

TD N°4 :

PRINCIPAUX TESTS IMMUNOLOGIQUES

1. Nature de la liaison anticorps-antigène :

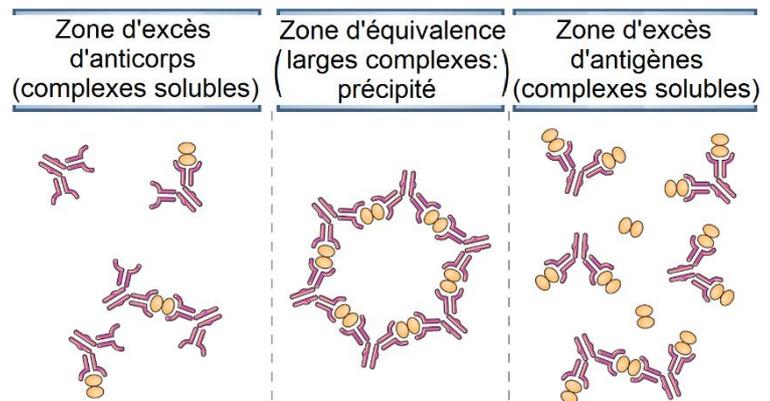
- La réaction antigène - anticorps (Ag-Ac) est due à l'interaction entre les épitopes de l'antigène et les paratopes de l'anticorps. Elle fait intervenir quatre types de liaisons non covalentes (des liaisons hydrogènes, des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrophobes et les forces de Van der Waals).
- L'**affinité** des anticorps est la force d'interaction entre un déterminant antigénique unique (un épitope) et un seul site de liaison de l'anticorps (un paratope).
- L'**avidité** correspond à la force globale de la liaison d'un antigène possédant des déterminants antigéniques multiples avec des anticorps polyvalents. L'avidité est influencée à la fois par la valence de l'anticorps et la valence de l'antigène.
- 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 réaction Ag-Ac *in vitro* a deux grands types d'applications :

- La détection et le dosage des antigènes ;
- La détection et le titrage des anticorps.

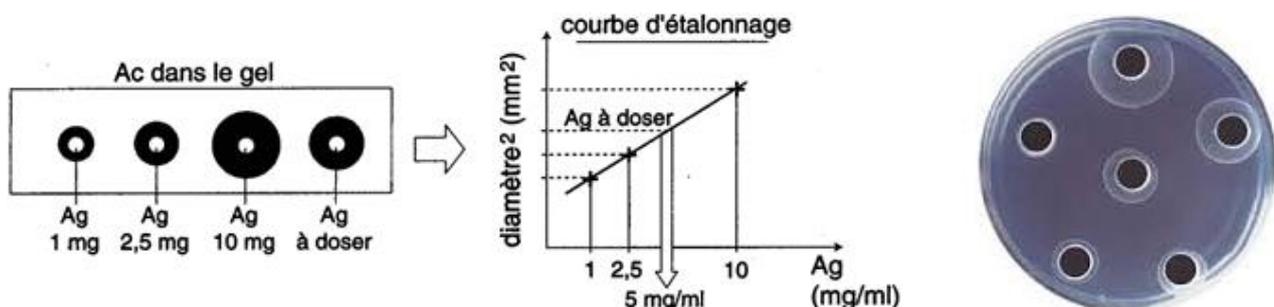
2. Les réactions de précipitation

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.



2.1. Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)

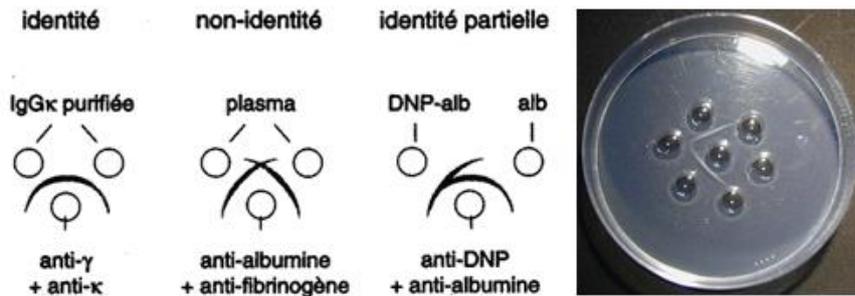
Cette méthode consiste à incorporer un antisérum spécifique dans un gel (agarose) et à déposer la solution d'Ag dans des puits. A l'équilibre il se forme un anneau de précipitation dont le carré du diamètre est proportionnel à la concentration de l'Ag. La concentration est exprimée par référence à une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



2.2. Immunodiffusion double ou réaction d'Ouchterlony

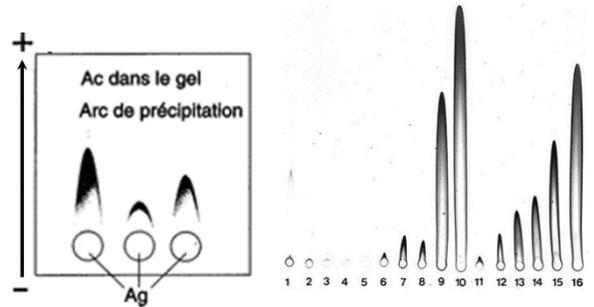
Les solutions d'Ag et d'Ac sont déposées dans des puits percés à distance les uns des autres dans un gel d'agarose. Les molécules diffusent dans le gel en fonction de leur taille et forment des lignes de précipitation pour chaque système d'Ag et d'Ac. Chaque ligne de précipitation correspond à la zone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



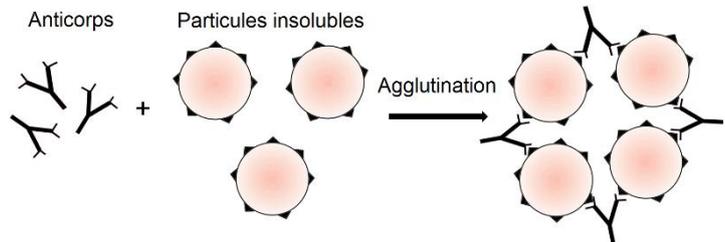
2.3. Electrophorèse en fusée (rocket electrophoresis)

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.



3. Réactions 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.



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 et on conclue souvent que l'anticorps est de classe IgM lorsque de fortes agglutinations sont détectées.

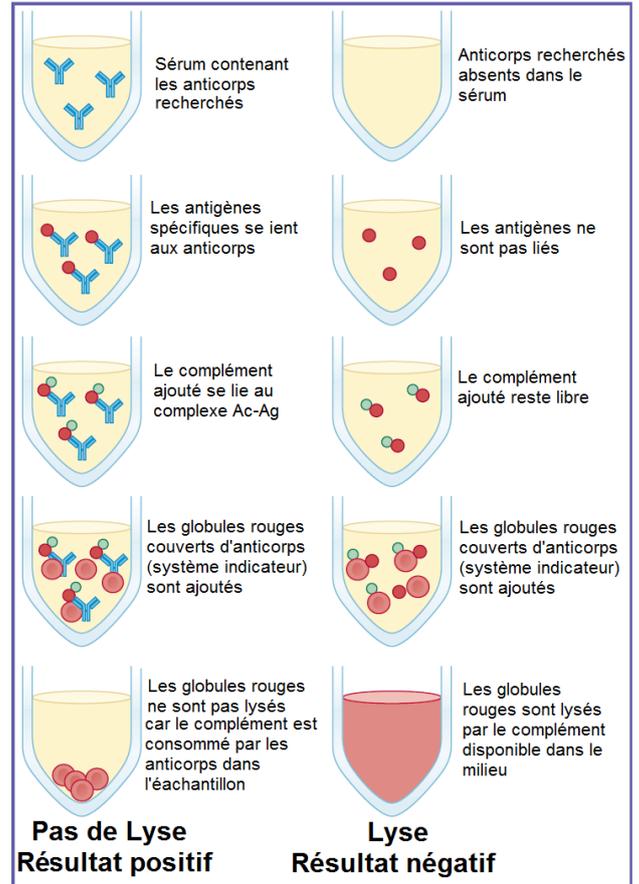
	Anti-B	Anti-A	Anti-A+B
Groupe A 	pas d'agglutination	agglutination	agglutination
Groupe O 	pas d'agglutination	pas d'agglutination	pas d'agglutination
Groupe B 	agglutination	pas d'agglutination	agglutination
Groupe AB 	agglutination	agglutination	agglutination

Identification des groupes sanguins réalisée par un test d'agglutination.

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

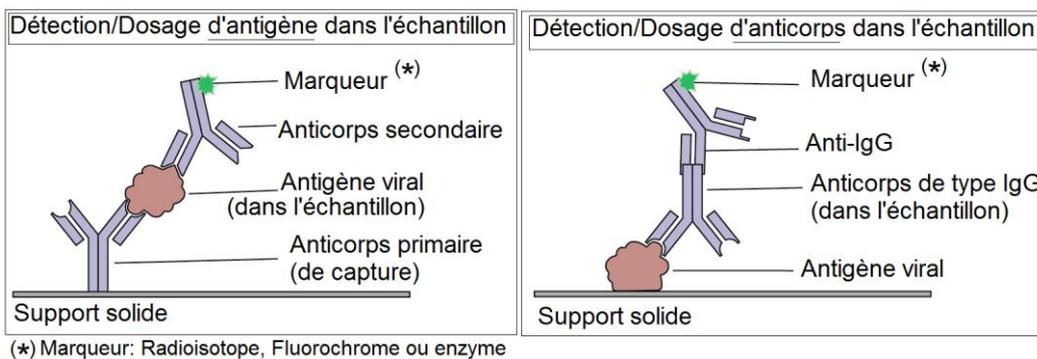
4. Les techniques de fixation du complément

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.



5. Techniques d'immunochimiques

Dans les techniques immunochimiques (d'immunomarquage), l'Ag, ou le plus souvent l'Ac, est marqué, c'est-à-dire qu'il est couplé à un isotope (ex : ¹²⁵I, 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/spectroscop 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.

