

# TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

## Généralités

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.

## 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

## 1 Méthodes de précipitation

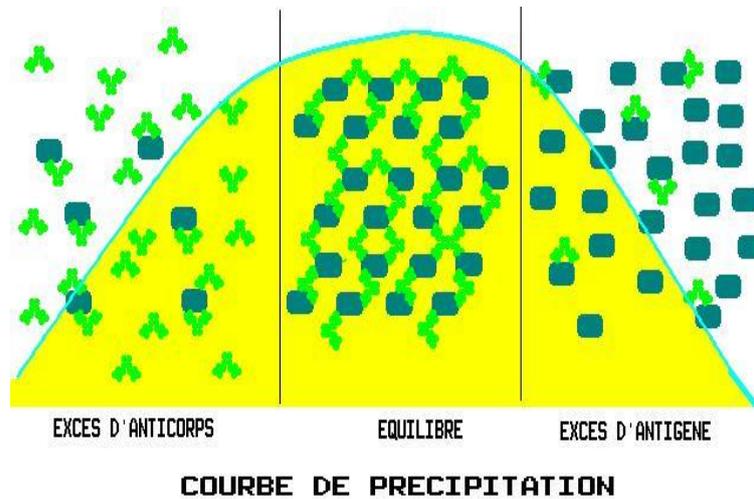
Les réactions d'immunoprécipitation utilisent des Ag solubles qui vont réagir *in vitro* avec un Ac possédant plusieurs sites antigéniques (au moins bivalent), pour former un réseau macromoléculaire de grande taille.

Une **macromolécule** (ou molécule polymère<sup>1</sup>) 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 l'immunocomplexe (phénomène de zone).

- 1 - au départ, il ne se passe rien (effet zone) : pas de ponts entre les Ag par excès d'anticorps
- 2 - puis apparaît un trouble, un précipité : zone d'équilibre entre Ag et anticorps formant réseau moléculaire responsable de l'agglutination
- 3 - enfin ce trouble disparaît : dissociation du réseau par excès d'Ag.

Ces interactions peuvent se traduire par une courbe de précipitation.

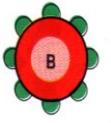
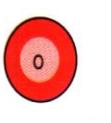
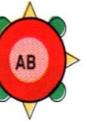


## 2 Méthodes d'agglutination

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)

Globules rouges d'individus du groupe				
				
Hydrates de carbone exprimés				
Sérum d'individus du groupe	GlcNAc - Gal - GalNAc Fuc	GlcNAc - Gal - Gal Fuc	GlcNAc - Gal Fuc	GlcNAc - Gal - GalNAc Fuc GlcNAc - Gal - Gal Fuc
 Anticorps anti-B	pas d'agglutination	agglutination	pas d'agglutination	agglutination
 Anticorps anti-A	agglutination	pas d'agglutination	pas d'agglutination	agglutination
 Anticorps anti-A et anti-B	agglutination	agglutination	pas d'agglutination	agglutination
<b>AB</b> Pas d'anticorps contre A ou B	pas d'agglutination	pas d'agglutination	pas d'agglutination	pas d'agglutination

**L'hémagglutination est utilisée pour le typage des groupes sanguins ABO et pour l'épreuve de compatibilité entre donneur et receveur.** Des anticorps contre les antigènes du système de groupe sanguin ABO sont trouvés chez tous les individus qui n'ont pas l'antigène A et/ou B. Dès lors, les individus du groupe O qui n'ont ni A ni B, ont les deux anticorps anti-A et anti-B, tandis que les individus du groupe AB n'ont aucun de ces anticorps. Le tableau de la réactivité des globules rouges d'un donneur ou d'un receveur avec des anticorps anti-A et anti-B révèle leur groupe sanguin respectif. Avant une transfusion, on teste aussi dans le sérum du receveur la présence d'anticorps qui agglutineraient les globules rouges du donneur et vice versa. Cette procédure s'appelle le « cross-match » au lit du malade, et permet de détecter d'autres anticorps potentiellement dangereux contre d'autres groupes sanguins que le système ABO. L'antigène du groupe sanguin O est un hydrate de carbone (montré dans la seconde rangée du tableau) qui est présent sur toutes les cellules, y compris les globules rouges. Ce noyau carbohydrate peut être modifié de deux manières pour donner soit des antigènes de type A ou B, qui caractérisent le groupe A ou le groupe B. Certains individus portent les deux substances A et B et appartiennent au groupe AB.

### 3 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 :

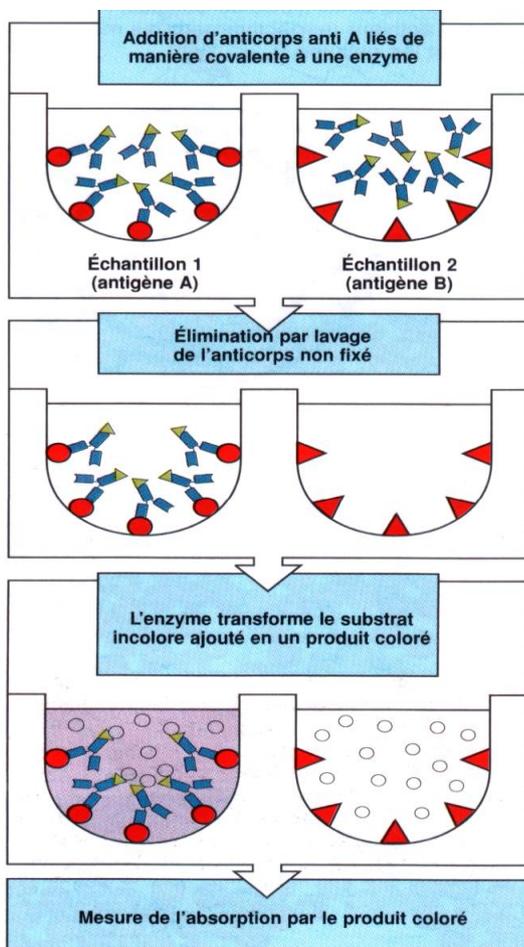
- les fluorochromes (fluorescéine ou rhodamine)
- les radio-isotopes
- les enzymes (phosphatase alcaline ou peroxydase)

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

3-1. *l'immunoenzymologie*, plus connue sous le nom d'*ELISA* (Enzyme Linked ImmunoSorbent 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

3-2 *la radioimmunologie*, connue aussi sous le nom de *RIA* (Radio-Immuno-Assay) basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif. Cette technique est de moins en moins utilisée en raison de la nécessité d'un agrément pour les biologistes utilisateurs et en raison du problème des déchets radioactifs

3-3 *l'immunofluorescence* (l'antigène ou l'anticorps est marqué avec un fluorochrome). Le temps de réalisation d'une technique d'immunofluorescence est de moins de 2 heures. La lecture nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence ou d'un cytomètre en flux.



**Principe de l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).** Pour détecter un antigène A, l'anticorps anti-A purifié est chimiquement couplé à une enzyme. Les échantillons à tester sont fixés sur la surface de puits en plastique par adsorption non-spécifique ; les sites potentiels de fixation non-occupés par l'antigène sont bloqués par l'adsorption d'une protéine quelconque (non montré). L'anticorps marqué est alors ajouté dans les puits dans des conditions où sa fixation non-spécifique est empêchée, de sorte que seule sa liaison à l'antigène A fixé le retient sur la surface. L'anticorps non lié est éliminé par lavage et l'anticorps lié est détecté par l'adjonction d'un substrat incolore qui donnera une coloration due à l'activité enzymatique. Ce test se fait sur des plaques portant plusieurs rangées de puits, dont la coloration peut être mesurée dans un spectrophotomètre à multicanaux de fibres optiques, ce qui assure la rapidité de la lecture.