

Introduction

- On regroupe sous le terme de méthodes immunochimiques toutes les méthodes basées sur la mise en évidence du **complexe** qui se forme lors de la réaction **Ag avec son Ac** spécifique.
- Ces techniques sont utilisées pour **détecter** (analyse qualitative) et **quantifier** (analyse quantitative), soit les Ag, soit les Ac.
- Leurs applications sont nombreuses et ont été étendues à nombreuses autres disciplines.

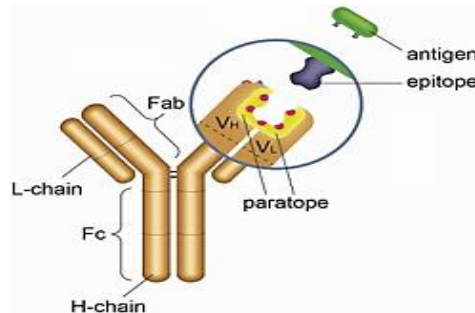
1. Bases moléculaires de la réaction Antigène-Anticorps

Les épitopes et paratopes engagent des **interactions non covalentes**, **réversibles** et **complémentarité stérique**

Ces liaisons sont de type **liaisons de van der Waals**, liaisons **hydrophiles/hydrophobes**, liaisons **électrostatiques** et liaisons **hydrogène**

Ces interactions dépendent de :

- ✓ PH
- ✓ Concentration saline
- ✓ Température



- **Ag** : **antigénicité** (se lie à l'Ac) + **immunogénicité** (provoque une réaction immunitaire)
- **Ac** : molécule **protéique** + **spécifique** de l'Ag

Généralités sur la réaction antigène-Anticorps

1. Bases moléculaires de la réaction Antigène-Anticorps

1- Antigène univalent (1 épitope) et uni-déterminé (1 seule forme) : Possède un seul épitope à la surface qui est capable de se lier à un anticorps. Ex : Les haptènes	
2- Antigène multivalent (plusieurs épitopes) et uni-déterminé (1 seule forme) : Possède au moins deux épitopes du même type sur une molécule d'antigène.	
3- Antigène univalent (1 épitope de chaque forme) et multi-déterminé (plusieurs formes) : Présente plusieurs épitopes de différents types, mais seulement un de chaque type sur une molécule d'antigène.	
4- Antigène multivalent (plusieurs épitopes) et multi-déterminé (plusieurs formes) : Présente plusieurs épitopes de différents types et plus d'un épitope de chaque type par molécule d'antigène	

2. Caractéristiques de la réaction Antigène-Anticorps

- ✓ Si l'antigène est moléculaire ou **soluble** → les complexes Ag/Ac forment un **précipité**
- ✓ Si l'antigène est **particulaire** ou **cellulaire** (bactéries, hématies, billes de latex ...) → les complexes immuns forment un **agglutinat**

Techniques d'immunoprécipitation

Définition

- Le phénomène de précipitation se produit lorsqu'on met en contact un **antigène soluble** avec l'**anticorps** correspondant.
- Cette réaction se fait soit en milieu **liquide** soit en milieu **gélifié**

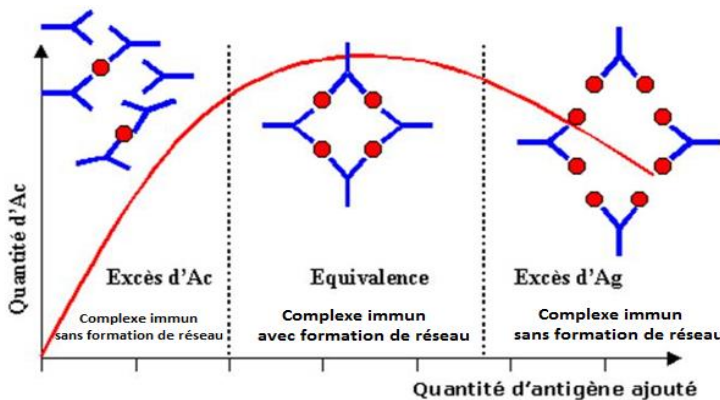
Réactions d'immuno- précipitation se déroulent en **3 étapes** :

1. **Liaison de l'Ac** au déterminant antigéniques
2. **Formation d'un réseau** par réarrangement des sites de liaison
3. **Agrégation des réseaux** et formation de précipité visible à l'œil nu

Caractéristiques de l'immuno-précipitation :

- ✓ Ag : **soluble**
- ✓ Ac : **Ac polyclonaux** = provenant de différents clones de LB
- ✓ **Réseaux tridimensionnel** (zone d'équivalence)
- ✓ Lecture : - œil nu - turbidimétrie, néphélémétrie

Courbe de précipitation



On prend un sérum avec une quantité fixe d'Ac et on rajoute des Ag, on aura 3 phases :

1-Phase d'excès d'Ac : pas de précipité à l'œil nu

2-Zone d'équivalence : formation d'un réseau, car la quantité $Ag = Ac$ et le précipité est visible à l'œil nu

C'est le point où la courbe atteint son maximum. Il correspond à la formation d'un réseau Ag-Ac

3-Phase d'excès d'Ag : réseau anarchique et la précipitation est rompu

1. Précipitation en milieu liquide

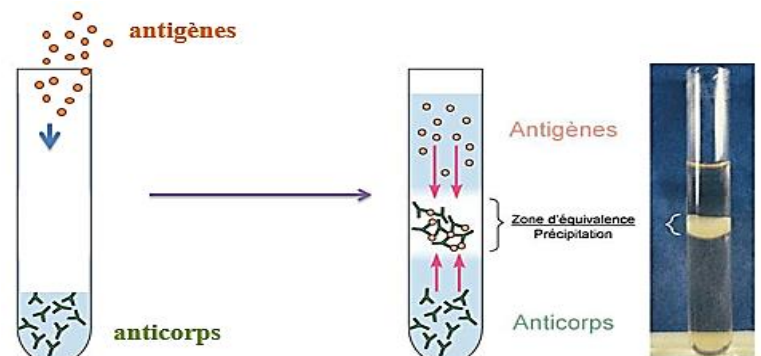
1. Test de l'anneau (Ring test) : C'est un test **qualitatif**

On introduit dans un tube des **Ag** et des **Ac** et on laisse reposer. Ils vont lentement diffuser dans le milieu, créant des **gradients de concentration**

Lorsqu'ils sont à **l'équivalence**, c'est-à-dire qu'il y a autant de paratope que d'épitopes, ils forment des complexes et **précipitent**

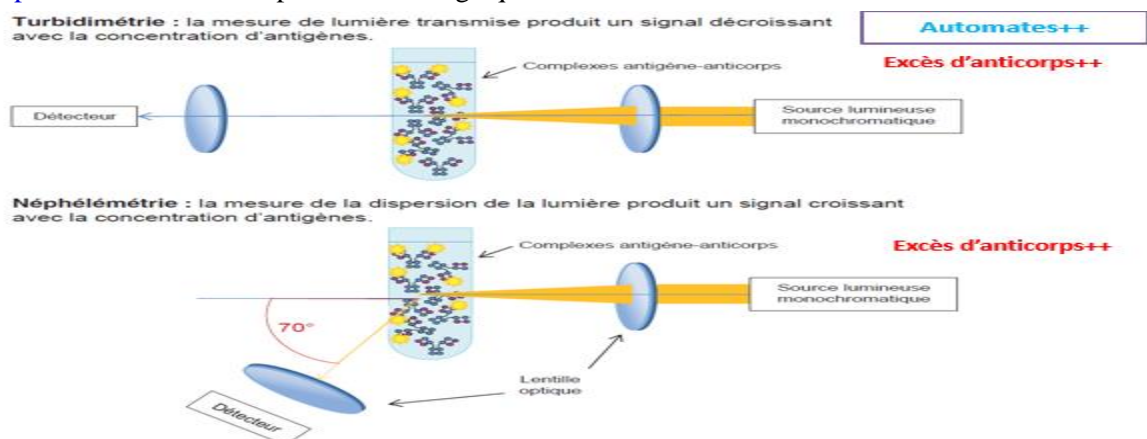
Applications :

- ✓ Suivi d'une hyperimmunisation
- ✓ Les fraudes alimentaires



2. Technique de néphélémétrie et de turbidimétrie : C'est un test **quantitatif**

- On introduit une solution d'Ag, puis on rajoute un sérum d'Ac
- Un **rayon laser** traverse le tube contenant d'éventuels précipités Ac/Ag
- La **diffraction** de la lumière par les **précipités Ac/Ag** (nephelos = nuage) est mesurée à la sortie
- Plus il y a de précipité, plus il y aura de signal sur le photomultiplicateur (appareil qui mesure la diffraction)
- **Mesure rapide et automatisée** et permet un dosage quantitatif



La turbidimétrie et la néphélométrie ont le même principe mais ils diffèrent dans la mesure :

- ✓ **Turbidimétrie** : mesure du **rayonnement absorbé** : l'intensité du rayon diminue après passage par le tube selon la concentration d'Ag et d'Ac
- ✓ **Néphélométrie** : mesure du **rayonnement diffusé** (plus sensible) : elle mesure l'angle de diffraction et plus cette angle augment, plus la concentration du complexe Ag-Ac augmente.

On obtient la concentration de la molécule à doser à partir d'une gamme d'étalonnage

Applications : dosages des protéines sériques (albumine, haptoglobine, Ig...), urinaires, rachidiennes

2.Précipitation en milieu gélifié

- ✓ Diffusion des réactants dans un milieu gélifié → gradient de concentration
- ✓ A la zone d'équivalence → formation d'un précipité

Nature des gels : extraits d'algues marines : **agar-agar (gélose)** et ses dérivés purifiés (**agarose**)

Caractéristiques des gels :

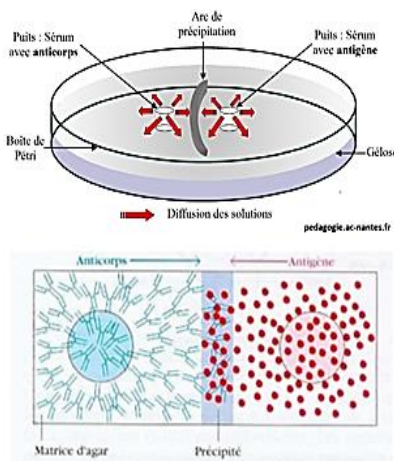
- ✓ **Inertes chimiquement** : ne rentre pas dans la réaction et sert seulement de support
- ✓ **Visqueux à 50°C** ce qui permet d'inclure l'Ag et l'Ac sans qu'ils soient dénaturés
- ✓ **Solides à 37°C**
- ✓ Transparents, permettant l'observation des précipités.

Gel d'agarose- préparation :



Méthodes qualitatives

1-Méthode d'Ouchterlony = Immunodiffusion double : Diffusion **spontanée**, Technique **qualitative**

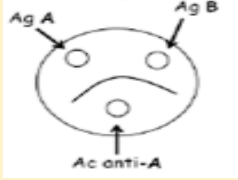
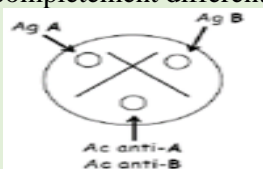
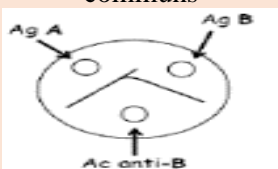


Immunodiffusion double = **diffusion de l'Ag et l'Ac**

Dans une boîte pétrole contenant de la **gélose**, on creuse des **trous** (puits) centraux et périphériques, dans les centraux, on pose les Ac, et dans les périphériques, les Ac (sérum du patient) ou le contraire

Après les Ag et Ac vont diffuser et former des complexes qui apparaissent comme des **lignes blanches** (arcs)

But : Analyse qualitative des solution d'Ag ou d'Ac // **Étude des relations entre différents Ag** :

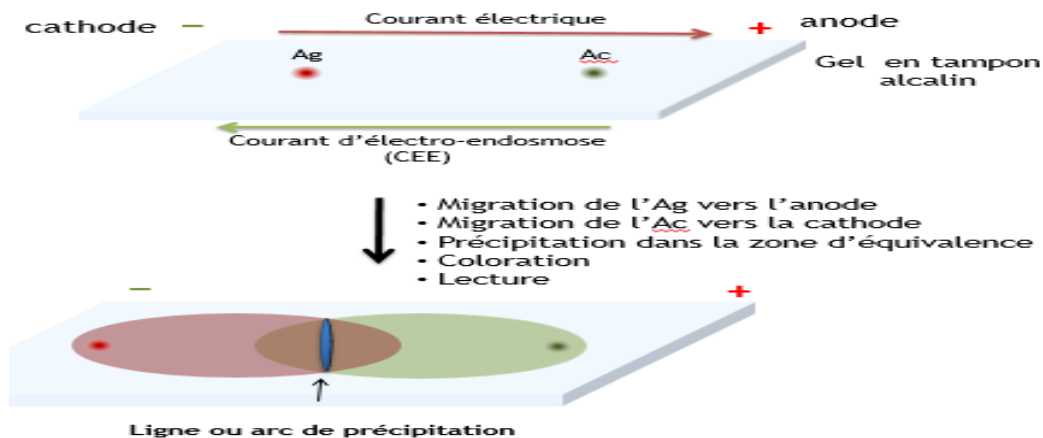
Identité totale	Absence d'identité	Identité partielle
Ag A et Ag B ont les mêmes épitopes 	Ag A et Ag B ont des épitopes complètement différents 	Ag A et Ag B ont des épitopes en communs 

Applications : déterminer la pureté d'une solution antigénique ; préciser les spécificités d'un immunosérum...
Ex : recherche de la protéine de Bence Jonse

2-Contre-immunoélectrophorèse = Electrosynérèse : Diffusion **accélérée**, Technique **qualitative**

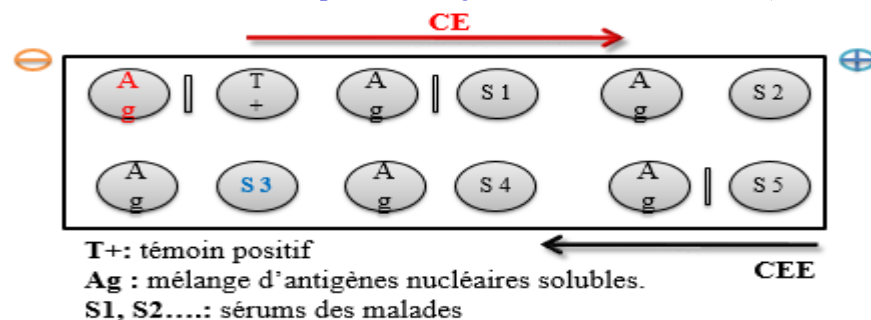
- On utilise un **gel vierge**, on creuse **2 trous** (puits), dans l'un on introduit les **Ag**, dans l'autre les **Ac**
- Les **Ag** et les **Ac** migrent rapidement à la rencontre l'un de l'autre (double diffusion)
- La réaction Ag-Ac conduit à la formation d'une ligne de précipitation à la zone d'équivalence
- La **diffusion de l'Ag et de l'Ac** est accélérée par un **courant électrique** (CE) :
 - ✓ Les **Ac** sont attirés par la **cathode (-)**
 - ✓ Les **Ag** sont attirés par l'**anode (+)**

Support : gel d'agarose à fort courant d'électro-endosmose (EEE)



Applications : - Détection de l'Ag HBs ou de l'Ac anti-HBS

- Recherche d'auto anticorps anti- antigènes nucléaires solubles (SSA, SSB, Sm, RNP...)

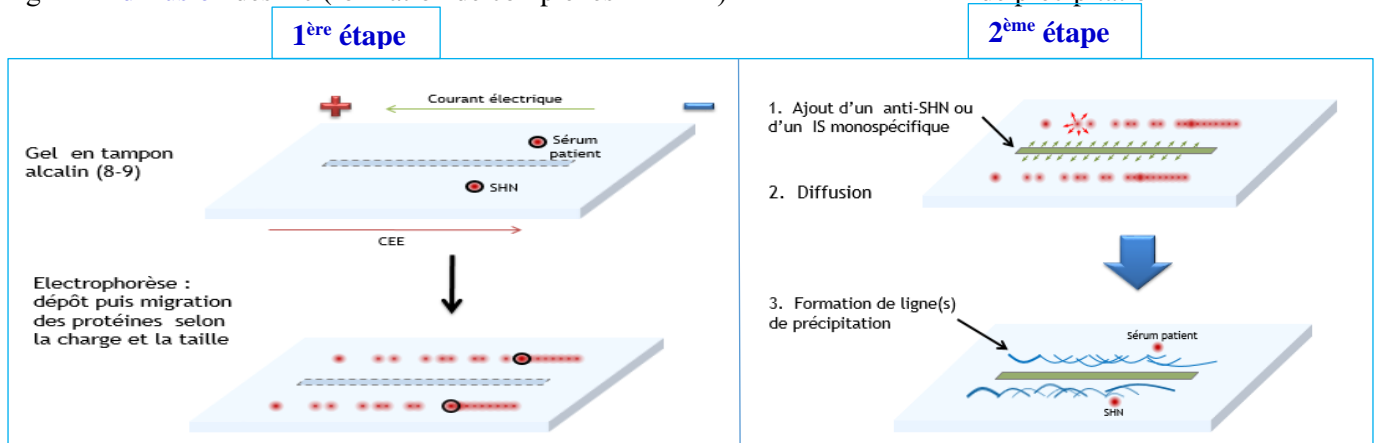


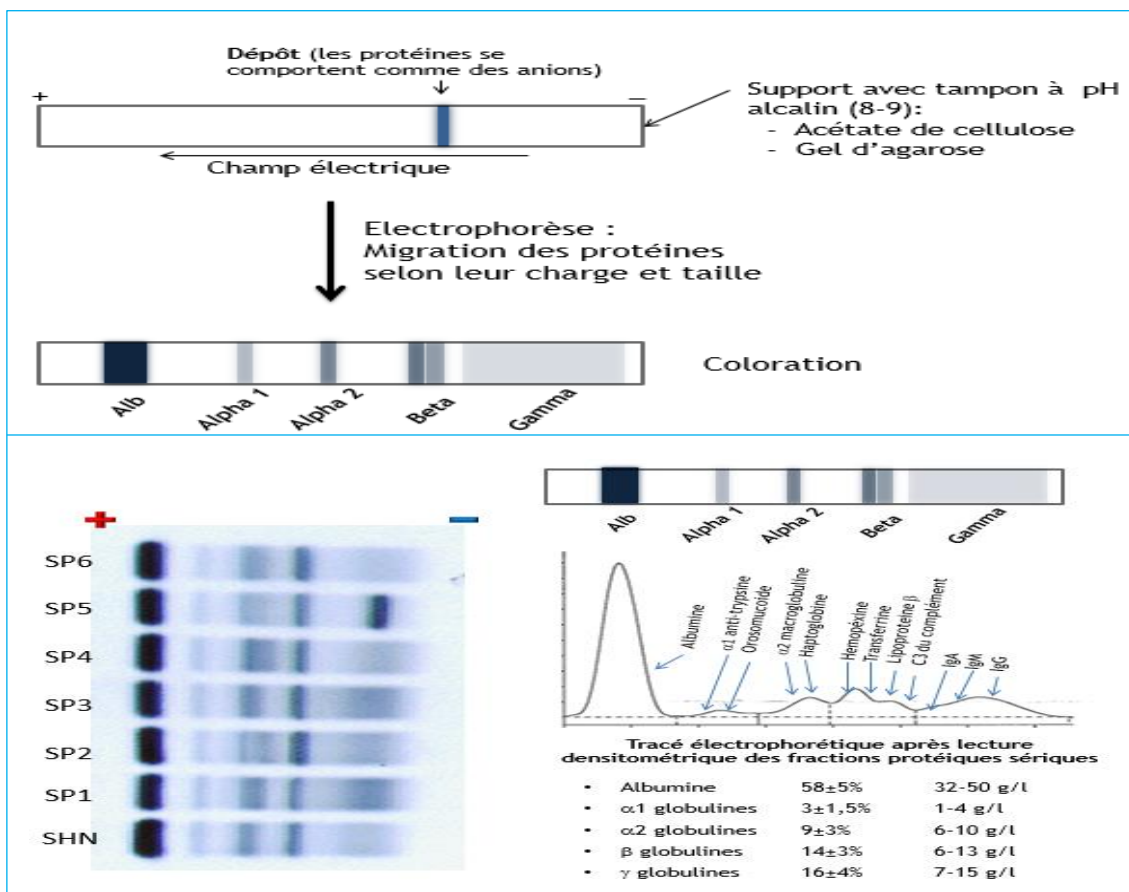
3-Immunoélectrophorèse = Electrophorèse des protéines : Diffusion **accélérée**, Technique **qualitative**

Cette technique se fait en 2 temps :

1. Séparation électrophorétique des sérums : on applique un **courant électrique** au **sérum du patient** et en parallèle à un **sérum humain normal**, afin de séparer les protéines selon leurs charges et leurs poids moléculaire

2. Immunodiffusion et précipitation des fractions protéiques : On ajoute des **Ac** du sérum humain normal dans la rigole → **diffusion** des Ac (formation de complexes immuns) → Formation d'**arcs** de précipitation

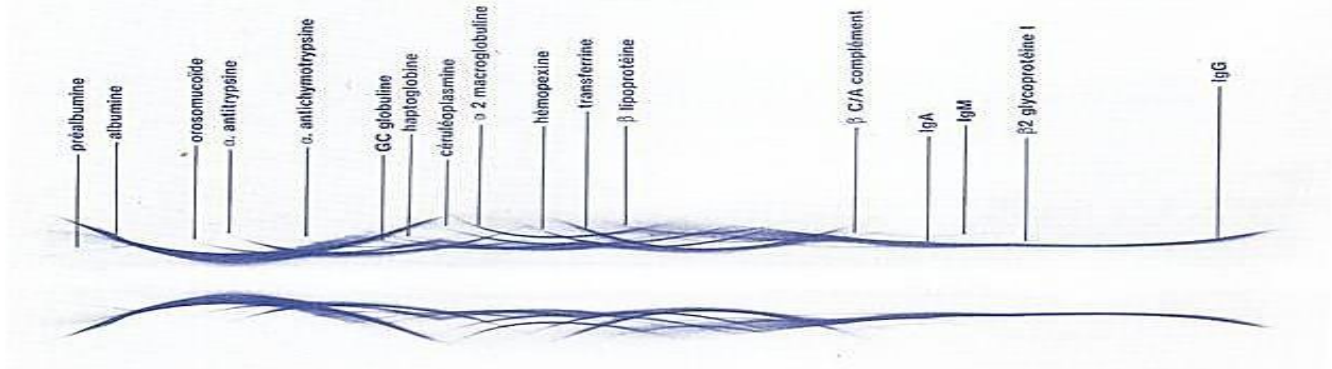




Applications : - Etude semi-quantitative des concentrations par comparaison des entre l'épaisseur des arcs des 2 sérums / - Identification et typage d'un composant monoclonal

4-Immunofixation : technique qualitative

Méthode ayant le même principe que l'immunoélectrophorèse mais plus sensible et plus rapide que cette dernière



Technique en 2 temps :

1. Séparation électrophorétique :

Identique à celle de l'immunoélectrophorèse. Elle consiste à déposer les immunoglobulines contenues dans le sérum ou les urines sur un gel (6 dépôts), puis à séparer ces immunoglobulines en fonction de leur mobilité électrophorétique en les faisant migrer sous l'effet d'un champ électrique. Cette migration dépend de la masse et de la charge de l'Ag.

2. Immunoprécipitation par des immun-sérums monospécifiques :

- Après la migration, on rajoute dans les 5 dernières bandes un immunosérum spécifique (anti IgG, A, M, k et λ respectivement)
- On rajoute dans la 1^{ère} bande (sérum patient) une solution de fixation des protéines
- Formation de complexes [Anti -Ig -Ig] \rightarrow Immunoprécipitation

Application : mettre en évidence la nature et de préciser le typage d'une immunoglobuline monoclonale (myélome...) décelés à l'électrophorèse des protéines sériques/urinaires

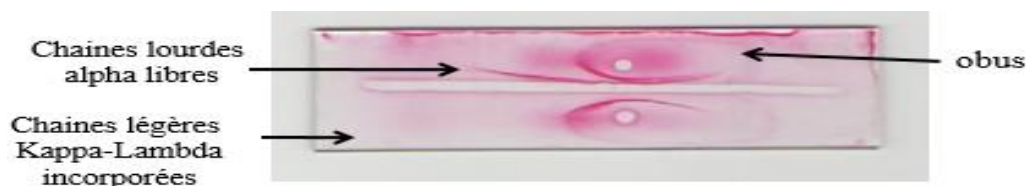


5-Immunoélection : Diffusion **accélérée**, Technique **qualitative**

Principe : Permet la **détection de chaînes lourdes libres** présentes en faible quantité dans des liquides biologiques.

- Le **gel** est incorporé d'**anti-chaînes légères Kappa et Lambda** en quantité optimale, ces Ac précipiteront les Ig entières sous forme de « rockets » ou **obus**
- Les chaînes lourdes libres vont migrer et pourront être identifiées dans un second temps par immunodiffusion en utilisant un immun sérum spécifique (anti-chaîne lourdes)

Application : Recherche de la maladie des chaines lourdes alpha le plus souvent, rarement gamma ou mu.



Méthodes quantitatives

1-Immunodiffusion radiale = **technique de Mancini** : technique **quantitative**

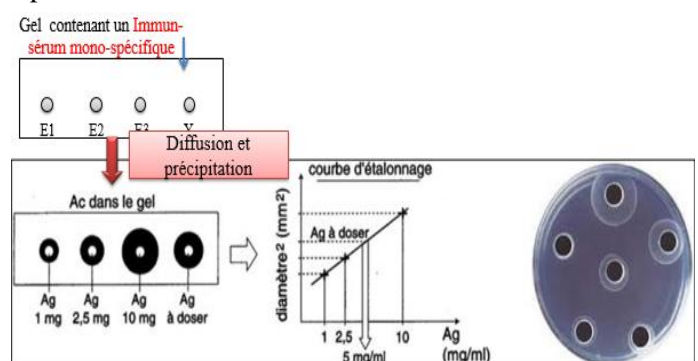
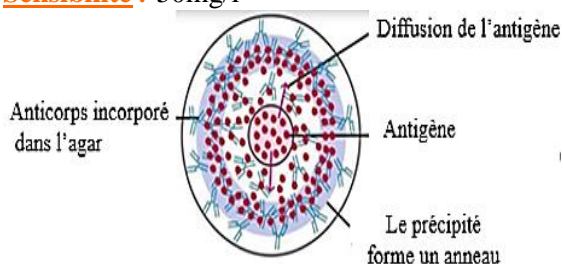
Principe : Consiste en la **diffusion passive et radiale** de la protéine (Ag ou Ac) à doser au sein d'un gel incorporé d'Immun sérum spécifique de cette protéine et formation de cercle de précipitation aux zones d'équivalence.

- ✓ Le **diamètre** du cercle est **proportionnel** à la **concentration** de la protéine.
- ✓ L'utilisation d'étalons de concentrations connues permet d'établir une courbe d'étalonnage.
- On utilise un **gel** contenant l'Ac (ou Ag). On creuse un **trou** dans lequel, on introduit la protéine qu'on veut doser (Ag ou Ac) à des concentrations différentes et on le dernier trou aura une concertation inconnue
- Diffusion simple selon un gradient de concentration décroissant → formation de complexes → formation d'un cercle de précipitation.
- Calcule du **diamètre du cercle** de précipitation (plus le diamètre est grand plus il y'a d'Ag)
- On trace la **courbe d'étalonnage** : l'établissement d'une courbe à partir de solutions contenant des concentrations connues et croissantes d'Ag permet de préciser la concentration d'une solution inconnue du même Ag par la simple mesure du diamètre du cercle de précipitation.
- **Extrapolation** de la valeur des échantillons

Application : Le dosage des protéines

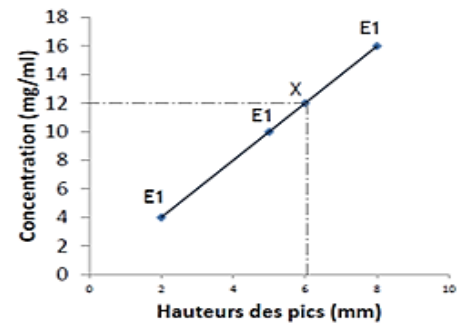
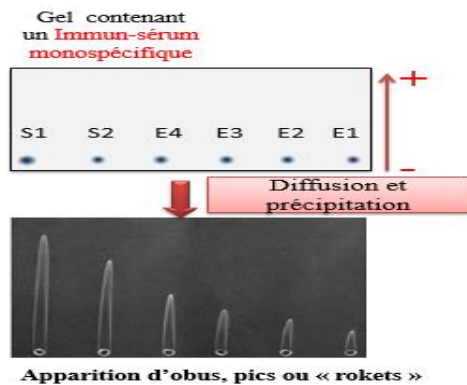
Inconvénient : technique lente : 18 heures pour que le précipité se forme

Sensibilité : 50mg/l



2-Électroimmunoquantification (Laurell) :

- Cette technique a le même principe que celle de Mancini mais la **diffusion** de l'Ag est **accélérée** par un **courant électrique**
- On utilise un gel incluant les **Ac**, dans lequel on creuse un **trou** contenant les **Ag**
- **Electrophorèse** à PH alcalin → On a la formation d'**arcs** de précipitation (rockets ou obus)
- On calcule la hauteur des rockets → On trace la **courbe d'étalonnage** → **Extrapolation**



résultat quantitatif est obtenu en 4 heures.

Résumé

		gel vierge	gel incorporé
En milieu gélifié	Non pulsées	<input checked="" type="checkbox"/> Ouchterlony (Immuno-diffusion double)	<input checked="" type="checkbox"/> Mancini (Immuno-diffusion radiale)
	Pulsées	<input checked="" type="checkbox"/> Electro-synérèse <input checked="" type="checkbox"/> Immunoélectrophorèse <input checked="" type="checkbox"/> Immuno-fixation	<input checked="" type="checkbox"/> Laurell (Technique des rockets) <input checked="" type="checkbox"/> Immuno-sélection
		Qualitatives	Quantitatives
En milieu liquide		<input checked="" type="checkbox"/> Ring test (Test à l'anneau)	<input checked="" type="checkbox"/> Néphélométrie <input checked="" type="checkbox"/> Turbidimétrie
En milieu gélifié	Non pulsées	<input checked="" type="checkbox"/> Ouchterlony (Immuno-diffusion double)	<input checked="" type="checkbox"/> Mancini (Immuno-diffusion radiale)
	Pulsées	<input checked="" type="checkbox"/> Electro-synérèse <input checked="" type="checkbox"/> Immunoélectrophorèse <input checked="" type="checkbox"/> Immuno-fixation	<input checked="" type="checkbox"/> Laurell (Technique des rockets)