

TD N°2 : PRINCIPAUX TESTS IMMUNOLOGIQUES

I/ Les bases moléculaires de l'interaction anticorps-antigène (Ac-Ag)

Les caractéristiques physiques des réactions antigène-anticorps sont très importantes à connaître pour le développement de techniques qui les utilisent car elles conditionnent de nombreux paramètres de l'expérimentation souhaitée.

La zone d'interaction entre l'anticorps et l'antigène se limite au **paratope** de l'anticorps et l'**épitope** de l'antigène (figure 1). Cette association nécessite une bonne **complémentarité stérique** entre les deux sites réactifs. Les épitopes et paratopes engagent des **interactions non covalentes**, et **réversibles**, de type liaisons de van der Waals, liaisons hydrophiles/hydrophobes, liaisons électrostatiques et liaisons hydrogène.

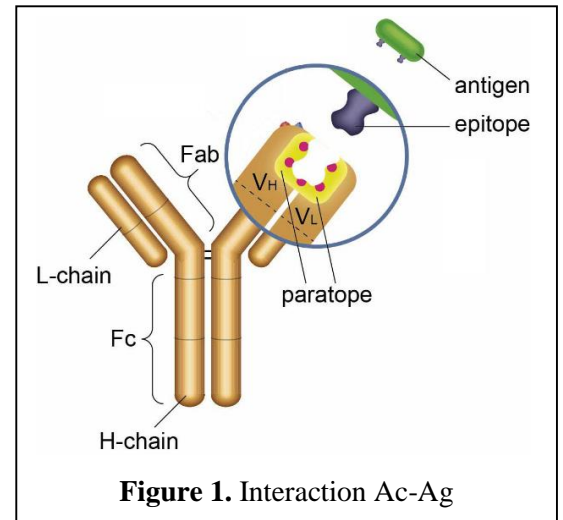


Figure 1. Interaction Ac-Ag

- **Notion d'affinité** : l'affinité est définie comme la somme des forces d'interaction entre un épitope et un paratope.

L'affinité de l'anticorps est évaluée par une constante d'affinité (K_a) qui s'exprime en L/mol. Ainsi, un anticorps de faible affinité possède une constante proche de 10^{-4} L/mol et un anticorps de haute affinité, une K_a proche de 10^{-12} L/mol.

- **Notion d'avidité** : L'avidité est la force globale de liaison d'un anticorps entier (avec deux paratopes au minimum) et un antigène polyvalent (contenant plusieurs épitopes).

L'avidité conditionne la rapidité de formation d'un complexe antigène-anticorps. Elle dépend de l'affinité intrinsèque, de la valence de l'anticorps et de l'antigène, de conditions physicochimiques : température, pH, force ionique.

- Spécificité et réactions croisées :

- La spécificité fait référence à la capacité d'un site anticorps donné à réagir avec un seul déterminant antigénique ou encore à la capacité d'une population d'anticorps polyclonaux à réagir avec un seul antigène.

La spécificité représente la capacité d'un anticorps à discriminer deux déterminants antigéniques semblables en se liant à eux avec une affinité différente.

La spécificité Ac-Ag n'est pas absolue, il peut y avoir **des réactions croisées**. Ainsi, un anticorps spécifique pour un antigène donné (Ag1) peut réagir avec d'autres antigènes apparentés qui portent des épitopes identiques (Ag2) ou similaires (Ag3) à ceux présents sur l'antigène original (Figure 2).

Antigène original	Un épitope identique	Un épitope similaire	Aucune similarité
	Réaction croisée		Pas de réaction

Figure 2. Spécificité et réactions croisées

II/ Les principaux tests en immunologie

Les interactions Ac-Ag sont exploitées pour la détection/dosage des antigènes et des anticorps. Voici quelques applications des interactions Ac-Ag :

- Diagnostic des maladies infectieuses** (bactéries, virus, parasites, champignons)
 - diagnostic indirect : recherche d'anticorps spécifiques dans un sérum
 - diagnostic direct : recherche de l'agent infectieux dans différents liquides biologiques ou sur des biopsies.
- Diagnostic de pathologies affectant le système immunitaire** : déficit immunitaire, maladie auto-immunes (ex : polyarthrite rhumatoïde), hypersensibilité (allergie), syndromes prolifératifs (ex : lymphomes)
- Dosage quantitatif de molécules** Hormones, vitamines, protéines inflammatoires, médicaments etc.

Lors de la réaction Ac-Ag, deux cas peuvent se présenter : 1- Techniques sans marquage
2- Techniques avec marquage

1) Techniques sans marquage

Dans ces techniques, la détection du complexe immunitaire (complexe Ac-Ag) ne nécessite pas un marqueur.

1.1) Les techniques de précipitation

Quand une solution d'antigène moléculaire soluble est ajoutée progressivement à un antisérum contenant des anticorps spécifiques à cet antigène, des précipités antigène-anticorps sont formés, pouvant être détectés par différentes techniques de laboratoire. La précipitation se produit lorsque les proportions sont optimales entre les anticorps et les antigènes ; on parle de la zone d'équivalence (Figure 3).

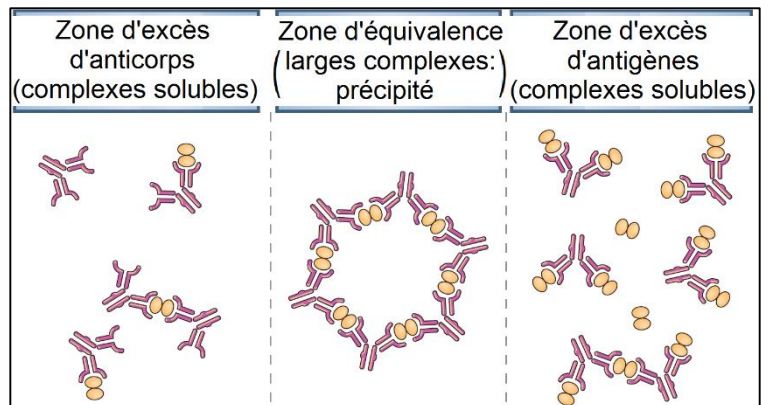


Figure 3. La précipitation prend lieu dans la zone d'équivalence

1.1.1) Précipitation en phase liquide

- Réactions qualitatives : Ring test** : C'est un test qualitatif, on introduit dans un tube des antigènes et des anticorps et on laisse reposer. Ils vont lentement diffuser dans le milieu, créant des complexes et précipitent (Figure 4a).

- Réactions quantitatives : Immunonéphélométrie** : C'est de mesurer de la diffusion de la lumière. Il existe donc une relation entre l'intensité de la lumière mesurée par néphélométrie et la quantité de précipité Ag-Ac.

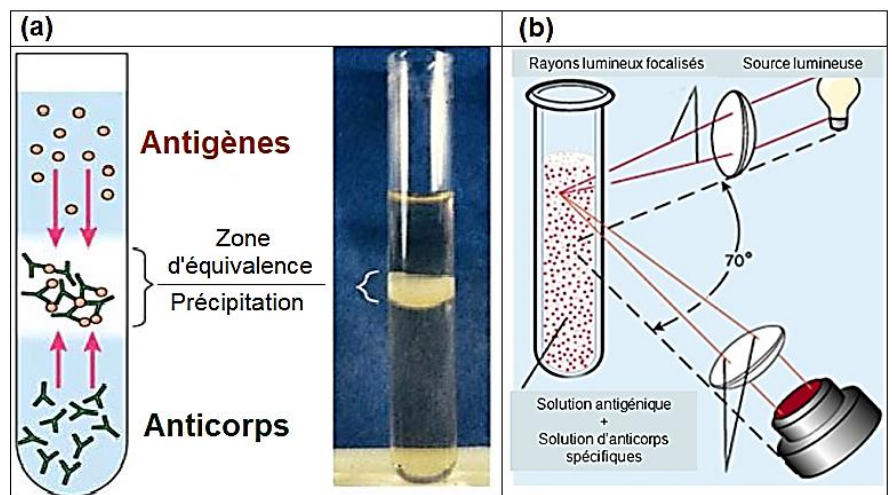


Figure 4. Précipitation en phase liquide (a) Ring test ;
(b) Immunonéphélométrie.

1.1.2) Précipitation en milieu gélifié

Les solutions d'Ag et d'Ac diffusent dans le milieu gélifié. A l'équivalence, une précipitation du complexe Ag-Ac est observée après une étape de coloration du gel.

Les gels utilisés : la Gelose (polyosides d'algue marine), l'agarose ou le gel de polyacrylamide.

a) Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)

Cette méthode consiste à incorporer un antisérum spécifique dans un gel (agarose) et à déposer la solution d'Ag dans des puits. A l'équilibre il se forme un anneau de précipitation dont le carré du diamètre est proportionnel à la concentration de l'Ag. La concentration est exprimée par référence à une courbe standard avec un Ag de concentration connue.

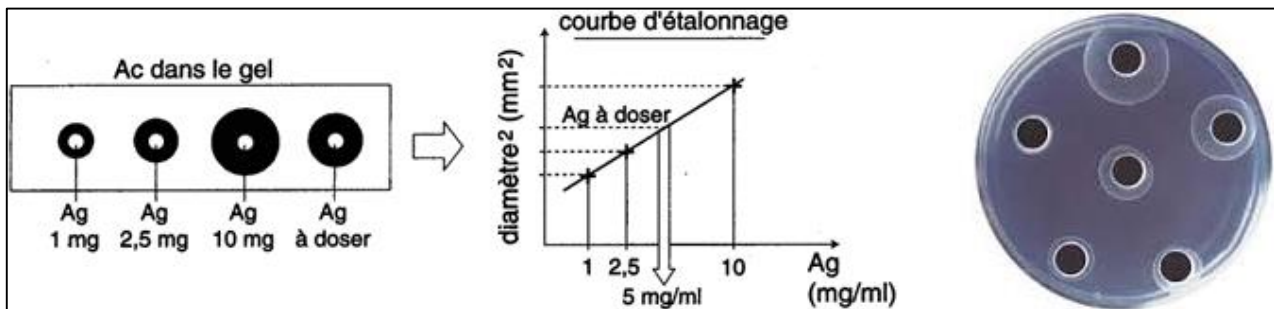


Figure 5. Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)

a) Immunodiffusion double ou réaction d'Ouchterlony

Les solutions d'Ag et d'Ac sont déposées dans des puits percés à distance les uns des autres dans un gel d'agarose. Les molécules diffusent dans le gel en fonction de leur taille et forment des lignes de précipitation pour chaque système d'Ag et d'Ac. Chaque ligne de précipitation correspond à la zone d'équivalence respective, c'est-à-dire à la formation d'un réseau Ag-Ac.

Cette méthode permet l'analyse d'un mélange d'Ag et l'identification de ses constituants. Lorsque deux protéines diffusent dans un gel à la rencontre des Ac, on distingue des réactions d'identité, de non-identité ou d'identité partielle.

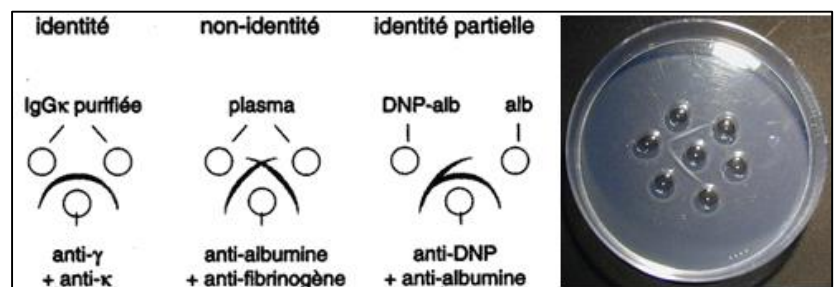


Figure 6. Immunodiffusion double (technique d'Ouchterlony)

b) Electrophorèse en fusée (Technique de Laurell)

L'Ac incorporé dans le gel d'agarose est immobile (grâce au pH du gel), l'Ag chargé négativement migre dans un champ électrique. L'arc de précipitation résultant a la forme d'une fusée dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'Ag.

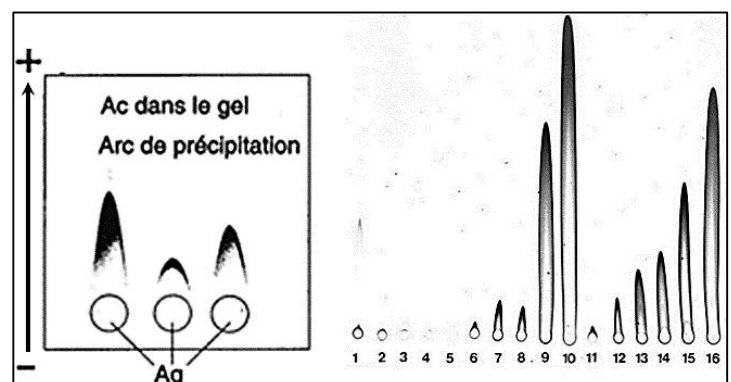


Figure 7. Electro-immunodiffusion (technique de Laurell)

1.2) Les techniques d'agglutination

Dans les réactions d'agglutination, l'antigène est particulaire (micro-organismes, globules rouges, particules de latex sur lesquelles l'antigène est fixé...etc.). Quand ces cellules ou particules se mélangent à l'antisérum spécifique elles forment des grappes qui s'agrègent pour former des structures grosses et visibles (Figure 8a).

Le terme d'agglutinine est utilisé pour décrire les anticorps qui agglutinent les antigènes particuliers. Quand l'antigène est un érythrocyte, on utilise le terme d'hémagglutination. Tous les anticorps peuvent théoriquement agglutiner des antigènes particuliers mais les IgM, en raison de leur valence élevée, sont de particulièrement bonnes agglutinines (10 à 100 fois plus que les IgG) et on conclue souvent que l'anticorps est de classe IgM lorsque de fortes agglutinations sont détectées.

L'agglutination est utilisée pour la détermination des groupes sanguins (Figure 8b), pour le sérodiagnostic d'affections microbiennes (par exemple, réaction de Widal pour le diagnostic de la typhoïde), etc.

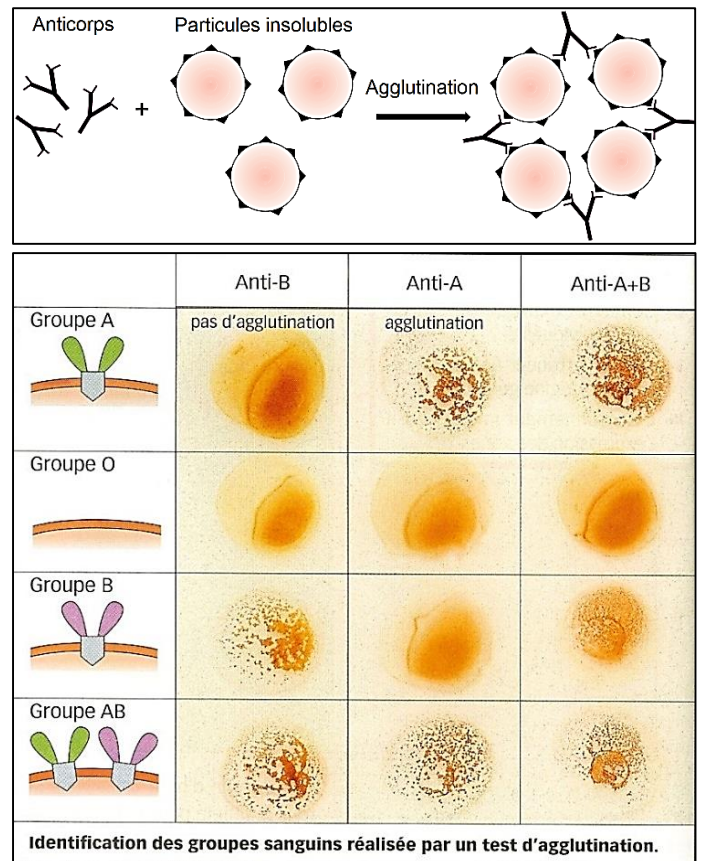


Figure 8. (a) La réaction d'agglutination ; **(b)** détermination des groupe sanguins.

1.3) Les techniques utilisant le complément

Ces techniques sont basées sur le fait que les complexes Ac-Ag sont capables d'activer donc « consommer » les protéines du complément. Elles sont utilisées pour la détection d'anticorps dans le sérum de patients. Après inactivation thermique du complément dans le sérum du patient, on lui ajoute du complément et l'antigène spécifique à l'anticorps recherché. Si cet anticorps est présent dans le sérum, le complément sera fixé et consommé. On ajoute ensuite des érythrocytes couverts d'anticorps (le système indicateur). L'absence d'une hémolyse (dépendante du complément) du système indicateur indique la consommation du complément et correspond à un test positif. En cas de test négatif, le complément ajouté est disponible pour lyser des érythrocytes du système indicateur.

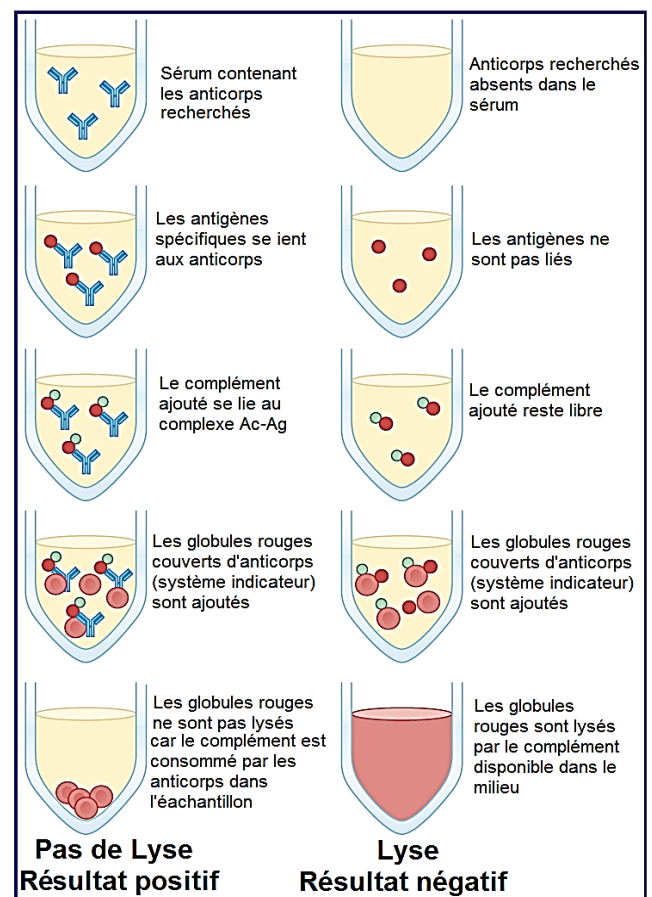
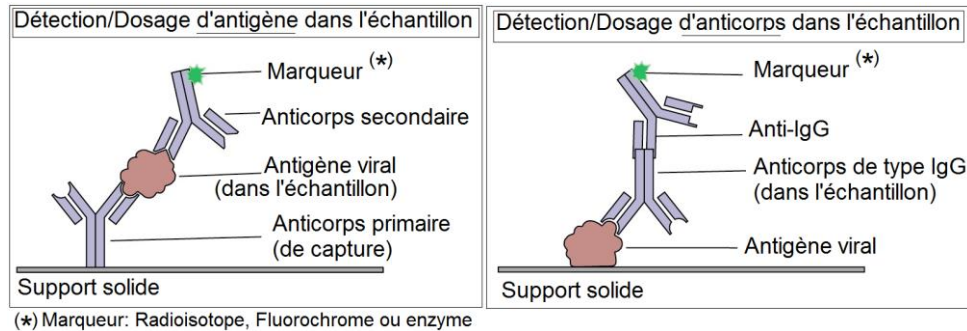


Figure 8. Technique de fixation du complément.

1.4) Techniques avec marquage

Dans ces techniques immunochimiques (d'immunomarquage), la détection du complexe immunitaire (Ac-Ag) nécessite un marquage par un élément marqueur (traceur). L'Ag, ou le plus souvent l'Ac, est marqué, c'est-à-dire qu'il est couplé à un isotope (ex : ^{125}I , on parle alors de techniques radio-immunologiques ou RIA), à un composé fluorescent (techniques d'immunofluorescence) ou à une enzyme (techniques immunoenzymatiques). La détection se fait au compteur à scintillation (RIA), au microscope/spectroscope à fluorescence (immunofluorescence) ou en microscopie optique/spectrophotomètre (techniques immunoenzymatiques).



Les techniques immunoenzymatiques sont les plus fréquemment utilisées, elles sont plus simples et moins coûteuses que les autres techniques immunochimiques. La technique la plus populaire de ce groupe est ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Le marqueur est une enzyme (peroxydase du raifort, phosphatase alcaline...), qui transforme un substrat incolore (un chromogène) en un produit coloré détectable par spectroscopie visible. Ci-dessous sont présentées les différentes variantes de la technique ELISA.

