

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

I- INTRODUCTION

La compréhension des mécanismes d'interactions entre l'Ag et l'Ac in vivo et la mise au point des Ac 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. Si on cherche un Ag, le réactif utilisé sera l'Ac correspondant et inversement.

Les réactions Ag-Ac in vitro sont soit des réactions directes où le résultat est visible sans artifice (précipitation, agglutination), soit des techniques avec marquage qui permet de visualiser la liaison Ag-Ac. Le marquage peut se faire par un corps radioactifs : radioimmunologie, par un corps fluorescent : immunofluorescence ou par une enzyme : immunoenzymologie.

II- PRECIPITATION

A la rencontre d'un Ac et d'un Ag soluble il y a formation d'un réseau qui donne un précipité visible. L'Ac doit être bivalent et l'Ag bivalent ou multivalent. Au moins 2 copies du même épitope. Elle peut se faire soit en milieu liquide soit en milieu gélifié.

1- La précipitation en milieu liquide

C'est une réaction quantitative.

* Dans une série de tubes on met une quantité constante d'Ac et une quantité progressive d'Ag.

Dans les premiers tubes il y a un excès d'Ac par rapport à la quantité d'antigène, il n'y a pas de précipité. Dans les tubes suivants, le précipité devient visible car tous les sites Ac se sont liés aux épitopes antigéniques et l'ensemble forme un réseau : c'est la **zone d'équivalence**. Dans les derniers tubes, il y a un excès d'Ag le précipité disparaît.

* Immunonéphélémétrie : le mélange réactionnel est soumis à une lumière. L'intensité de la lumière dispersée par le mélange est directement proportionnelle au nombre de complexes immuns du mélange. Dosage des protéines plasmatiques : immunoglobulines, fractions du complément, protéines de l'inflammation.

1- La précipitation en milieu gélifié

a- Immunodiffusion radiale : technique de Mancini

C'est une technique de précipitation en gel qui permet la détermination de la concentration d'un Ag ou d'un Ac. Lorsqu'on veut déterminer la concentration d'un Ag, l'Ac correspondant est incorporé à un gel d'agar et l'échantillon d'Ag est déposé dans un puits creusé dans le gel. L'Ag diffuse, et lorsque le rapport Ag /Ac atteint la zone d'équivalence, un cercle de précipitation se forme autour du puits. La surface du cercle est proportionnelle à la concentration d'Ag.

Applications : dosage des protéines plasmatiques qui existent à des taux relativement élevés : albumine.

b- Immunodiffusion double : technique d'Ouchterlony

C'est une technique qualitative qui permet de comparer des Ag. L'Ag et l'Ac diffusent dans le gel, l'un vers l'autre à partir de puits. A l'équivalence une ligne de précipitation se forme. C'est une technique qualitative qui permet de comparer des Ag : Identité (2 arcs se rencontrent), non identité (2 arcs se croisent) ou identité partielle (2 arcs forment un éperon).

c- Immunoelectrophorèse

C'est une technique qualitative qui combine la séparation par électrophorèse et la double immunodiffusion. Un mélange d'Ag est soumis dans un premier temps à une électrophorèse pour séparer ses constituants selon leurs charges électriques. Dans une deuxième étape, les constituants protéiques diffusent dans le gel. Les Anti sérums (Ac) sont alors placés dans des gouttières creusées dans le gel parallèlement au champ électrique. Après diffusion il y a formation d'arcs de précipitation dans la zone d'équivalence.

Cette technique est utilisée pour l'exploration des Ig : classe, chaîne lourde, chaîne légère.

III- AGGLUTINATION

A la rencontre d'un Ac et d'un Ag particulaire il y a formation d'un réseau qui donne un agglutinat. En cas d'excès d'Ac il y a un effet prozone et l'agglutination est inhibée.

L'agglutination peut être qualitative pour déterminer l'existence ou pas d'un Ac ou d'un Ag. Elle peut être semi quantitative et détermine

le titre d'un Ac : l'inverse de la dernière dilution qui donne une agglutination.

Applications : groupage ABO rhésus, diagnostic sérologique de plusieurs pathologies infectieuses.

IV- RADIOIMMUNOLOGIE

Une des techniques les plus sensibles pour détecter un Ac ou un Ag. Un des principes de cette réaction est la compétition entre l'Ag recherché et le même Ag marqué vis à vis de l'Ac correspondant. La fixation de l'Ag recherché sur l'Ac empêche celle de l'Ag marqué. La radioactivité est inversement proportionnelle à la quantité d'Ag recherché.

Applications : dosage des substances antigéniques en endocrinologie, en gynécologie, en hématologie, en virologie et en pharmacologie.

V- IMMUNOENZYMOLOGIE

ELISA: enzym linked immuno sorbent assay

Elle peut être qualitative ou quantitative, elle peut concerner un Ag ou un Ac.

- ELISA par **compétition** : Ac recherché et Ac marqué par une enzyme

- ELISA **sandwich** : Ag+ Ac + Ac marqué

Applications : dosage des protéines à l'état de traces : Ig E, Diagnostic sérologique des infections parasitaires, bactériennes, virales.

VI- IMMUNOFLUORESCENCE

Elle se fait sur coupe, frottis ou liquide biologique. Elle permet de rechercher des Ac ou des Ag. Deux techniques possibles :

- Immunofluorescence directe : IFD : Ag recherché mis en présence d'un Ac marqué

- Immunofluorescence indirecte : IFI : Ag recherché mis en présence d'un Ac puis d'un anti-Ac marqué.

Applications : auto immunité, recherche d'antigènes bactériens, recherche d'Ac anti bactériens.

Conclusion :

Le choix d'une technique dépend de sa spécificité et de sa sensibilité à détecter le composant recherché