

Université Moustapha Benboulaïd - Batna

Faculté des SNV

Département de Microbiologie et de Biochimie

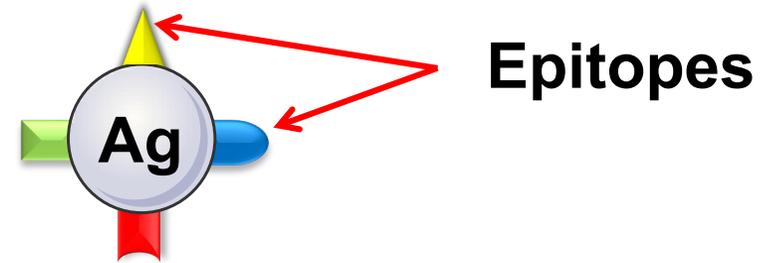
**SÉPARATION ET ANALYSE DES
BIOMOLÉCULES**

Présenté par : Dr. AOUACHRIA S.

Réaction Ag-Ac

Base moléculaire de la réaction

1. Antigène



- ✓ Toute molécule naturelle ou synthétique capable de **se lier spécifiquement** à un anticorps ou au TCR.
- ✓ Cette molécule est le plus souvent de nature **peptidique** ou **glucidique** ; il peut s'agir aussi de **lipides** ou d'**acides nucléiques**.
- ✓ La partie de l'antigène reconnue spécifiquement par un récepteur antigénique (anticorps ou TCR) est appelée **épitope** ou **déterminant antigénique**.

Réaction Ag-Ac

Base moléculaire de la réaction

1. Antigène

- ✓ Le **nombre d'épitopes identiques** par molécule d'antigène est appelé la **valence de l'antigène**. Un antigène présentant plusieurs épitopes identiques est dit "**multivalent**".
- ✓ Un **immunogène** est tout antigène capables d'induire *in vivo* **une réponse immunitaire spécifique** (humorale ou cellulaire) et de **réagir spécifiquement** avec les molécules de reconnaissance ainsi induites (anticorps ou TCR).
- ✓ Bien que **tous les immunogènes soient des antigènes**, **tous les antigènes ne sont pas des immunogènes**.

Réaction Ag-Ac

Base moléculaire de la réaction

1. Antigène

- ✓ Un **haptène** est une molécule de **faible masse moléculaire** (inférieure à 1 KDa), **antigénique** mais **non immunogène** par elle-même.
- ✓ On peut ainsi distinguer des antigènes : **naturels**, **synthétiques** et **artificiels** (naturels chimiquement modifiés)
- ✓ Parmi les antigènes naturels, on distingue des : **xénoantigènes**, **alloantigènes** et **autoantigènes**.

Réaction Ag-Ac

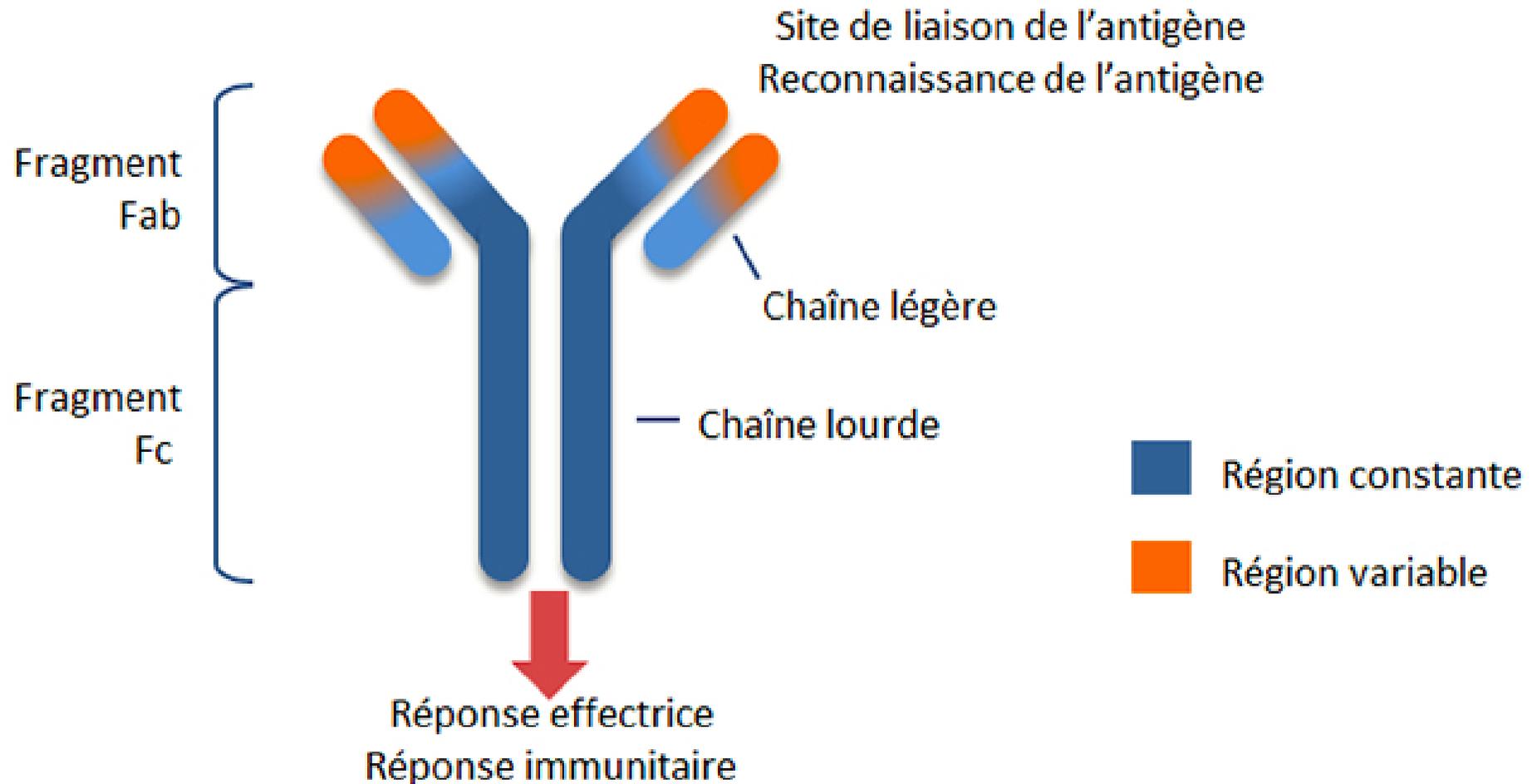
Base moléculaire de la réaction

2. Anticorps

- ✓ **Immunoglobulines (Ig)** sont des **glycoprotéines globulaires** produits par les **lymphocytes B** qui ont une activité anticorps ; ils se fixent aux antigènes avec une **grande affinité** et une **grande spécificité**.
- ✓ Le **site complémentaire** de l'anticorps dont l'Ag se lie du façon stéréospécifique est appelé **paratope**.

Réaction Ag-Ac

Base moléculaire de la réaction



Réaction Ag-Ac

Base moléculaire de la réaction

3. Complexe immunitaire

- ✓ Le complexe immunitaire est une **combinaison** de l'Ac avec l'Ag.
- ✓ L'**interaction** entre **épitope** et paratope est considéré comme la **clé** du complexe Ac-Ag.
- ✓ La **complémentarité** entre **épitope** et **paratope** induit la formation du **complexe immunitaire**: Si l'épitope correspond au paratope alors il y a présence d'une **force d'attraction**, si non on a une **force de répulsion**.
- ✓ La réaction entre Ac-Ag est une combinaison **spécifique** et **réversible**.

Réaction Ag-Ac

Aspect de la réaction

1. Forces attractifs intramoléculaires

- ✓ Il s'agit d'un ensemble de forces qui fusionnent les Ac aux Ag correspondants.
- ✓ Il existe 4 types de forces non covalentes; dépendantes de la complémentarité entre les sites d' Ac et les déterminant des Ag : **liaisons hydrogène, liaison hydrophobes, forces de Van der Wall et forces ioniques.**

2. Affinité

- ✓ C'est la **somme** des forces d'**attractions** et de **répulsions** entre un épitope et un paratope.

Réaction Ag-Ac

Caractéristiques de la réaction

- ✓ **Exothermique** : la formation d'une liaison Ac/Ag libérant de l'énergie, ce qui influence la température et donc un bon déroulement de la réaction.
- ✓ **Réversible** : les liaisons qui s'effectuent entre l'Ac et l'Ag sont des liaisons faibles, facilement rompues.
- ✓ La **complémentarité** entre **épitope** et **paratope** induit la formation du **complexe immunitaire**: Si l'épitope correspond au paratope alors il y a présence d'une **force d'attraction**, si non on a une **force de répulsion**.
- ✓ La réaction entre Ac-Ag est une combinaison **spécifique** et **réversible**.

Réactions sérologiques

```
graph TD; A[Réactions sérologiques] --> B[Précipitation]; A --> C[Agglutination]; A --> D[Fixation du complément]; A --> E[Neutralisation]; A --> F[Immunomarquage];
```

Précipitation

Agglutination

**Fixation du
complément**

Neutralisation

Immunomarquage

Réactions sérologiques

Précipitation

- ✓ **Ag soluble + Ac (précipitines, Ig polyclonales)**
- ✓ **En milieu liquide ou sur gel**
- ✓ **Lecture : à l'oeil nu ou turbidimètre**
- ✓ **1h à quelques jours**
- ✓ **Peu sensible : 0,01 à 3 mg/l**

Réactions sérologiques

Précipitation

Milieu liquide

Milieu gélif

✓ Température

* 37°C : accélération de la précipitation.

* 0 ° C : la quantité de précipité augmente.

✓ Force ionique

* Précipité maximale à $[\text{NaCl}] < 0,15\text{M}$.

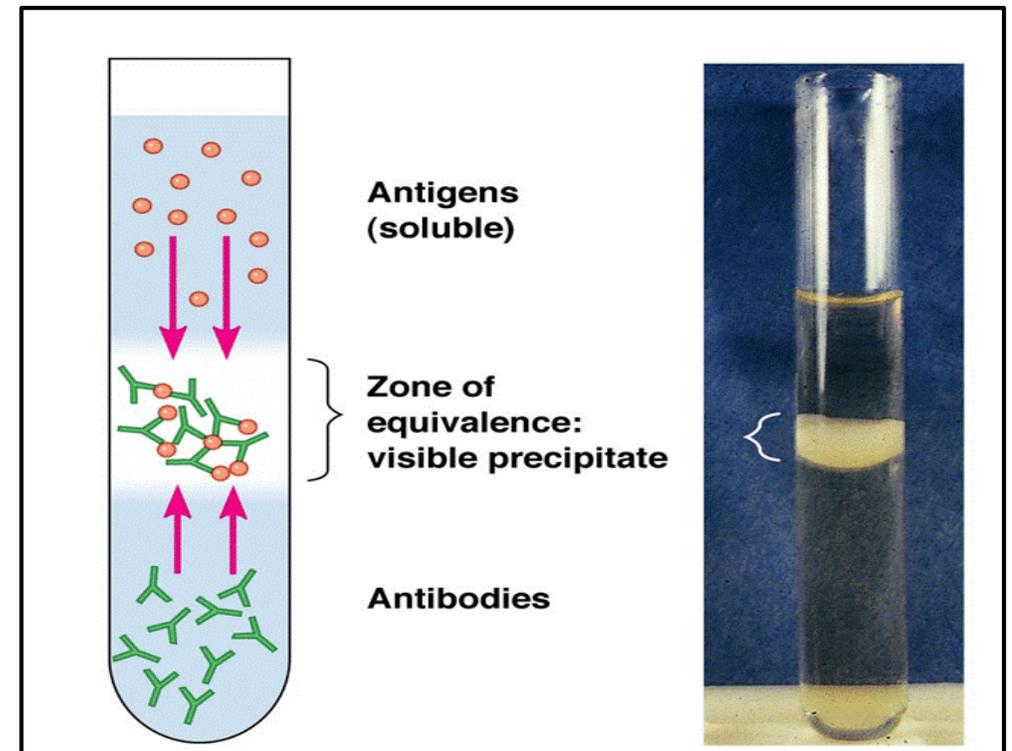
✓ pH

* pH <6 et >8 : inhibition de la réaction.

* pH acide : effet dissociant.

✓ Adjuvant

* Accélération de la réaction.



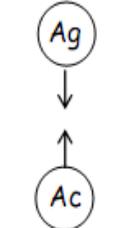
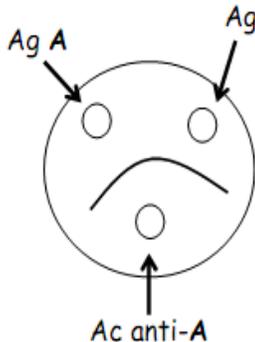
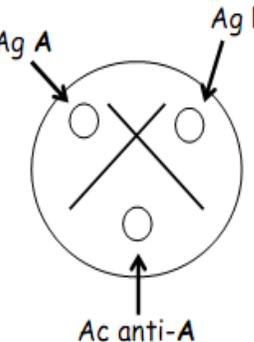
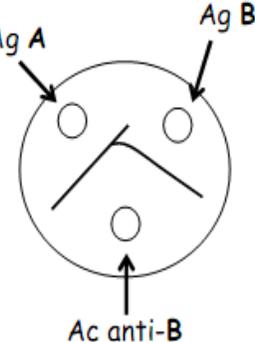
Réactions sérologiques

Précipitation

Milieu liquide

Milieu gélifiant

1. Immunodiffusion double (Ouchterlony)

IDENTITE	OUI	NON	PARTIELLE
<p>Antigènes</p>  <p>Anticorps</p>	 <p>Ac anti-A</p>	 <p>Ac anti-A Ac anti-B</p>	 <p>Ac anti-B</p>
		<p>Les Ag A et B n'ont aucun déterminant antigénique commun</p>	<p>Les Ag A et B possèdent des épitopes communs</p>

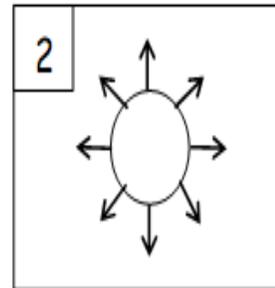
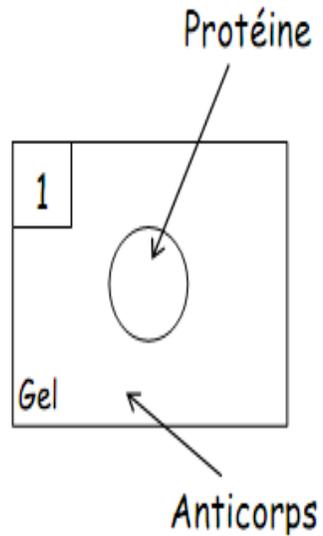
Réactions sérologiques

Précipitation

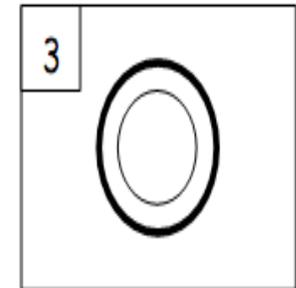
Milieu liquide

Milieu gélif

2. Immunodiffusion Radial (Mancini)



Diffusion selon un gradient de concentration décroissant



Formation d'un anneau de précipitation ; réseau Ag/Ac

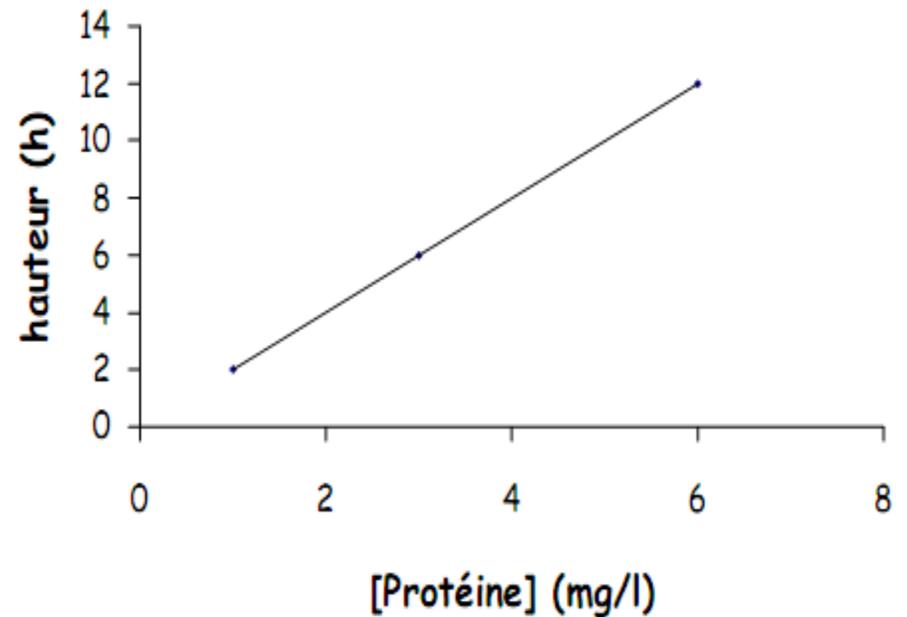
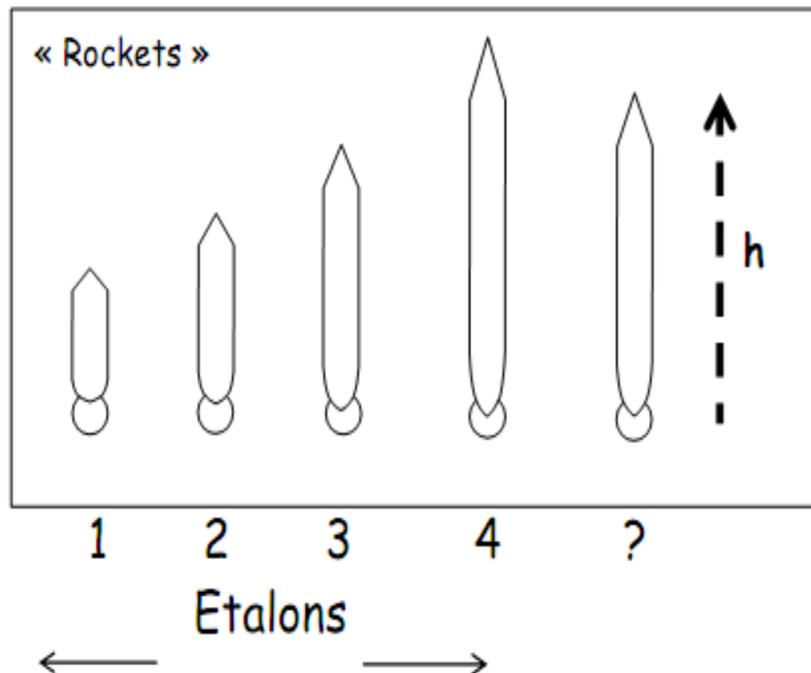
Réactions sérologiques

Précipitation

Milieu liquide

Milieu gélif

3. Electro-immunodiffusion (Laurell)



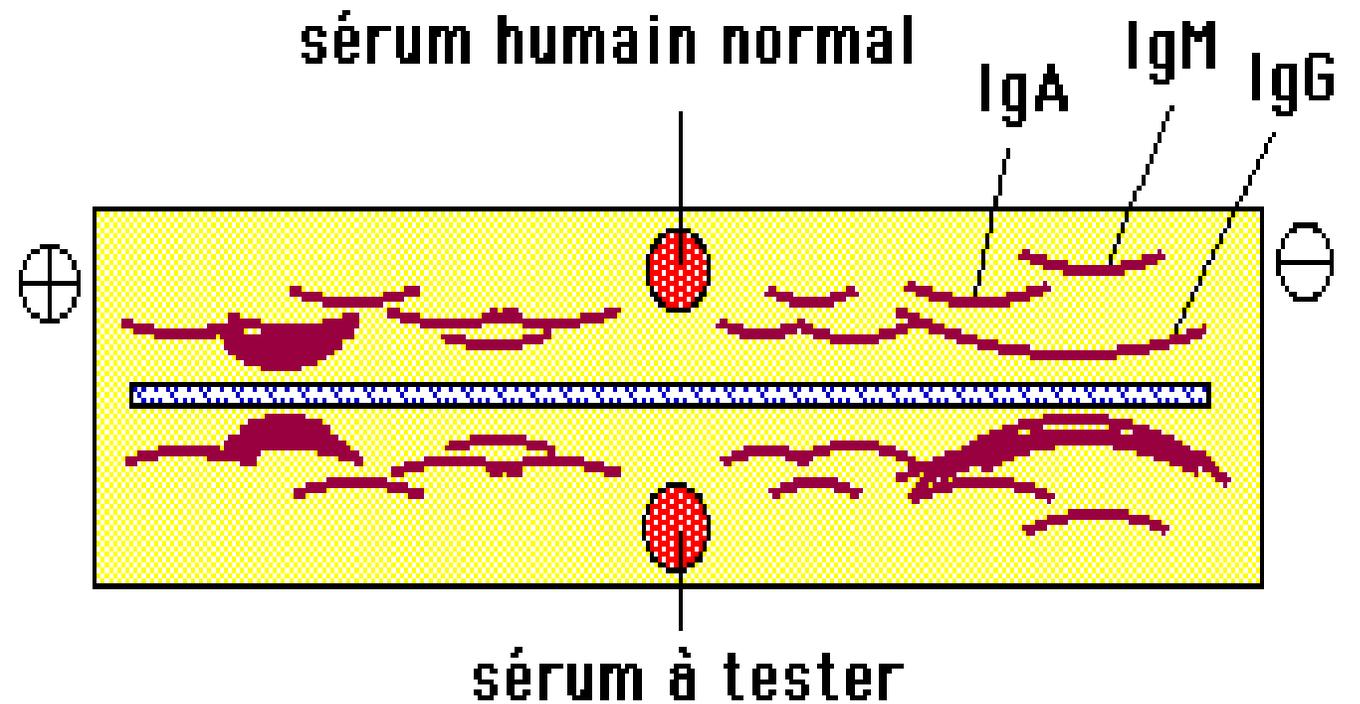
Réactions sérologiques

Précipitation

Milieu liquide

Milieu gélif

4. Immuno-électrophorèse (Grabar et william)



Réactions sérologiques

Agglutination

- ✓ **Ag présent à la surface d'une particule (bactéries, érythrocytes).**
- ✓ **Ac spécifique agglutinant (agglutinine, IgM, liaison multivalente).**
- ✓ **Réseau tridimensionnel.**
- ✓ **Sensibilité: de 0,001 à 0,3 mg/l.**
- ✓ **Lecture : l'oeil nu.**
- ✓ **Quelques minutes.**
- ✓ **Détection: dosages d'Ag ou titrages d' Ac**

Réactions sérologiques

Agglutination

- ✓ Il existe une relation entre l'agglutinabilité et :
 - le nombre de sites antigéniques.
 - leur localisation.
- ✓ Le **titre agglutinant** est l'**inverse** de la **dernière dilution** donnant une **réaction positive**.

Exemple: dilution au 1/6 → titre 6

Réactions sérologiques

Agglutination active

- ✓ Résulte d'une **union spécifique** entre un **Ac** et un **Ag particulière**.
- ✓ Elle peut se faire en **tube**, en **microplaque** ou sur **lame**.
- ✓ Elle peut être **qualitative** ou **quantitative** (titre agglutinant).
 - Sérogroupages bactériens (*Salmonella*, *E. coli*,...)
 - Groupage sanguin ABO

Réactions sérologiques

Agglutination active

- ✓ **Groupage sanguin ABO.**
- ✓ **Test de Widal** pour le diagnostic des fièvres typho-paratyphoidiques.
- ✓ **Test de Wright** pour le diagnostic de la brucellose.
- ✓ **Test de Weil-Felix** pour le diagnostic de la typhose exanthématique (rickettsiose).

Réactions sérologiques

Agglutination passive

✓ Elle est réalisée entre un **Ac** et un **Ag** normalement **soluble**, mais **rendu particulaire** par **fixation sur un support** :

1. Les billes de latex, le polystyrène, la bentonite, le collöide.

→ l'Ag est fixé par simple contact (pH 8,2)

2. Les hématies (**hemagglutination**)

→ l'Ag est fixe par simple contact, par traitement à l'acide tannique, par fixation chimique (glutaraldehyde, dinitrochlorobenzene...) ou par fixation immunologique (cas des Ac dirigés contre des épitopes du GR).

Réactions sérologiques

Agglutination passive: inconvénients

✓ Hématies

- **fragiles**, elles s'hémo lysent en 3 semaines,
(utilisation d'hématies formolées, stables plusieurs mois à 4°C).
- elles portent une **mosaïque d'Ag**.

Réactions sérologiques

Agglutination passive

- ✓ **Quand la culture de l'agent pathogène est non faisable.**
- ✓ **Quand seul l'antigène soluble est disponible.**
- ✓ **Maladies virales**

Réactions sérologiques

Agglutination passive

1. Le test au latex est utilisé pour la **mise en évidence des antigènes** chez l'**Haemophilus**, chez le **pneumocoque** et chez le **méningocoque** (en **LCR**, en **sérum**, dans la **sécrétion pharyngienne**).

2. la **mise en évidence d'anticorps** anti-ADN dans le diagnostic de *Lupus érythémateux* disséminé où les particules de latex sont couvertes d'ADN

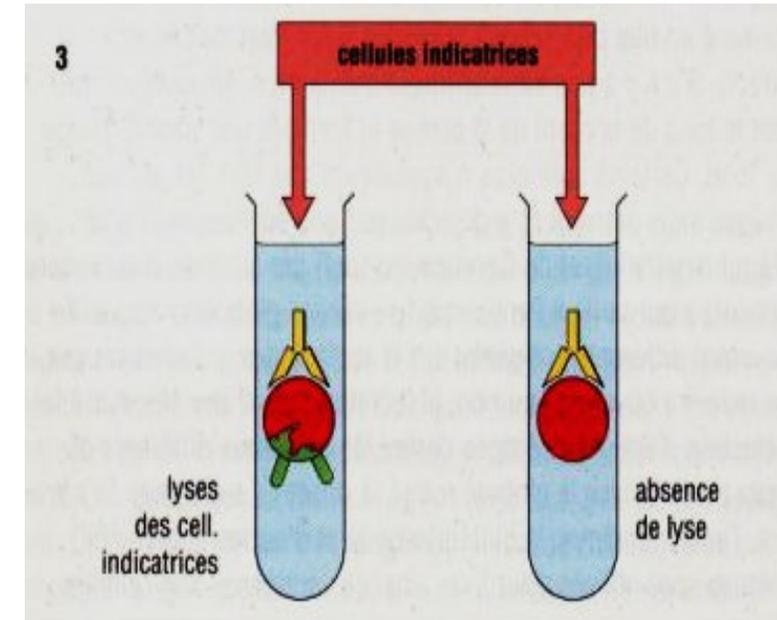
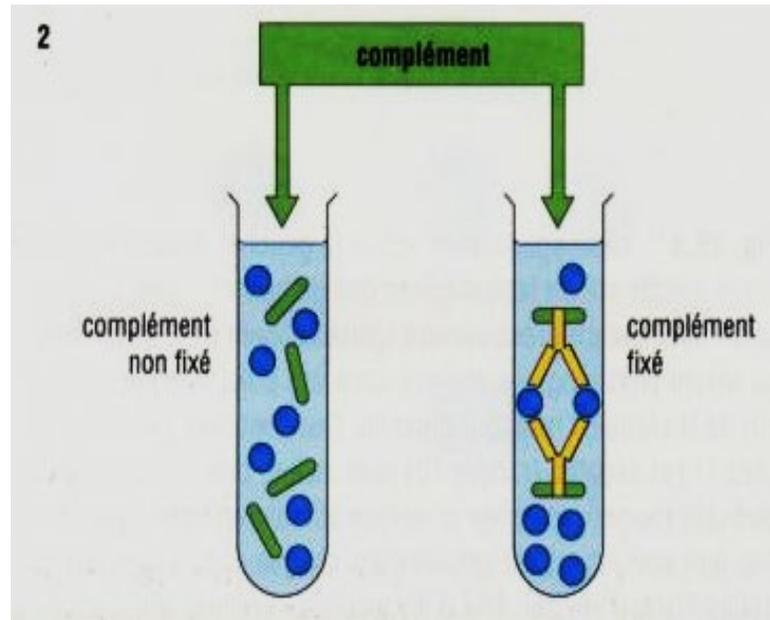
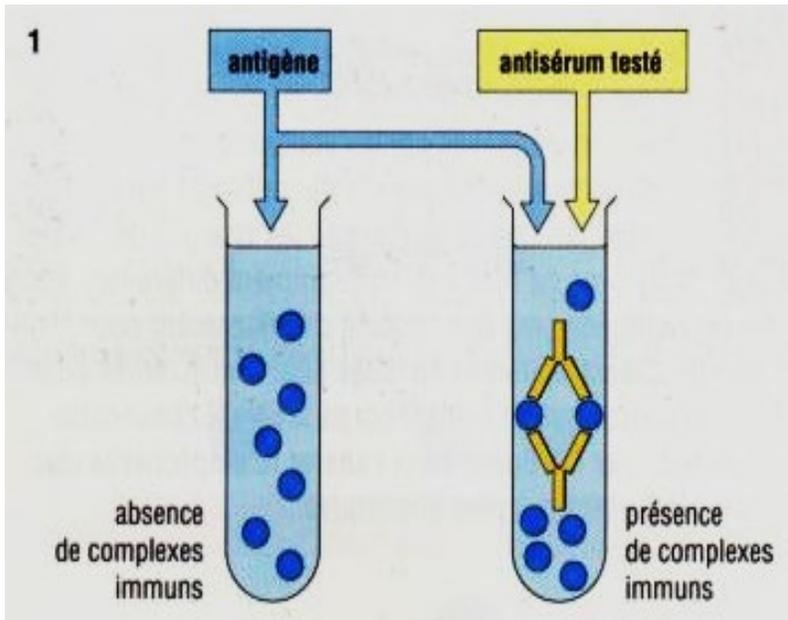
Réactions sérologiques

Fixation du complément

- ✓ La RFC est une réaction Ag-Ac avec la participation du Complément (C').
- ✓ Cette réaction peut être utilisée dans le diagnostique direct pour **l'identification d'un microorganisme** et dans le diagnostique sérologique pour la **mise en évidence des anticorps spécifiques**.

Réactions sérologiques

Fixation du complément



Réactions sérologiques

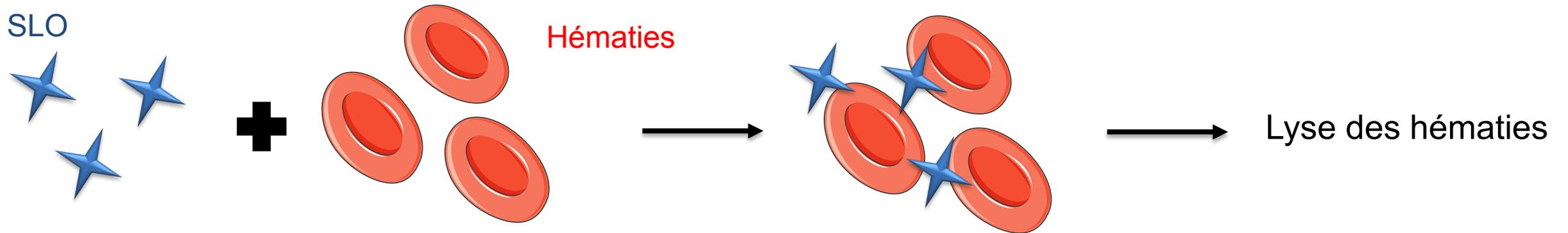
Neutralisation

- ✓ **Ag** : enzyme (SLO), hémagglutinine virale (rubéole, grippe,...).
- ✓ **Ac** : neutralisant, IgA ou autres, protecteur.
- ✓ **Sensibilité** : ~ 1mg/l.
- ✓ **Détection et titrage d'Ac anti Streptolysine O (ASLO).**

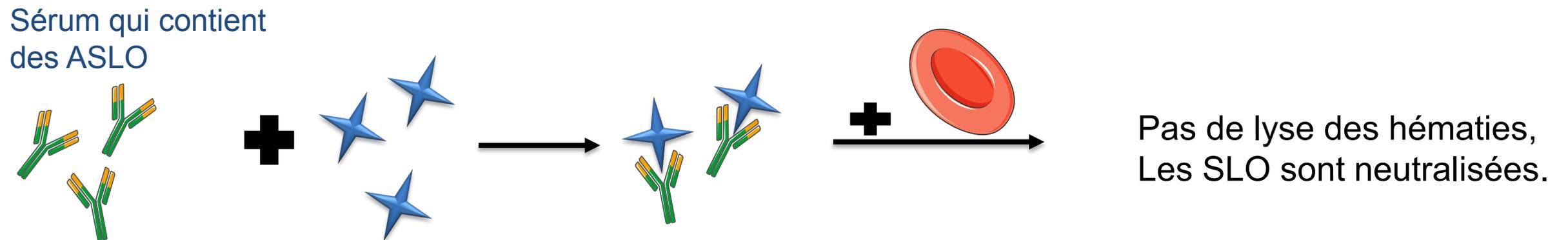
Réactions sérologiques

Neutralisation

✓ Action de l'SLO sur les hématies



✓ Détection des ASLO par neutralisation



Réactions sérologiques

Immunomarquage

Immunofluorescence

Immunoenzymologie

Radio-immunologie

1. Ag ou Ac marqué avec
2. Lecture au microscope
cytomètre en flux
3. Moins de 2 heures
4. Très sensible (mg/mL - pg/mL)

1. Ag ou Ac marqué par une enzyme
2. Lecture au spectrophotomètre
3. Moins d'une heure à plusieurs heures
4. Très sensible (pg/mL)

Avec radio-isotopes (^{125}I)

Réactions sérologiques

Immunofluorescence

✓ L'immunofluorescence permet de **décélérer une réaction Ag /Ac** sur des cellules en suspension, des frottis cellulaires, des microorganismes ou des coupes d'organe.

✓ **Fluorochromes**

* **FITC** : dérivé de la fluorescéine (émission = 520 nm, couleur verte).

* **Rhodamine** et ses dérivés, utilisé en général pour le double marquage, donne une fluorescence rouge-orangée.

Réactions sérologiques

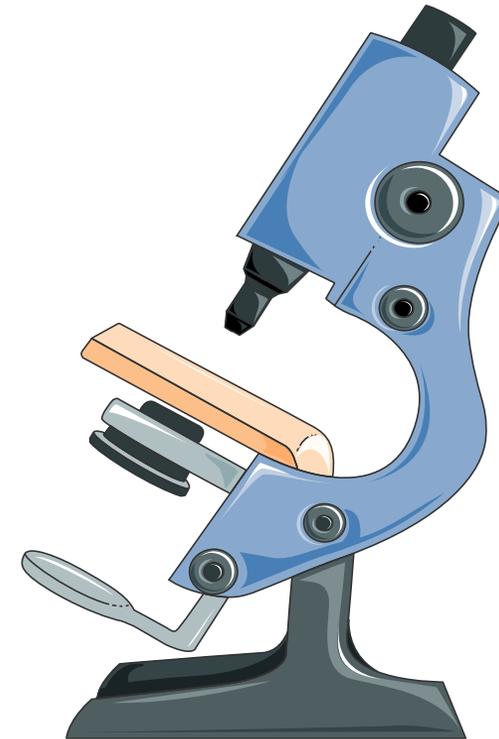
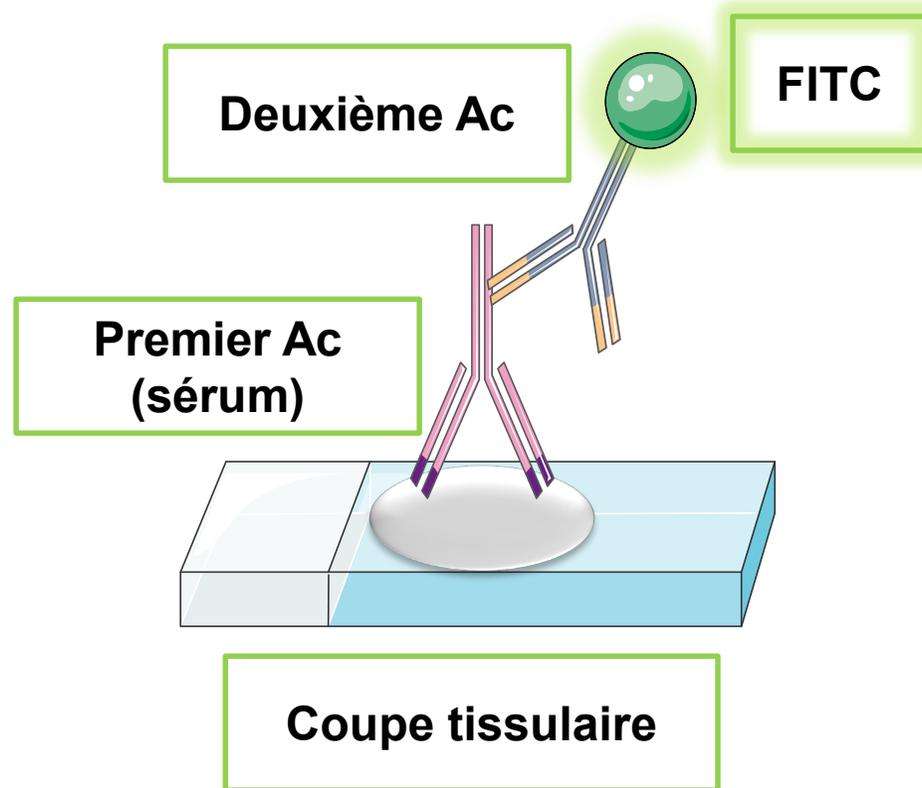
Immunofluorescence

Applications

- ✓ **Auto-immunité** : détection des Ac antinucléaire, anti-organites ou Ac spécifiques d'organe.
- ✓ **Microbiologie** : bactériologie, virologie (cinétique de multiplication de virus, détection de virus responsable d'infection respiratoire)...

Réactions sérologiques

Immunofluorescence indirecte



Microscope à fluorescence

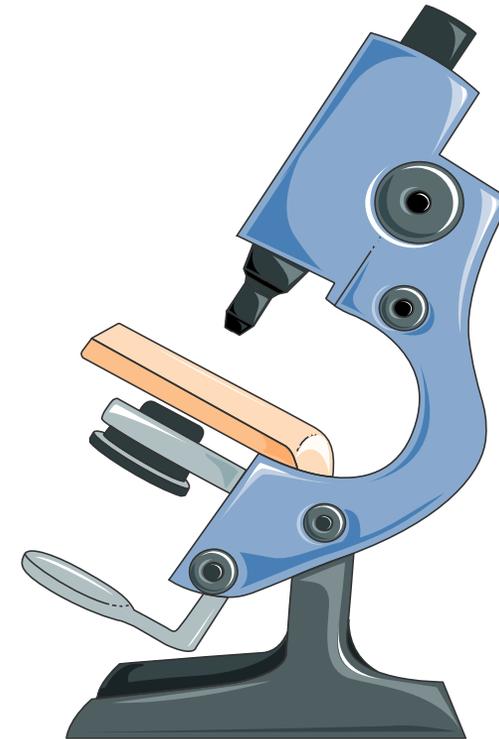
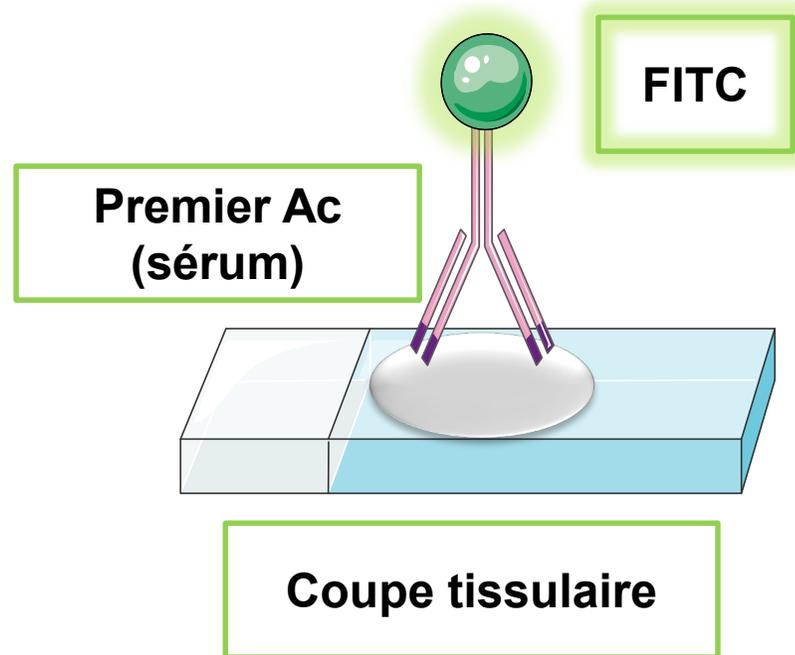
Réactions sérologiques

Immunofluorescence directe

- ✓ **Moins sensible**
- ✓ **Méthode en un temps** , l'Ag est recherché **directement** par l'Ac spécifique marqué.
 - **Recherche des dépôts d'Ig ou de complément dans les tissus.**

Réactions sérologiques

Immunofluorescence directe



Microscope à fluorescence

Réactions sérologiques

Immuno-enzymologie

- ✓ **ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**
- ✓ **Très grande sensibilité.**

Réactions sérologiques

Immuno-enzymologie : principe

- ✓ Elles reposent sur l'utilisation d'une **enzyme** pour déceler les complexes immuns.
- ✓ Les techniques ELISA sont très utilisées en :
 - * **Recherche fondamentale et appliquée** (reconnaissance des épitopes protéiques).
 - * **Analyse médicale**, pour le dosage de nombreuses substances (Ag, Ac, hormones, marqueurs tumoraux, médicaments...).

Réactions sérologiques

Immuno-enzymologie

✓ **Systèmes biologiques**

* **Ag : liquide biologique, une préparation brute ou purifiée de l'Ag.**

* **Ac : immunosérum total, des Ig purifiées ou des Acn.**

✓ **Phase solide et fixation**

Par adsorption passive sur du verre, du plastique, du polystyrène, latex... sous forme de billes, de microplaques,...

Par liaison covalente entre l'Ag ou l'Ac à la phase solide appropriée (cellulose activée, agarose ou acrylamide par le glutaraldéhyde).

Réactions sérologiques

Immuno-enzymologie

Voir vidéos

- ✓ **ELISA directe.**
- ✓ **ELISA indirecte.**
- ✓ **ELISA sandwich.**
- ✓ **ELISA par compétition.**

Réactions sérologiques

Immuno-enzymologie: ELISA par compétition

✓ **Vis à vis d'Ac présents en quantité limitée, et fixés sur un support, il y a compétition entre l'Ag à doser et l'Ag marqué (de même spécificité) ajouté en quantité définie dans le même temps.**

Réactions sérologiques

Immuno-enzymologie: ELISA par compétition

- ✓ **Dosage des protéines : drogues, hormones, médicaments, enzymes, les facteurs rhumatoïdes, vitamines, IgE...**
- ✓ **Diagnostic sérologique : parasitaire, bactériologique par titrage d'anticorps (Brucella, Salmonelle, Treponema...), virologique (HIV, rubéole, hépatite A-B, varicelle, herpés, grippe...)**
- ✓ **Maladies auto-immunes : recherche et dosage des Ac anti-ADN, anti-histones,...**

Western Blot

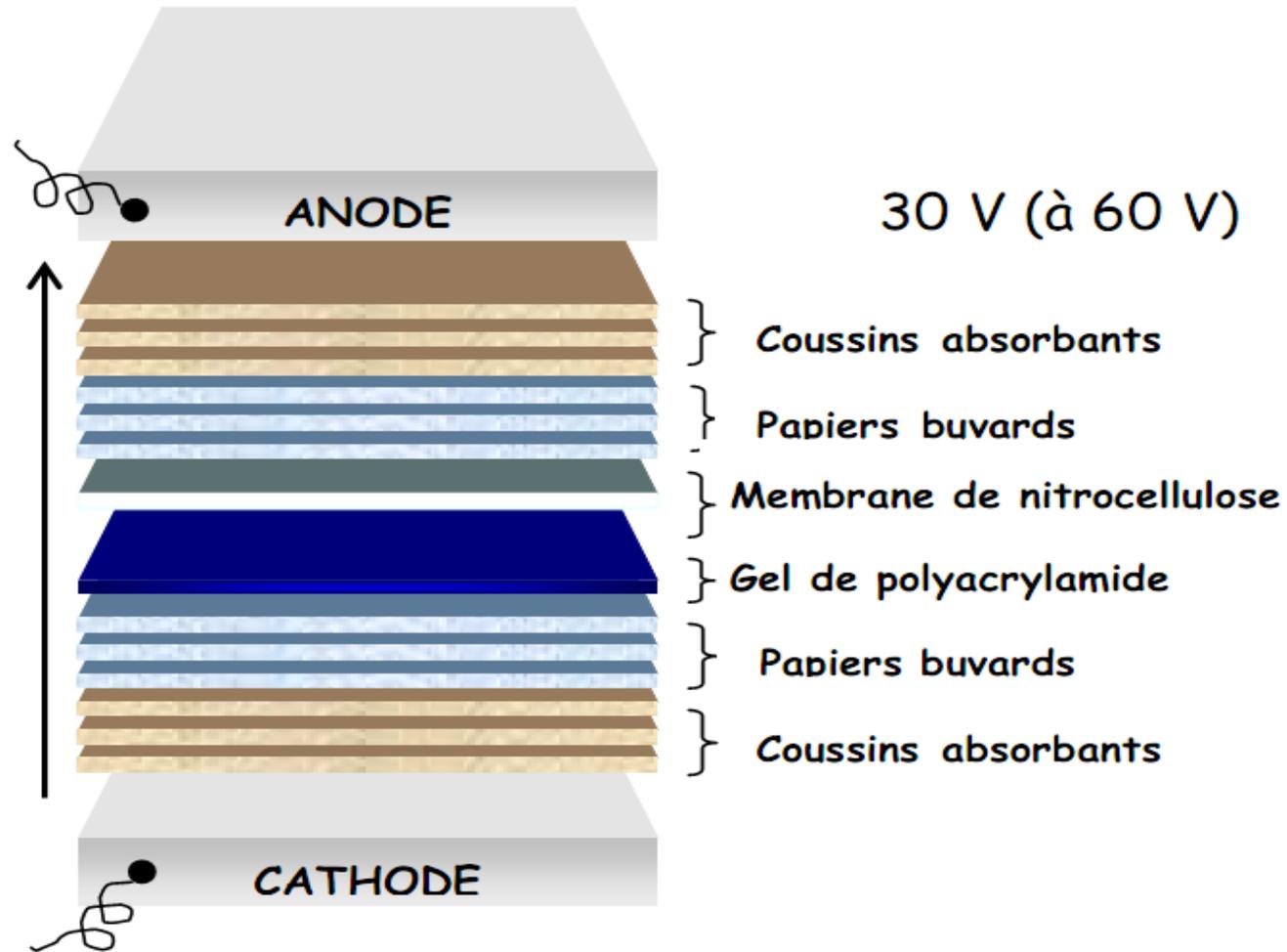
- ✓ Appelé également immuno-empreinte ou immuno-transfert, immunoblot .
- ✓ Cette technique combine le pouvoir de séparation de l'**électrophorèse** et la grande sensibilité de l'**immunodétection**, ce qui en fait un outil performant pour l'identification d'un Ag ou d'un Ac.

✓ Etapes:

* SDS-PAGE

Western Blot

✓ Transfert des protéine sur membrane



Western Blot

✓ Blocage

- ✓ Le blocage des **sites d'interactions non spécifiques** entre la membrane et les anticorps est réalisé en plongeant la membrane dans une solution diluée de protéines pendant une heure à température ambiante.
- ✓ Les protéines dans la solution diluée se lient à la membrane dans tous les sites non-occupés par la protéine-cible.
- ✓ IL donne des résultats plus clairs et élimine les faux positifs.

Western Blot

✓ **Détection**

✓ **Au cours de la détection, la membrane est « sondée » pour la protéine d'intérêt avec des anticorps, liés ensuite à une enzyme émettant un signal.**

- ✓ **par colorimétrie**
- ✓ **par chimiluminescence (la plus sensible)**
- ✓ **par autoradiographie**
- ✓ **par fluorescence**

Western Blot

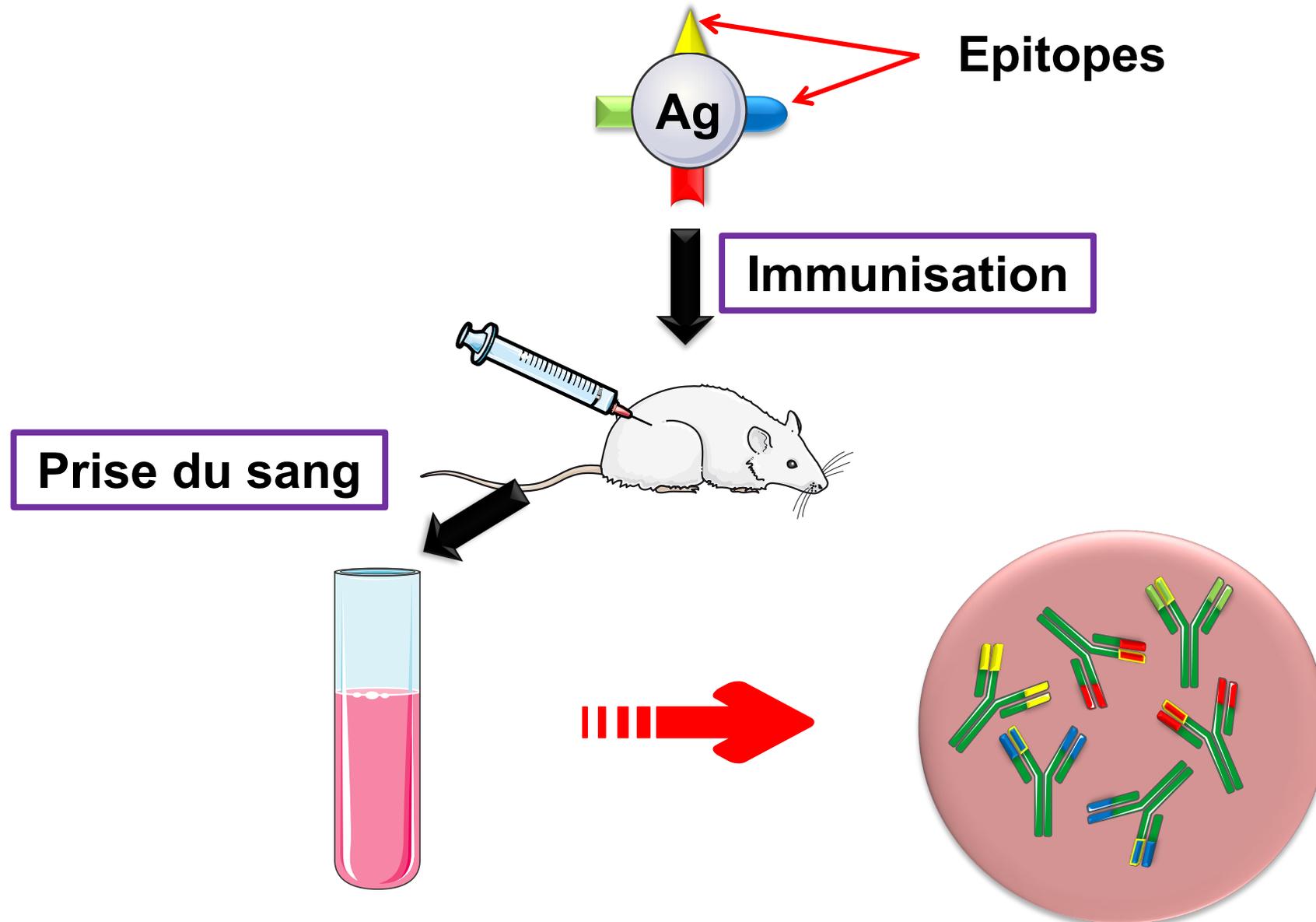
✓ **Application médicale**

- ✓ **Les tests VIH de confirmation emploient la méthode du transfert de western afin de détecter un anticorps anti-HIV dans un échantillon de sérum.**
- ✓ **Le transfert de western est également utilisé pour le test de confirmation de l'ESB (dite 'maladie de la vache folle').**
- ✓ **la détection de la maladie de lyme.**

Production des Ac polyclonaux

- ✓ Les Ac produits en réponse à un Ag typique sont **hétérogènes**, de vue qu'ils sont produits par **différentes clones de plasmocytes** appelées **polyclonaux**.
- ✓ Les Ag sont multivalents contenant plusieurs déterminant antigéniques appelées **épitopes**.
- ✓ Ces épitopes induisent l'organisme à produire des Ac par différentes plasmocytes d'où les Ac produits en réponse à un Ag sont appelé **Ac polyclonaux**.

Production des Ac polyclonaux



Production des Ac polyclonaux

Préparation de l'Ag

Injection d'Ag

Voir vidéos

Prélèvement du sang

Production des Ac monoclonaux

- ✓ La Ac m sont des anticorps qui provient d'une **seule clone** de plasmocyte.
- ✓ Par conséquence, ils sont **hautement spécifiques** à un **seul épitope**.
- ✓ Ils sont utilisés dans les **diagnostic microbiologiques** et dans la **thérapie du cancer**.

Production des Ac monoclonaux

Hybridation cellulaire

- ✓ Elle consiste à **fusionner** des **cellules productrices d'Ac** et des **cellules d'une lignée myéломateuse**.
- ✓ Cette fusion conduit à la production de cellules Hybrides ou **hybridomes**.
- ✓ Voir vidéos