immunisation permettent d'obtenir des AC polyclonaux : mélange d'AC issus de nombreuses cellules lymphoïdes, chacun d'entre eux reconnaissant un épitope différent ou un même épitope avec des affinités différentes.

En fait, les animaux (lapin, cobaye, chèvre, mouton, cheval) sont immunisés avec des petites doses d'AG.

Épuisement des antisérums :

Cette étape consiste à éliminer les AC indésirables (AC parasites, anti-porteurs). Elle nécessite une bonne connaissance de l'AG utilisé. Elle se fait en ajoutant à l'antisérum brut des AG correspondant aux AC parasites, puis en éliminant les complexes AC-AG formés.

Purification des AC :

Cette purification est obtenue par chromatographie sur colonne.

2.2.3. Obtention d'AC monoclonaux :

- ✓ Ces AC sont produits par un clone de lymphocyte B. ils ont la même spécificité et la même affinité immunitaire.
- ✓ Ces AC peuvent être produits, in vitro, par des lignées continues de lymphocytes ; généralement des hybridomes sélectionnés pour leur production d'AC dirigés contre un AG déterminé (hybridome = myélome + lymphocyte B).
- ✓ Donc, il n'est pas nécessaire d'isoler l'AG pour obtenir l'AC, il suffit de savoir faire la sélection de l'hybridome intéressant parmi des milliers d'autres.

3. Classification des méthodes immunochimiques :

Obtention directe des effets de la réaction AG-AC	
Méthodes de précipitation	<ul style="list-style-type: none"> • Immunoprécipitation en solution ; • Immunodiffusion en gel ; • Immunoélectrophorèse.
Méthodes d'agglutination	Formation d'agrégats par interaction entre molécules solubles et particules insolubles. Exp : agglutination des bactéries par des AC, agglutination des globules rouges par des lectines.
Observation de la réaction AG-AC par l'intermédiaire d'un réactif marqué	
Dosage par mesure de la distribution du réactif marqué	<ul style="list-style-type: none"> • Marque isotopique ; • Marque enzymatique ; • Marque fluorescente ; • Marque luminescente.
Dosage par modulation de l'activité de la marque	<ul style="list-style-type: none"> • Marque enzymatique ; • Marque fluorescente.
Localisation par marquage	<ul style="list-style-type: none"> • Technique macroscopique ; • Technique microscopique ; • Technique ultramicroscopique ; • Analyse et comptage de particules fluorescentes.
Observation d'un effet biologique de la réaction immunitaire	
Lyse cellulaire	<ul style="list-style-type: none"> • Hématies ; • Lymphocytes ; • Micro-organismes.
Mobilité	<ul style="list-style-type: none"> • Test d'immobilisation ; • Inhibition de la migration.
Différentiation et modification cellulaire	Des cellules immunitaires
Neutralisation	<ul style="list-style-type: none"> • Activité enzymatique ; • Activité toxique ; • Infectiosité.

Méthodes de précipitation

1. Immunoprécipitation en milieu liquide :

1.1. Principe :

- ✓ Cette technique est basée sur le changement de solubilité du complexe AG-AC.
- ✓ Lorsque l'AG possède trois sites ou d'avantage, un réseau moléculaire tridimensionnel peut se créer. La taille de l'ensemble devient importante, sa solubilité diminue et l'on peut observer une précipitation pouvant survenir en quelques minutes.
- ✓ Cette technique permet des procédés qualitatifs et quantitatifs.
- ✓ Vu le coût des antisérums, on travaille avec des solutions diluées ; ce qui empêche d'avoir une véritable précipitation mais seulement une opalescence de la solution.

Il existe deux précédés optiques différents permettant la détermination quantitative de l'opalescence :

1.2. Immunoturbidimétrie :

- ✓ Cette technique permet de mesurer l'affaiblissement quantitatif d'un rayon lumineux traversant la solution. Les longueurs d'onde utilisées sont situées entre 340 et 360nm mais on utilise, habituellement, 280nm.
- ✓ Le dosage par cette technique nécessite la réalisation d'une courbe d'étalonnage à l'aide de quantités connues d'AG et antisérum de spécificité connue.
- ✓ L'appareillage utilisé est un spectrophotomètre.
- ✓ La limitation de cette technique est le manque relatif de sensibilité.

1.3. Immunonéphélométrie :

- ✓ Dans cette technique, la quantité du complexe immun est mesurée par la capacité de disperser la lumière. Donc mesure de la fraction de la lumière diffusée.
- ✓ L'appareillage utilisé est un néphélomètre.
- ✓ Cette méthode est rapide et 10 fois plus sensible que la turbidimétrie.

2. Immunoprécipitation en milieu gélifié :

2.1. Principe :

Dans ce procédé, l'AC et l'AG circulent dans un réseau moléculaire à large maille : la gélose ou l'agarose (produit purifié de la gélose).

La réaction AG-AC se matérialise par un arc de précipitation le plus souvent visible à l'œil nu.