

Techniques de dosage immunologiques

I. Introduction :

Les techniques de dosage immunologiques reposent sur une réaction antigène-anticorps.

La compréhension des mécanismes d'interaction entre l'antigène et l'anticorps in vivo et la mise au point des anticorps monoclonaux, ont permis d'utiliser ces principes pour mettre au point des techniques de recherche ou de dosage de différentes substances ou molécules de l'organisme in vitro.

Ces techniques sont utilisées pour mettre en évidence soit des antigènes soit des anticorps.

Lorsqu'on veut détecter des antigènes, on doit disposer d'anticorps spécifiques correspondant à la spécificité antigénique recherchée.

Lorsqu'on cherche à mettre en évidence des anticorps, on doit utiliser des antigènes de spécificité connue correspondant à celle des anticorps recherchés.

Les anticorps sont habituellement recherchés dans le sérum. On peut plus exceptionnellement les rechercher dans d'autres milieux biologiques tel que le liquide céphalorachidien.

Les antigènes peuvent être mis en évidence dans le sérum, mais aussi dans d'autres prélèvements tels que les tissus.

Il existe de nombreuses techniques permettant de détecter les antigènes ou les anticorps. Le choix de la technique est fonction de différents paramètres :

- La concentration de l'antigène ou de l'anticorps.
- La forme de l'antigène : soluble ou particulaire.
- La localisation de l'antigène ou de l'anticorps.

- Méthodes de précipitation
- Méthodes d'agglutination
- Méthodes utilisant un marqueur

Ce sont les méthodes les plus sensibles. Selon le marqueur utilisé, on peut distinguer trois types de techniques :

- L'immunofluorescence : l'antigène ou l'anticorps est marqué avec un fluorochrome.
- L'immunoenzymologie : l'antigène ou l'anticorps est marqué avec une enzyme.
- La radioimmunologie : basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif.

II. Réaction Ag-Ac :

L'immuno-analyse est basée sur la formation des complexes immuns in vitro c'est-à-dire la combinaison d'un épitope d'un Ag avec le paratope de l'anticorps correspondant (spécifique).

Cette réaction est mise à profit pour la recherche et/ou le dosage d'un Ag (ou d'un Ac) dans un milieu biologique.

La zone d'interaction entre l'anticorps et l'antigène se limite au paratope de l'anticorps et à l'épitope de l'antigène.

Dr N. Benachour

Cette association nécessite une bonne complémentarité stérique entre les deux sites réactifs.

Les épitopes et les paratopes engagent des interactions non covalentes et réversibles, de type liaisons de Van der Waals, liaisons hydrophobes, liaisons électrostatiques et liaisons hydrogènes.

Les conditions influençant l'interaction Ag-Ac sont représentées par la température, le PH, la force ionique, le temps de contact et la concentration de l'Ag et celle de l'Ac.

Les anticorps utilisés dans les techniques de dosages immunologiques sont de deux types :

- Des sérums polyspécifiques (Ac polyclonaux).
- Des anticorps monoclonaux.

Les antigènes utilisés sont soit des Ag solubles soit des Ag particulaires.

La mise en évidence de la réaction Ac-Ag peut être faite d'une manière :

- Directe : généralement visible à l'œil nu, sous forme d'une précipitation ou d'une agglutination, soit à l'aide d'un marquage de l'un des deux réactants (antigène ou anticorps) par un radio-isotope, un fluorochrome ou une enzyme.
- Indirecte : basée sur l'étude des conséquences biologiques d'une telle réaction par exemple : l'activation du complément, la cytotoxicité et opsonisation etc...

Quelques applications de la réaction Ag-Ac :

- 1) Diagnostic des maladies infectieuses (bactéries, virus, parasites, champignons) :
 - Diagnostic direct : recherche de l'agent infectieux.
 - Diagnostic indirect : recherche d'anticorps spécifiques.
- 2) Diagnostic de pathologies affectant le système immunitaire :
 - Déficits immunitaires
 - Maladies auto-immunes
 - Hypersensibilités
 - Syndromes lymphoprolifératifs.

III. Techniques d'immunoprécipitation :

1. Caractéristiques:

Une réaction de précipitation est une réaction mettant en jeu des antigènes solubles et des anticorps spécifiques précipitants. La formation de complexes immuns aboutit à un édifice multimoléculaire qui peut dans certaines conditions précipiter en solution.

Dans cette réaction :

- Les antigènes sont solubles et ayant plusieurs épitopes.
- Les anticorps sont précipitants, polyclonaux.

2. Méthodologie:

- Selon le milieu dans lequel se déroule la réaction : Ces réactions peuvent s'observer :
 - * Soit en milieu liquide
 - * Soit en milieu gélifié.
- Selon le procédé :
 - * Techniques passives
 - * Techniques accélérées par un champ électrique.

A. Précipitation en milieu liquide:

A.1 : Le test de l'anneau ou ring test :

C'est une technique d'immunoprécipitation qualitative en milieu liquide.



Il s'agit d'un test actuellement abandonné.

A. 2 : Techniques quantitatives d'immunoprécipitation en milieu liquide :

- Techniques permettant la quantification des CI formés en se basant sur un des phénomènes suivants:
 - **Néphélométrie.**
 - **Turbidimétrie.**
- Techniques automatisables.
- Dosage des protéines spécifiques dans les différents liquides biologiques.

B. Précipitation en milieu gélifié:

- Passives et celles accélérées par un champ électrique.
- Les Ag et Ac diffusent dans le milieu gélifié.
- La précipitation est obtenue dans la région du gel où l'Ag et l'Ac se trouvent dans des proportions permettant la formation du réseau.
- Le gel utilisé retient les précipités dans ses mailles.
- Le gel peut être vierge c'est-à-dire sans réactif ou incorporé de l'Ag ou de l'Ac.
- Révélation du précipité à l'œil nu avec ou sans coloration après plusieurs heures à quelques jours de la réaction.

On retrouve:

- **Techniques passives:**
 - La technique d'Oudin.
 - La technique du Mancini.
 - La technique d'Ouchterlony

Dr N. Benachour

- **Techniques** d'immunoprécipitation en milieu gélifié **accélérées par un champ électrique:**

- * L'Electrosynérèse.
- * Le Laurell
- * L'Immunoélectrophorèse.
- * L'Immunofixation.

Ces techniques d'immunoprécipitation en milieu gélifié sont appliquées :

- A l'analyse qualitative d'un mélange d'Ag dans une solution.
- Au dosage immunochimique d'un Ag.

B. 1 : Immunodiffusion double ou réaction d'Ouchterlony:

- C'est une technique d'immunoprécipitation **qualitative** en milieu gélifié.
- La diffusion de l'Ag et de l'Ac se fait à partir de puits distants creusés dans le gel qui est vierge.
- A la zone d'équivalence entre les deux puits, une ligne de précipitation se forme.
- Il ya autant de lignes de précipitation qu'il ya de systèmes Ag-Ac.
- On peut comparer les lignes de précipitation de plusieurs préparations antigéniques vis-à-vis d'un même antisérum, ou de plusieurs antisérums vis-à-vis d'un même mélange d'Ag.

On constate que :

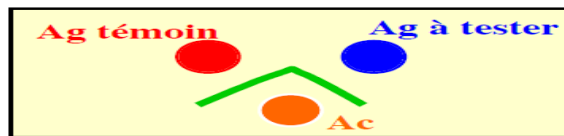
- Les lignes issues de deux systèmes Ag-Ac identiques fusionnent pour ne plus former qu'une seule ligne continue : réaction d'identité.
- Les lignes issues de deux systèmes Ag-Ac qui ont des épitopes en commun, donnent une image en éperon correspondant à une réaction d'identité partielle.
- Les lignes formées par deux systèmes Ag-Ac indépendants se coupent donnant une réaction de non identité.

Il s'agit donc d'une technique qualitative et comparative avec diffusion de plusieurs jours qui permet de :

- * Vérifier la pureté d'une solution.
- * Rechercher une protéine dans un mélange.
- * Vérifier la possibilité de présence d'épitopes communs entre deux protéines.

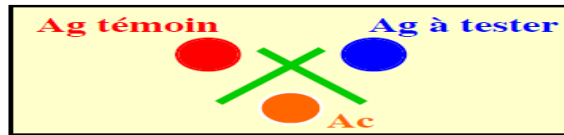


Réaction d'identité



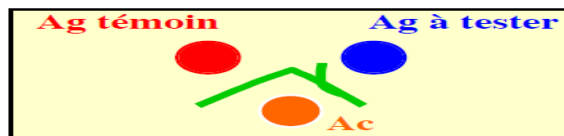
Continuité des arcs

Réaction de non-identité



Croisement des arcs

Réaction d'identité partielle



Continuité des arcs + éperon

Technique d'Ouchterlony

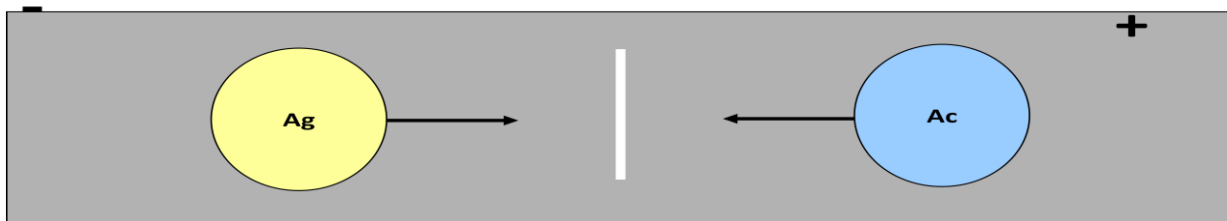
B.2 : Electrosynérèse ou contre immunoelectrophorèse :

Il s'agit d'une technique d'immunoprécipitation en milieu gélifié.

Elle a le même principe que la technique d'Ouchterlony mais la réaction est accélérée par un champ électrique.

C'est une technique qualitative utilisée par exemple pour la recherche des autoanticorps.

- Les Ag et les Ac sont déposés dans puits distants creusés dans le gel ou ils migrent à la rencontre les uns des autres sous l'influence d'un champ électrique.
- Cette migration forcée accélère et renforce l'apparition de lignes de précipitation.
- Technique plus sensible que l'Ouchterlony.



Electrosynérèse

B.3 : l'immunoélectrophorèse- Technique de Grabar et Williams:

- L'immunoélectrophorèse ou IEP permet d'identifier des antigènes dans un mélange en fonction de leur mobilité électrophorétique. Il s'agit d'une technique qualitative.
- Elle est utilisée essentiellement dans le diagnostic des gammopathies monoclonales.

- L'immunoélectrophorèse est une technique réalisée en deux temps:
 - 1^{ère} étape: électrophorèse des protéines
 - 2^{ème} étape: immunoprécipitation
- Met en jeu une **séparation électrophorétique** des protéines dans un gel d'agarose, suivie d'une **double diffusion** selon une direction perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique contre un antisérum.
- Formation d'arcs de précipitation.
- Méthode qualitative et comparative.
- On peut utiliser des antisérums globaux reconnaissant les protéines majeures du sérum ou des antisérums spécifiques.
- Permet de caractériser des composants monoclonaux préalablement identifiés sous la forme d'un pic homogène à l'électrophorèse.

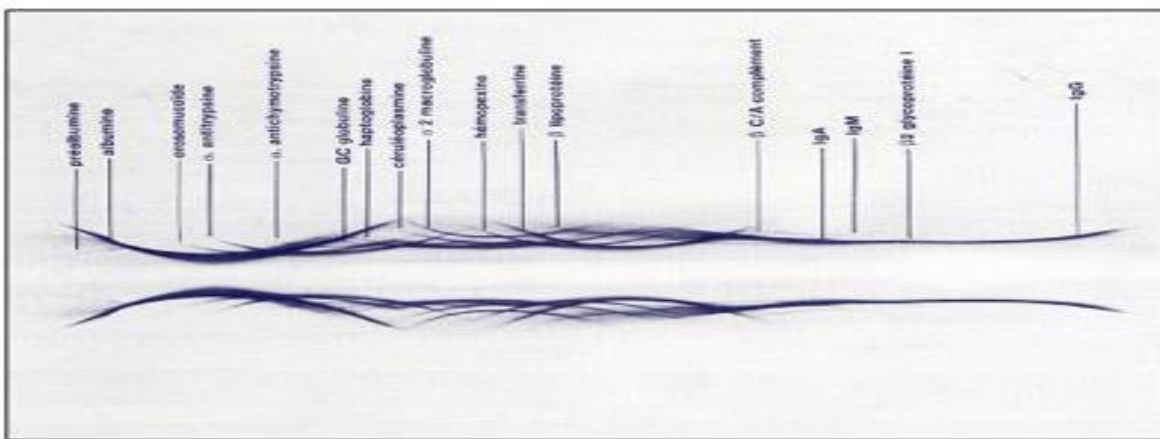


Figure 2a : exemple d'immunoélectrophorèse

B.4 : Immunofixation : IF

C'est une technique proche de l'IEP mais plus rapide, qualitative également et réalisée en deux temps :

- * Électrophorèse : un mélange est soumis en plusieurs pistes à une séparation électrophorétique.
- * Immunoprécipitation : chaque piste électrophorétique est incubée avec un antisérum monospécifique qui précipite la fraction correspondante.

L'IF est plus sensible que l'IEP et utilisée uniquement pour la recherche des immunoglobulines monoclonales au cours du diagnostic des gammopathies monoclonales.

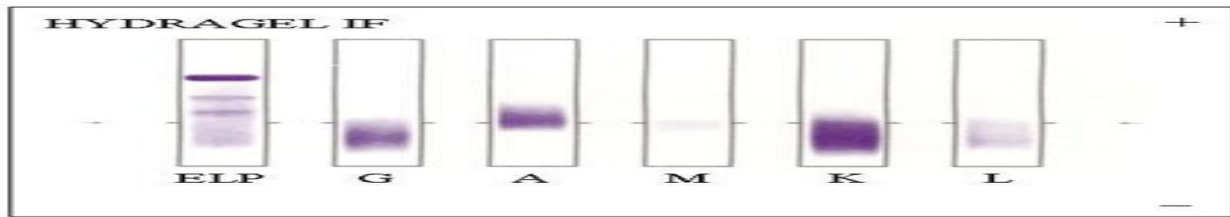


Figure 3a : absence de gammopathie monoclonale

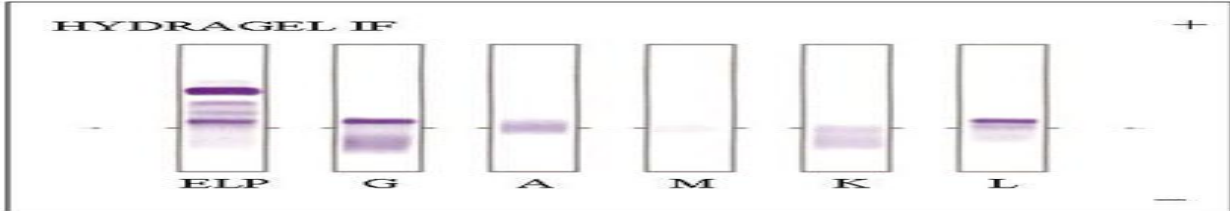
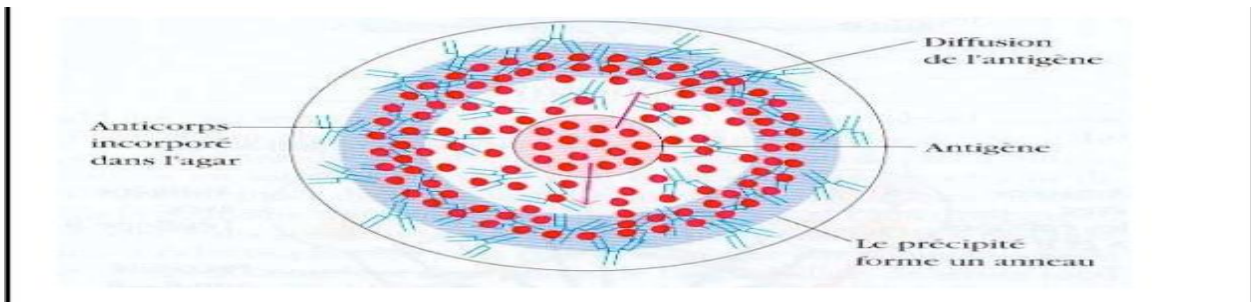


Figure 3b : gammopathie monoclonale de type IgG lambda

B. Technique de Mancini :

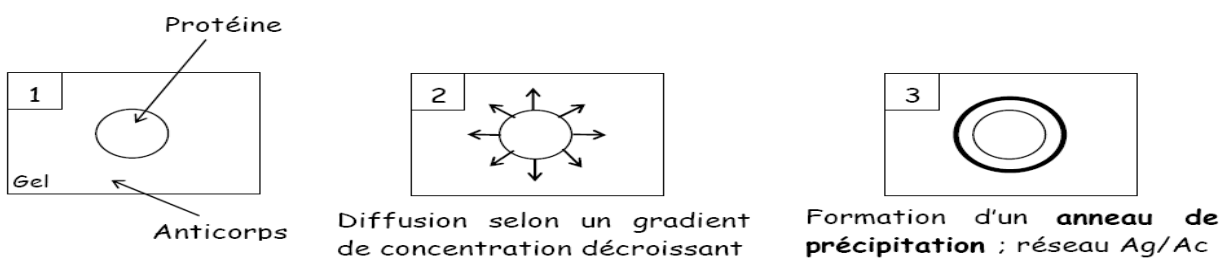
- Immunodiffusion radiale.
- Technique qualitative ou quantitative.
- Le gel est incorporé de l'Ac.
- L'Ag est déposé dans un puits creusé dans le gel.
- Après diffusion, la réaction positive se traduit par un anneau de précipitation.
- Peut être utilisée pour le dosage de certaines protéines sériques.



Technique de Mancini

a. Mancini : aspect qualitatif :

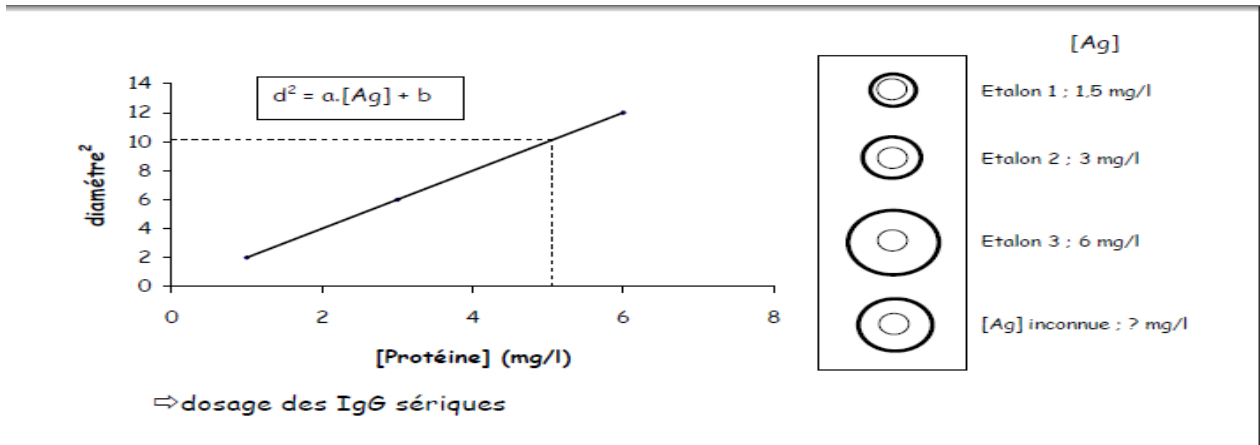
Présence ou absence de l'anneau de précipitation



Aspect qualitatif

b. Test quantitatif:

- La réaction positive se traduit par 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 d'étalonnage.



Aspect quantitatif

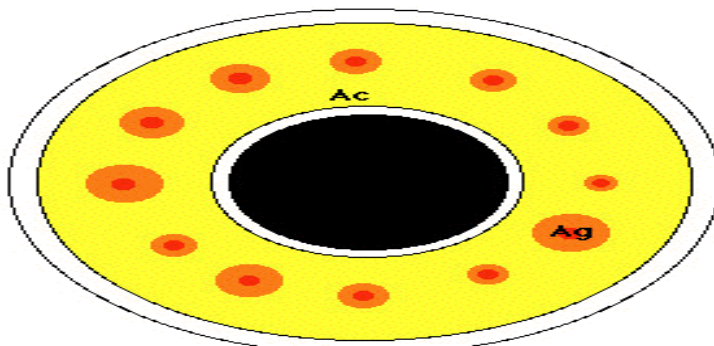
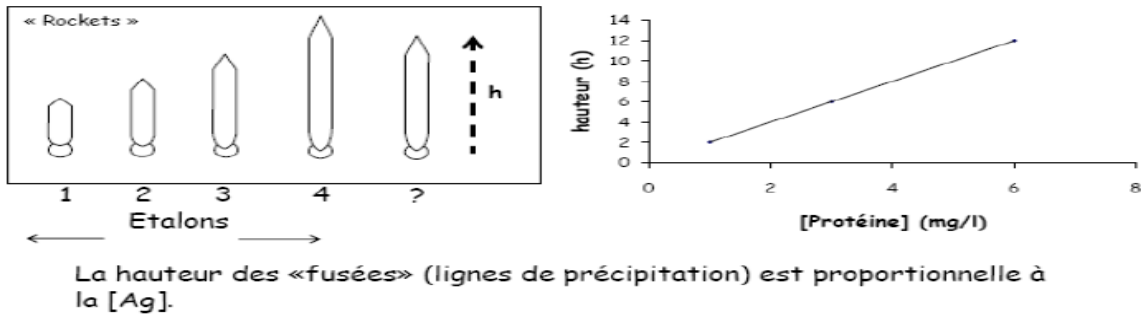


Fig.IV-14 : Technique de Mancini.

Mancini : Aspect quantitatif

B.6 : La technique de Laurell :

- A le même principe que la technique de Mancini mais la réaction est accélérée par un champ électrique.
- Technique quantitative permettant le dosage des protéines spécifiques.
- Le précipité se traduit par des fusées de précipitation.

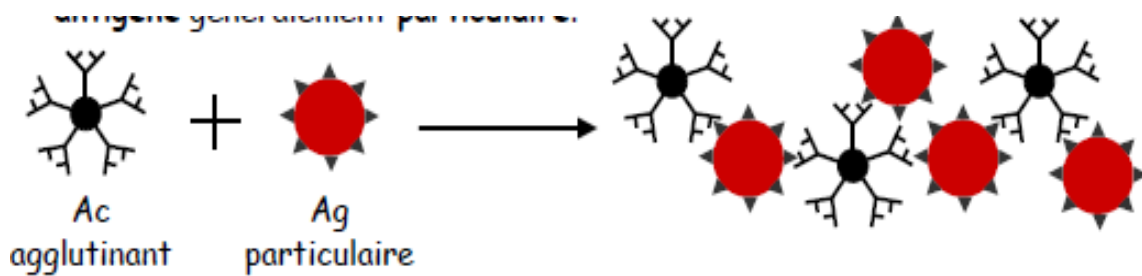


Technique de Laurell

IV. Les techniques d'immuno- agglutination :

I. Définition:

- C'est l'agrégation, c'est à dire la réunion en amas, de particules support d'un Ag sous l'action d'Ac spécifiques.
- Ces particules (érythrocytes, germes, particules de latex.....), portant l'Ag se réunissent sous l'action de l'Ac en amas visibles à l'œil nu.



Immunoagglutination

- Ces techniques peuvent être mises en œuvre pour dépister soit les anticorps, soit les antigènes.
- Leur principe repose sur la mise en évidence d'un agglutinat résultant de la réaction entre des Ac agglutinants et des Ag sous forme particulaire.

2. Les différents types d'agglutination:

A. Agglutination active:

Résulte d'une union spécifique entre un Ac et un Ag particulaire appartenant naturellement à la particule.

B. Agglutination passive:

Réalisée entre un Ac et un Ag normalement soluble, mais rendu particulaire par fixation sur un support.

Supports: Particules inertes

- Bille de latex
- Gélatine
- Particules de charbon
- Billes de polystyrène
- Hématies.....

Les hématies sont intéressantes car elles représentent un support neutre et rendent la réaction visible.

C. Agglutination directe :

Réalisée entre un Ac agglutinant et un Ag généralement particulaire.

D. Agglutination indirecte ou artificielle:

Réalisée entre un Ac non agglutinant et un Ag (généralement particulaire) avec utilisation d'un artifice.

3. Avantages des techniques d'agglutination:

- Simplicité d'exécution.
- Equipement modeste.
- Faible volume d'échantillon généralement requis.
- Réalisation de la réaction à température ambiante.
- La lecture possible à l'œil nu et, pour les latex notamment.
- La rapidité d'obtention du résultat.
- Lecture peut être délicate.

4. Applications des techniques d'agglutination:

On peut utiliser:

- Des cellules bactériennes
- Des hématies portant naturellement des Ag.
- Des hématies ou des billes de latex sur lesquelles on a fixé artificiellement un Ag.








Les réactions d'agglutination peuvent être réalisées sur lames, en tubes, ou en microplaques.

Applications:

A. Agglutination active directe:

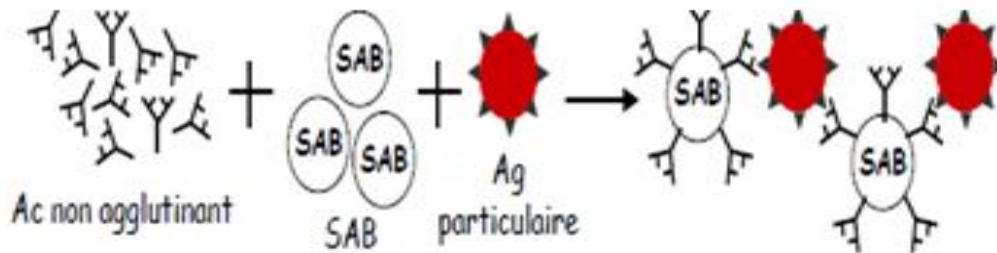
- Caractérisation des Ag ABO des hématies humaines:

- La mise en évidence des Ag érythrocytaires se fait par une technique d'agglutination active directe entre les hématies à tester et des Ac sériques connus. On parle d'épreuve globulaire directe ou épreuve de Beth Vincent.
- Cette technique peut être réalisée sur plaque, en tube ou en microplaque.

Épreuve de Beth-Vincent		Épreuve de Simonin	
Détermination des antigènes (sur les globules rouges du patient)		Détermination des anticorps (dans le sérum du patient)	
Anticorps anti-A	 pas d'agglutination	Globules A	 agglutination
Anticorps anti-B	 agglutination	Globules B	 pas d'agglutination
Anticorps anti-A + Anticorps anti-B	 agglutination	Globules AB	 agglutination
<i>On constate la présence de l'antigène B qui s'agglutine avec l'anticorps correspondant.</i>		Globules O	 pas d'agglutination
		<i>On constate donc la présence d'anticorps anti-A et l'absence d'anticorps anti-B</i>	
Les déterminations des antigènes et des anticorps sont compatibles et indiquent que ce patient est du groupe B			

B. Agglutination active indirecte: Recherche de l'Ag Rhésus des hématies humaines

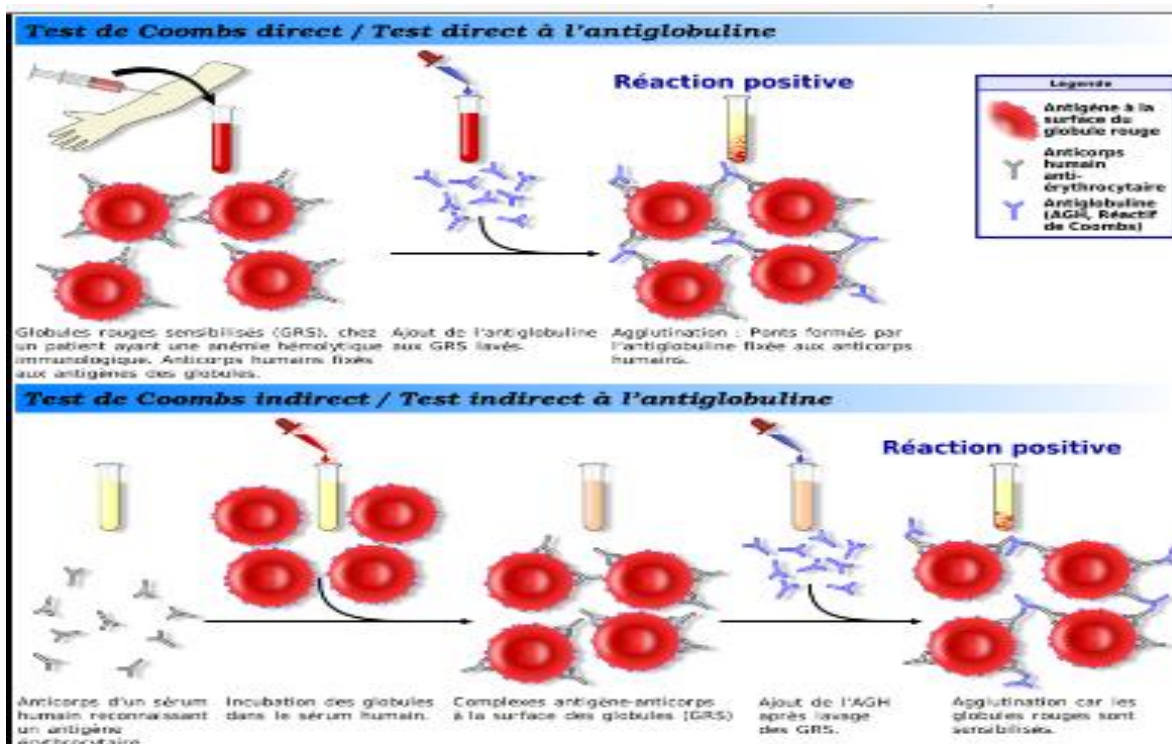
- La détermination du phénotype Rhésus consiste à rechercher si les hématies du sujet possèdent ou non les Ag du système Rhésus en mettant en contact les hématies avec des Ac spécifiques des Ag connus.
- Du fait de la particularité des Ac utilisés, la réaction d'agglutination nécessite l'ajout de sérum albumine (le plus souvent bovine): on parle d'agglutination active indirecte.



Agglutination active indirecte

L'Hémagglutination:

- C'est une variante de l'agglutination.
- Elle est définie comme la fixation d'Ac spécifiques sur des structures antigéniques présentes à la surface des GR.
- Cette réaction aboutit à la formation d'un agrégat d'hématies appelé agglutinat.
- Elle est utilisée au laboratoire afin d'établir des sérodiagnostics et de déterminer les groupes sanguins.



Tests de Coombs direct et indirect