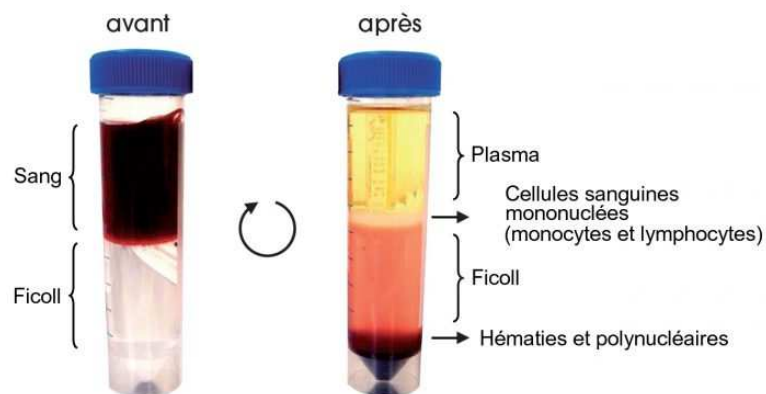


TRAVAUX DIRIGES D'IMMUNOLOGIE :

METHODES D'ETUDE DU SYSTEME IMMUNITAIRE.

RESPONSABLE
PR. ALI OUAROUR



<http://microbiologiemedicale.fr>

LICENCE FONDAMENTALE "SVI-S5"
LIEU DES TD : FACULTE DES SCIENCES - TETOUAN
ANNEE UNIVERSITAIRE : 2016-2017

SOMMAIRE

TD n°1 : ISOLEMENT DES ORGANES LYMPHOÏDES ET SEPARATION DES CELLULES DE L'IMMUNITE

TD n°2 : INTERACTIONS ANTIGENE-ANTICORPS

TD n°3 : TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES SANS MARQUAGE :

- **PRECIPITATION**
- **AGGLUTINATION IMMUNOLOGIQUE**
- **TECHNIQUES DU COMPLEMENT**

TD n°4 : TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES DITES DE MARQUAGE :

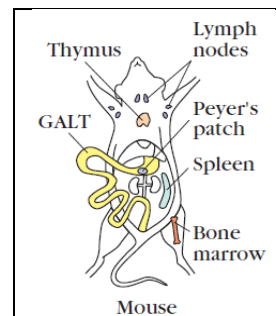
- **IMMUNO-FLUORESCENCE**
- **IMMUNO-ENZYMOLOGIE**
- **RADIO-IMMUNOLOGIE**

TD N°1 : ISOLEMENT DES ORGANES LYMPHOÏDES ET SEPARATION DES CELLULES DE L'IMMUNITE

I. Localisation des organes lymphoïdes :

1. Organes lymphoïdes primaires :

- *Moelle osseuse* : Au niveau des os plats (sternum, bassin), ou la tête du fémur (os long), qui contiennent la moelle osseuse hématogène.
- *Thymus* : Derrière le sternum, devant la trachée, il repose sur le cœur.



2. Organes lymphoïdes secondaires :

- *Ganglions lymphatiques* : Au niveau du pli du coude, creux poplité, creux inguinal, creux axillaire, cavités abdominale et thoracique et cou.
- *Rate* : Située dans l'hypochondre gauche.
- *Tissus lymphoïdes* : Abondants surtout au niveau de l'appendice et au niveau du colon.

II. Isolement des organes lymphoïdes : Dissection de la souris.

La souris blanche est la variété "albinos" (pelage blanc, yeux rouges) de la souris domestique dont le nom scientifique est *Mus musculus*. Elle est élevée comme modèle animal de laboratoire. C'est un petit Mammifère appartenant à l'ordre des Rongeurs.

Le matériel nécessaire à la dissection de la souris est résumé dans le tableau suivant :

Nom de l'outil	Schéma de l'outil	Rôles de l'outil
Planche à dissection en liège		Fixer l'animal.
Aiguilles		Fixer l'animal sur la planche de fixation.
Pince		Pincer, écarter ou couper les différents tissus.
Sonde cannelée		Guider les gros ciseaux au cours de la dissection.
Grosse paire de ciseaux (une extrémité arrondie et l'autre pointue)		Sectionner les peaux, os plats, cartilages, tuniques musculaires, etc.
Paire de ciseaux fins		Sectionner délicatement les vaisseaux sanguins, nerfs, tissus conjonctifs, etc.
Scalpel		Dilacérer le tissu conjonctif qui emballe les organes.

- Etapes de la dissection :

(<http://espace-svt.ac-rennes.fr/applic/dissect/souris/souris02.htm>)

Fixer la souris sur le dos à l'aide d'épingles enfoncées obliquement dans les pattes (Photo. n°1). Faire une boutonnière dans la peau de l'abdomen en avant de l'orifice urinaire. Engager la sonde cannelée dans la boutonnière en décollant la peau jusqu'au menton (Photo. n°2). Découper la peau. Décoller la peau, la rabattre vers l'extérieur et la fixer avec des épingles (Photo. n°3). Faire une boutonnière dans la paroi musculaire de l'abdomen (Photo. n°4). Introduire la sonde cannelée jusqu'à la pointe du sternum et découper les muscles. Découper le plastron thoracique (Photo. n°5). Enlever le plastron thoracique. Chez la souris disséquée, les organes lymphoïdes sont ainsi en place et peuvent être isolés (Schéma n°1).



Photo. n°1 : Souris sur sa planche de dissection.

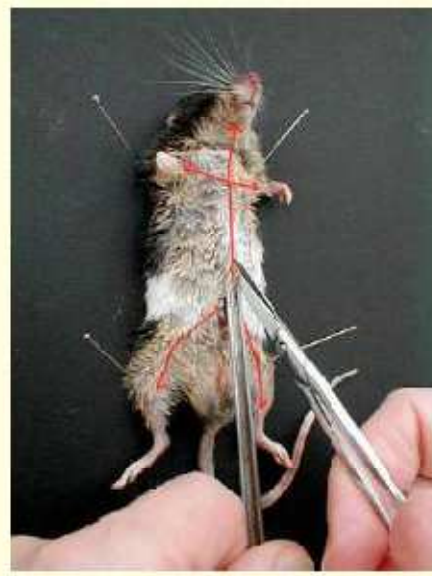


Photo. n°2 : Laparotomie (incision de l'abdomen) et utilisation de la sonde cannelée pour incision de la peau de la souris.

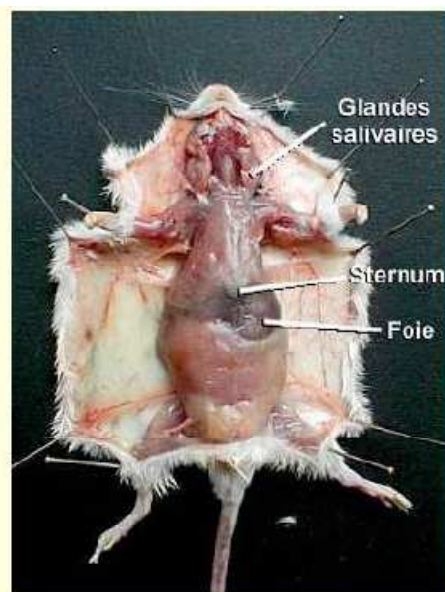
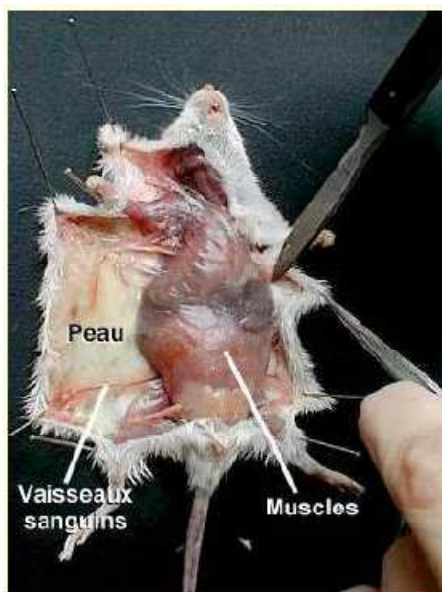


Photo. n°3 : Sens d'incision interne de la souris, les volets cutanés sont rabattus vers l'extérieur et fixés à l'aide d'épingles.

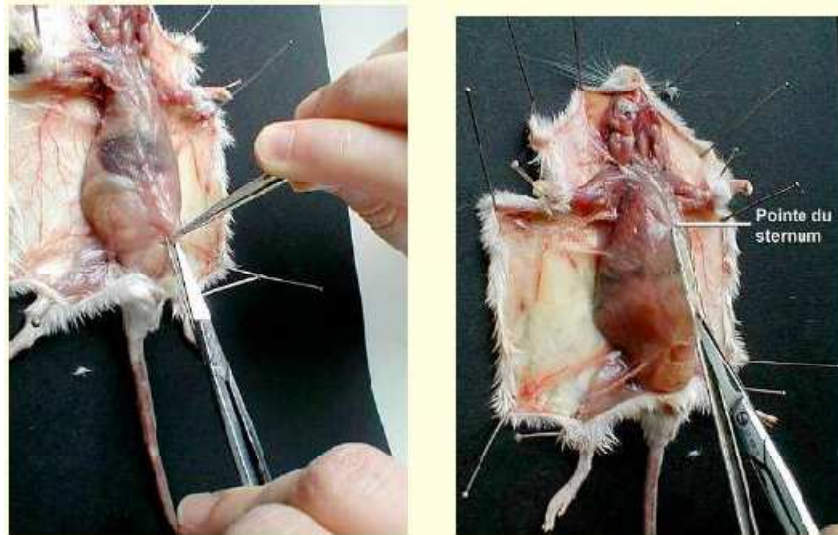


Photo. n°4 : Incisions abdominales internes.

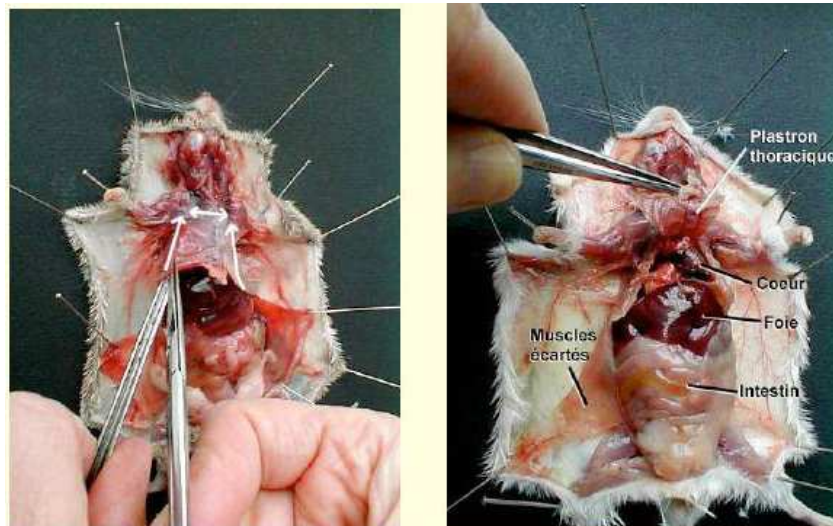


Photo. n°5 : Incisions thoraciques internes.

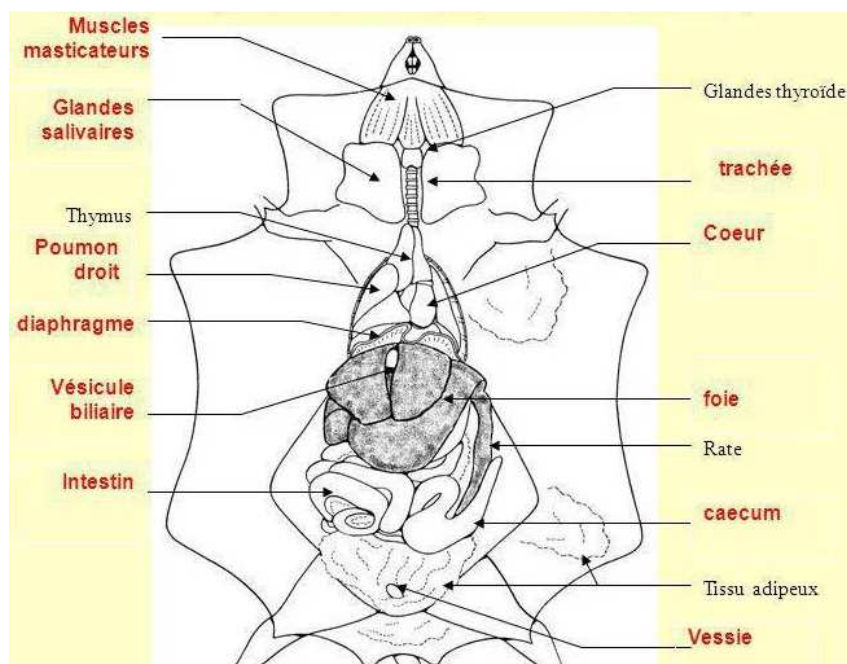
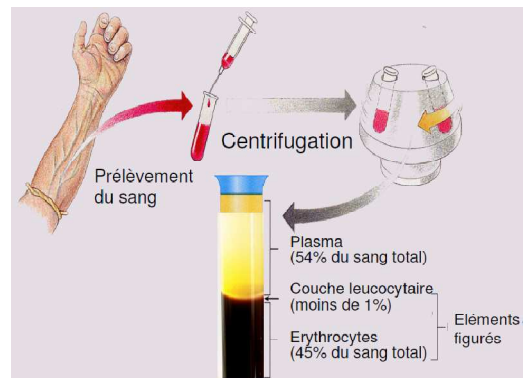


Schéma n°1 : Souris disséquée, organes en place (<http://slideplayer.fr/slide/518847/>).

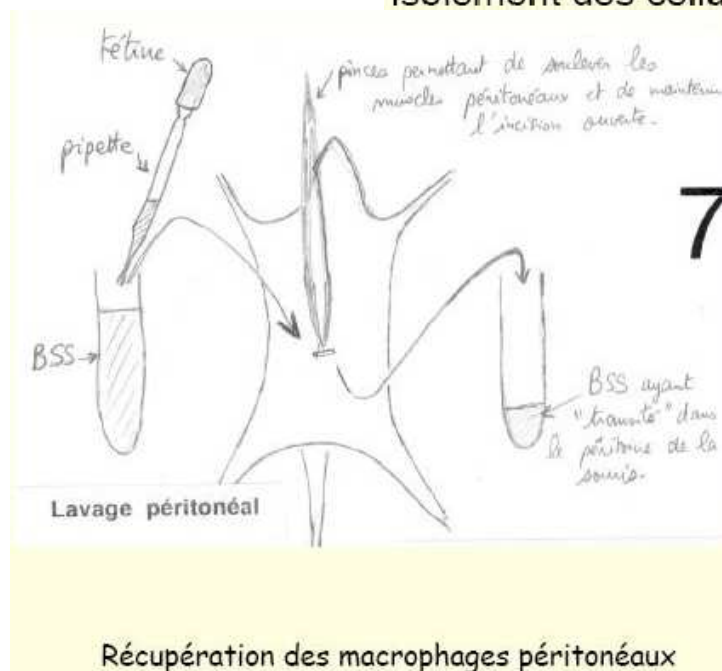
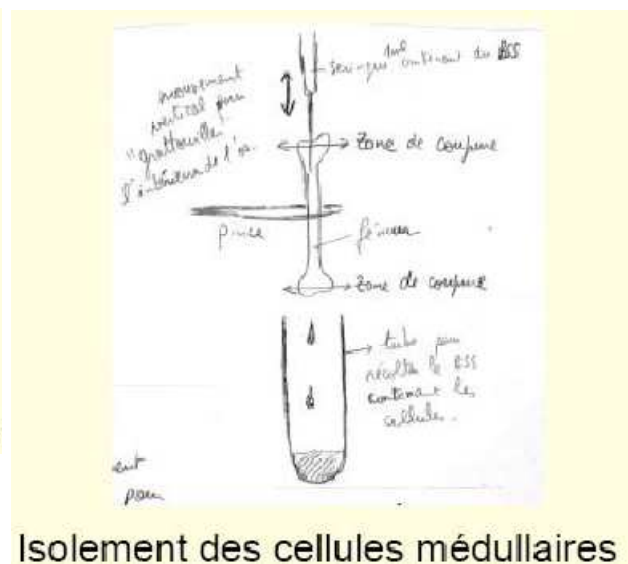
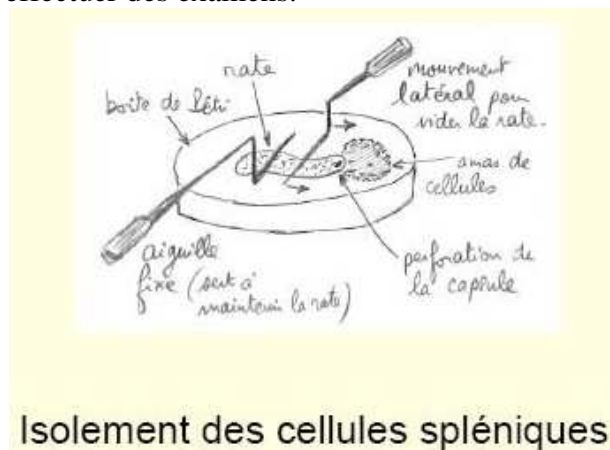
III. Isolement des cellules :

Les prélèvements (sang périphérique, moelle osseuse, ganglions, rate, biopsie pathologique) sont généralement recueillis sur anticoagulants.

- *Sang récolté sur anticoagulant* : un anticoagulant est une substance chimique ayant la propriété d'inhiber la coagulation naturelle du sang. Parmi les anticoagulants les plus utilisés il y a les *anti-vitamines K* (AVK) qui inhibent la synthèse des facteurs de la coagulation et les *sels d'héparine* qui inhibent la formation de thrombine, cette action inhibe la transformation du fibrinogène en fibrine. L'*EDTA* (Ethylène Diamine Tétra Acétique) est aussi utilisé comme anticoagulant, notamment dans les tubes de sang, puisqu'il capte les ions Ca^{2+} qui sont un facteur important de la coagulation.



- *Biopsies* : Prélèvement d'une très petite partie d'un organe ou d'un tissu pour effectuer des examens.



IV. Mise en suspension des cellules de l'immunité :

La culture cellulaire est un ensemble de techniques de biologie utilisé pour faire croître des cellules hors de leur organisme (*ex-vivo*) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique. Les cellules mises en culture peuvent être des micro-organismes libres (bactéries ou levures), des cellules "saines" prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie, etc.), on parle alors de "culture primaire". Ces cellules ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (limite de Hayflick). Certaines cellules ayant une capacité de division non limitée (on parle d'«immortalité en culture») sont qualifiées de lignées cellulaires. Les lignées sont soit des cellules cancéreuses, soit des cellules en voie de cancérisation, soit des cellules saines rendues "immortelles" artificiellement, soit des cellules souches. Des fois, ce sont des tranches d'organes (d'épaisseur optimisée selon le tissu) qui sont mises en culture.

Les milieux de culture dits empiriques sont composés d'une base (sels minéraux, glucose, acides aminés, vitamines, tampon indicateur de pH, rouge de phénol : La majorité des cellules survit dans un intervalle de pH compris entre 6,8 et 7,6) et de sérum de veau fœtal, de 2 à 20 % du volume, qui apporte des facteurs favorisant la multiplication cellulaire (facteurs de croissance, protéines d'adhésion, protéines de transport et oligo-éléments). Des antibiotiques (pénicilline, streptomycine) et des antifongiques sont généralement ajoutés au milieu.

Les *milieux définis* contiennent les mêmes constituants que les *milieux empiriques* mais tout est quantifié. Ces milieux, bien adaptés à la culture cellulaire, contiennent de l'eau, des sels minéraux (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , Cu, Zn, Co, Fe), une source d'énergie (glucose ou glutamine), les acides aminés indispensables (Gln, Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, Ile, Tyr, Cys, Arg, His), des vitamines (biotine, choline, folate, nicotinamide, thiamine, etc.), des facteurs de croissance, des facteurs d'adhésion (fibronectine) ou encore des protéines de transport (Albumine, Transferrine).

Les cellules animales sont généralement cultivées en incubateurs, à une température de 37°C et dans une atmosphère très humide à teneur en CO_2 contrôlée, souvent 5 %. Certaines cellules sont cultivées en *suspension* dans leur milieu nutritif (cellules non-adhérentes ; lymphocytes, moelle osseuse, certains types de tumeurs, etc. : les cellules flottent dans le milieu et prolifèrent en suspension), d'autres sont cultivées sur des plastiques traités leur offrant des capacités d'*adhérence* : boîtes de différents formats ou *flasks*. On peut cultiver également les cellules dans des environnements tridimensionnels reconstitués proche des matrices extracellulaires naturelles (Matrigel).

V. Tests de viabilité des cellules de l'immunité :

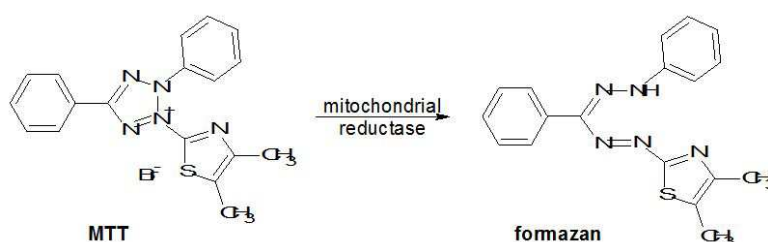
La viabilité de cellules primaires et des lignées cellulaires s'opère *via* plusieurs tests : Test du rouge neutre, test au bleu de trypan, test MTT, test au bleu alamar, etc. Dans les suspensions de cellules isolées (rate de souris ou sang périphérique humain), il est nécessaire de lyser de manière optimale les érythrocytes avec un effet minimal sur les lymphocytes. Pour cela, il existe des tampons de lyse des GR comme l'ACK (*Ammonium-Chloride-Potassium*) composé de Tris HCl 17mM, NH_4Cl 144mM, pH 7.4. L'usage des tampons de lyse des GR n'est pas nécessaire pour un travail sur le thymus de souris ou les ganglions lymphatiques.

1. Test au Bleu de Trypan :

Le bleu de Trypan, aussi appelé bleu diamine ou bleu Niagara, tire son nom du fait qu'il tue les trypanosomes (protistes parasites). Il s'agit d'un colorant azoïque, soluble dans l'eau, qui permet de distinguer les cellules mortes grâce à sa couleur bleue (la membrane intacte empêche l'entrée de la coloration dans le cytoplasme).

2. Test MTT :

Le test MTT est une méthode rapide de numération des cellules vivantes. Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium). L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan. Ceci forme un précipité dans la mitochondrie de couleur violette. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule). Il suffit donc après l'incubation des cellules avec du MTT pendant trois heures environ à 37 °C, de dissoudre les cellules, leurs mitochondries et donc les précipités de formazan violets dans du DMSO 100 % (diméthylsulfoxyde est un solvant polaire organique utilisé comme agent cryoprotecteur lors de la congélation de cellules ou d'organes). Un simple dosage de la densité optique à 550 nm par un spectrophotomètre permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement.



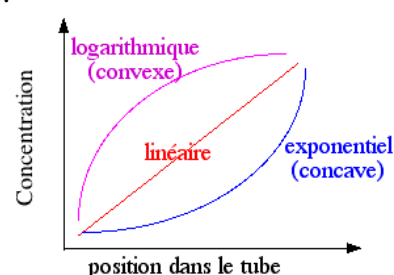
VI. Méthodes de séparation des cellules de l'immunité :

Le but des techniques de séparation cellulaire est d'obtenir des populations cellulaires quasiment pures et, ainsi, en étudier les fonctions, les caractéristiques et leurs réponses en culture à différents facteurs stimulants. Les cellules peuvent être distinguées par des critères physiques (taille, densité, rapport nucléo-cytoplasmique, etc.), chimiques (propriétés d'adhérence, capacité enzymatique particulière, etc.) ou immunologiques (liés à la présence d'Ag intra-cytoplasmiques ou de surface, qui peuvent être décelés avec des Ac monoclonaux ou polyclonaux spécifiques). Par exemple, les macrophages adhèrent au plastique, ce qui permet de les éliminer dans les boîtes de culture sur la surface desquelles ils vont s'attacher.

1. Isolement de cellules mononucléées par la densité :

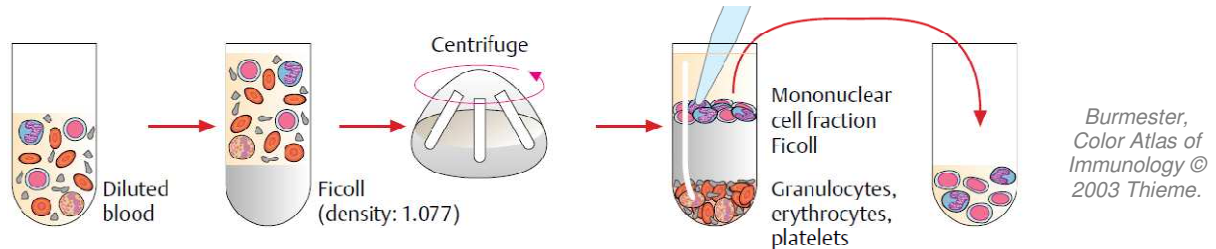
Pour séparer des particules de taille similaire mais de densité différente, on utilise les techniques d'*ultracentrifugation en gradient de densité*. Les gradients utilisés peuvent être discontinus ou continus (la variation de densité graduelle le long du tube à centrifuger peut être linéaire, exponentielle, logarithmique, etc.) : **i.** Si la densité de la particule est plus grande que celle du solvant, une sédimentation s'opère (plus la différence de densité est grande, plus la sédimentation est rapide), **ii.** Sans différence de densité, aucune sédimentation n'apparaît quelle que soit l'accélération de la centrifugation et, enfin, **iii.** Si la particule est moins dense que celle du solvant, elle subit une élévation jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface.

Les *gradients de Ficoll* (Ficoll = glucide ramifié artificiel) sont utilisés pour séparer les cellules ayant différentes densités, et en particulier pour purifier les lymphocytes. Un échantillon de sang périphérique dilué et anti-coagulé est déposé à la surface du Ficoll (densité de 1,077 g/l sans générer de fortes pressions osmotiques) et centrifugé. Les GR, les



http://www8.umoncton.ca/umcm-gauthier_didier/siitub/centgradient.html

plaquettes et les granulocytes sont plus denses que Ficoll et sédimentent au fond du tube (culot) alors que les lymphocytes et les monocytes restent à l'interface. Les macrophages peuvent être éliminés des populations de lymphocytes par adhérence, ou par phagocytose de particules de limaille de fer et déplétion des cellules phagocytaires avec un aimant. Les lymphocytes peuvent être récupérés à l'aide d'une pipette.



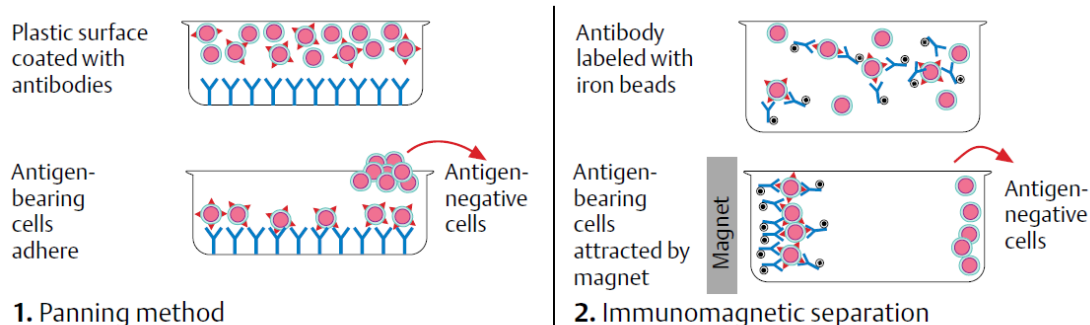
A. Isolation of mononuclear cells from peripheral blood

2. Marqueurs de surface :

a. Séparation de populations cellulaires à l'aide d'Ac : Panning.

Les flacons ou boîtes de culture cellulaire peuvent être recouverts par des Ac en présence d'un pH alcalin ("*panning*" ou *adhérence spécifique*). Lorsque de telles surfaces recouvertes d'Ac sont mises en contact avec un mélange cellulaire, les cellules exprimant l'Ag spécifique sont retenues par le plastique alors que les cellules négatives sont éliminées en décantant et en lavant. C'est une technique souvent utilisée pour éliminer une sous-population de cellules.

Les cellules exprimant l'Ag sont récupérées à l'aide de manipulations mécaniques (un refroidissement violent) ou d'une digestion enzymatique. Le couplage des Ac à des billes ferromagnétiques (*beads* comme les MACS, *Magnetic activated cell sorting*, ont un diamètre de 50 nm environ et sont composées d'oxyde de fer et de polysaccharide) permet également d'enrichir des populations cellulaires exprimant ou non un Ag (*séparation immunomagnétique*). À l'aide d'un aimant, les cellules positives chargées de fer sont séparées de la suspension cellulaire. Cette méthode est particulièrement adaptée à l'élimination de cellules non souhaitées (sélection négative).



1. Panning method

2. Immunomagnetic separation

C. Antibody-mediated separation of cell fractions

Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.

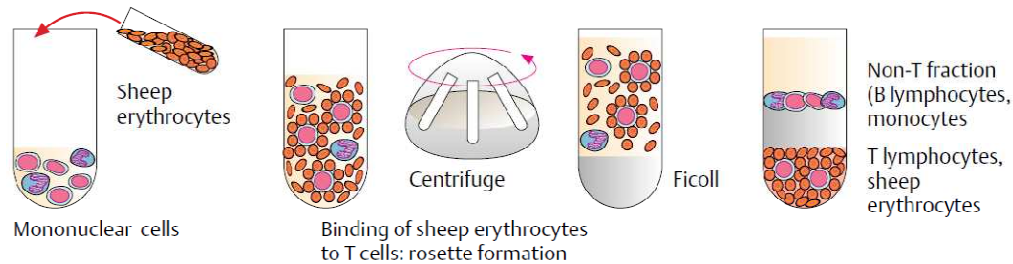
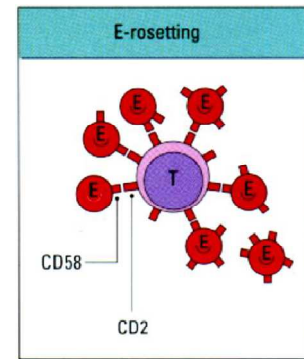
b. Séparation de lymphocytes T et B : formation de rosettes.

La méthode des rosettes permet d'isoler les lymphocytes en les associant avec des GR. Les lymphocytes T humains expriment des molécules d'adhésion cellulaire (CAM) comme le CD2 qui interagit avec la LFA-3 (CD58, une CAM) à la surface de GR de mouton (E). Cela permet la formation de rosettes composées d'une cellule T avec plusieurs érythrocytes de mouton qui peuvent être isolés par une sédimentation à travers un *gradient de Ficoll*.

Suite à une lyse hypotonique des érythrocytes, on obtient des lymphocytes T d'une pureté d'environ 95%.

Les cellules ne formant pas de rosettes (majoritairement des lymphocytes B et des monocytes) flottent au-dessus de la couche de Ficoll et peuvent être récupérées.

Par ailleurs, les cellules exprimant des récepteurs pour le Fc des IgM ou des IgG peuvent être isolées en les incubant en présence de GR sensibilisées avec un Ac de la classe appropriée. Celui-ci forme un pont entre le GR et le récepteur pour le Fc, et les rosettes ainsi formées peuvent être isolées.



B. Separation of T and B lymphocytes: Rosette formation

*Burmester, Color
Atlas of
Immunology ©
2003 Thieme.*

TD N°2 : INTERACTIONS ANTIGENE-ANTICORPS

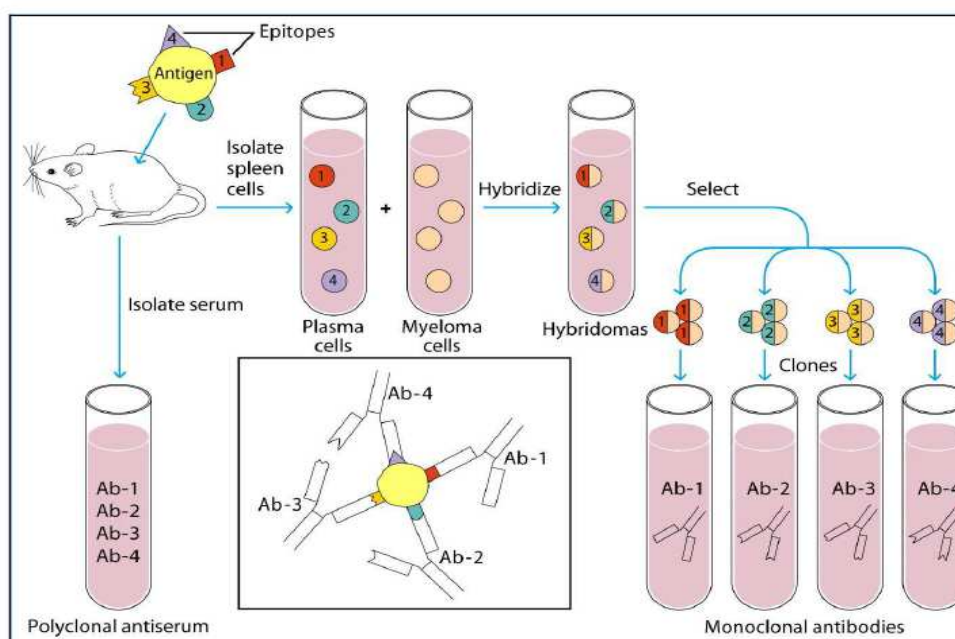
I. Ac monoclonaux et Ac polyclonaux :

Les *Ac monoclonaux* sont issus d'un seul et unique clone de cellules B ayant reconnu le même épitope sur un Ag donné. Ils sont utilisés en recherche (techniques telles que la cytométrie en flux, le *western blots* ou les tests d'immuno-hématologie), pour le diagnostic médical (tests de grossesse, par exemple) et pour la thérapie de diverses pathologies (en tant que médicaments, leur nomenclature se termine par "*mab*", acronyme de "*monoclonal antibody*"). Les *Ac polyclonaux* sont, par contre, générés après l'injection d'un Ag multivalent à un animal (souris, rat ou lapin) dont résulte la stimulation de plusieurs clones différents de lymphocytes B : on obtient un sérum d'Ac polyclonaux reconnaissant des épitopes différents du même Ag.

La technique des hybridomes permet l'obtention des Ac monoclonaux. Il s'agit de la fusion de cellules lymphocytaires B normales (isolées à partir de la rate) et de cellules cancéreuses (cellules appartenant à un myélome) pouvant se multiplier indéfiniment. La fusion cellulaire est favorisée par du polyéthylène glycol. Ainsi, un hybridome est une cellule immortelle possédant la capacité de produire des Ac monoclonaux.

Les cellules myélomateuses sont rendues HGPRT⁻, autrement dit, elles sont déficitaires de l'enzyme *Hypoxanthine Guanine PhosphoRybosilTransférase* de la voie exogène (ou voie de récupération) de la synthèse des nucléotides. Les hybridomes sont placés dans un *milieu HAT* (Hypoxanthine Aminoptérine Thymidine) inhibiteur de la voie endogène (ou voie *de novo*) de la synthèse des nucléotides. Il est à noter qu'ainsi les cellules myélomateuses ne peuvent plus synthétiser d'ADN (ni par la voie endogène, ni par la voie exogène), mais c'est leur fusion avec les lymphocytes B qui apporte l'enzyme HGPRT. Après la fusion, on observe trois types d'hybridomes dont un seul est viable : Les hybridomes issus de la fusion d'un lymphocyte B et d'une cellule myélomateuse.

	Lymphocyte B	Cellule myélomateuse
Lymphocyte B	Non viable (soumis à l'apoptose)	Viable
Cellule myélomateuse	Viable	Non viable (HGPRT ⁻ et milieu HAT)



Technique des hybridomes qui permet l'obtention des Ac monoclonaux (Kuby Immunology, 6th edition, W.H. Freeman and Company, 2007).

En culture, les hybridomes non viables disparaîtront, et des techniques de dilutions permettent de récupérer les hybridomes d'intérêt (dilution limite : on dilue de sorte de ne retrouver qu'un hybridome par puits). Chaque hybridome sera ensuite testé pour voir contre quel épitope il agit : *Criblage d'hybridomes*. Il s'agit de sélectionner l'hybridome qui produit les Ac monoclonaux d'intérêt dirigés spécifiquement contre un seul épitope de l'Ag. Enfin, une expansion clonale permettra de multiplier le clone de l'hybridome sélectionné, soit *in vitro*, soit *in vivo*, dans le but d'obtenir de grandes quantités d'Ac.

II. Force des interactions Ag-Ac :

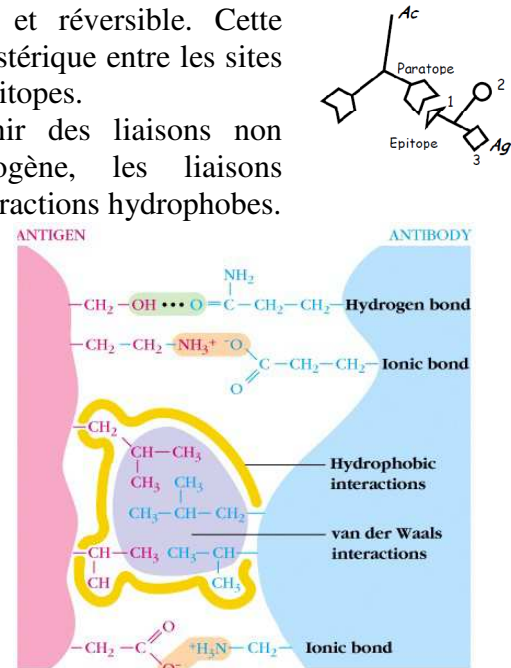
La réaction Ag/Ac est due à l'interaction entre l'épitope de l'Ag et le paratope (V_H/V_L) de l'Ac de manière spécifique et réversible. Cette interaction est très dépendante de la complémentarité stérique entre les sites Ac ou paratopes et les déterminants antigéniques ou épitopes.

Le complexe (immun) Ag/Ac fait intervenir des liaisons non covalentes faibles incluant les liaisons hydrogène, les liaisons électrostatiques, les forces de Van der Waals et les interactions hydrophobes.

La force de l'interaction Ag-Ac dépend du nombre des liaisons faibles entre l'Ag et l'Ac lequel nombre est lié au degré de complémentarité entre l'épitope et le paratope (notion de spécificité).

L'interaction Ag-Ac dépend de quatre types de forces non covalentes :

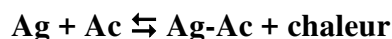
- les *liaisons hydrogène* dans lesquelles un atome d'H est partagé entre deux atomes électronégatifs ;
- les *liaisons ioniques* entre résidus porteurs de charge opposées ;
- les *interactions hydrophobes* dans lesquelles l'eau force les groupes hydrophobes à se réunir ;
- les *interactions de van der Waals* entre les nuages électroniques externes de deux atomes ou plus.



(Kuby Immunology, 6th edition, W.H. Freeman and Company, 2007).

1. Affinité des Ac :

L'affinité est définie comme la somme des forces de liaison et de répulsion entre un épitope et un paratope.



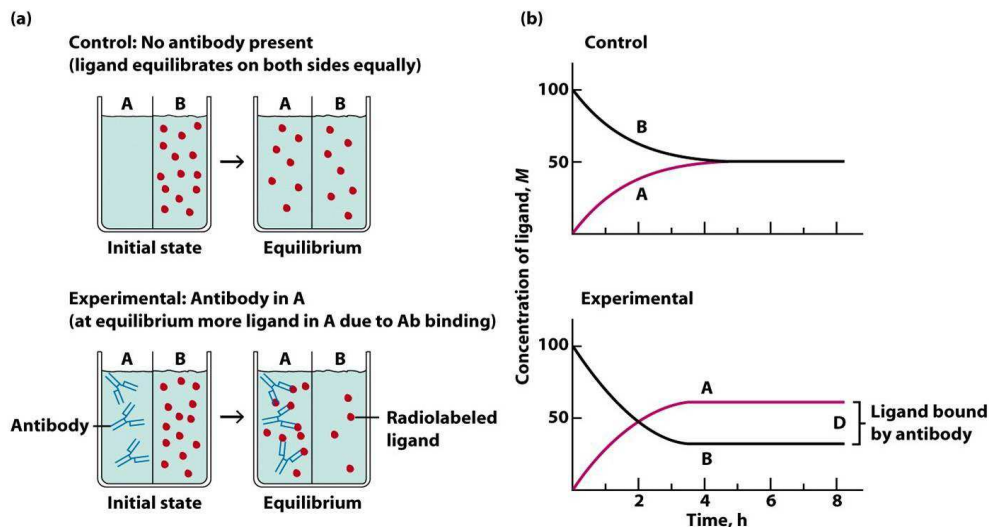
$K = k_1/k_2$, k_1 constante d'association et k_2 constante de dissociation

$K_a = [\text{Ag-Ac}] / [\text{Ag}][\text{Ac}]$, constante d'équilibre qui varie entre 10^4 et 10^{12} L/mol.

La réaction Ag-Ac est une réaction exothermique qui libère une énergie de 2 à 40 kcal/mol.

L'inverse de K_a est la constante de dissociation K_d ($1/K_a$) qui est un indicateur de la stabilité d'un complexe Ag-Ac : Les complexes très stables ont des valeurs très faibles de K_d .

La constante d'équilibre K_a peut être déterminée par une méthode permettant de mesurer l'affinité d'un Ac : La *dialyse à l'équilibre*. Ce procédé utilise une chambre de dialyse contenant deux compartiments égaux séparés par une membrane semi-perméable. L'Ac est placé dans un compartiment et un Ag radiomarké suffisamment petit pour passer à travers la membrane est placé dans l'autre compartiment. En l'absence d'Ac, l'Ag ajouté sera en équilibre des deux côtés de la membrane. En présence d'Ac, une partie de l'Ag marqué sera liée à l'Ac et l'Ag non lié sera distribué de façon égale dans les deux compartiments. Ainsi, la concentration totale de l'Ag sera plus grande dans le compartiment contenant l'Ac. La différence de concentration de l'Ag dans les deux compartiments représente la concentration de l'Ag lié à l'Ac.



Détermination de l'affinité d'un Ac par dialyse à l'équilibre (Kuby Immunology, 6th edition, W.H. Freeman and Company, 2007).

Etant donné que la concentration totale de l'Ac dans la chambre de dialyse à l'équilibre est connue, l'équation peut être réécrite :

$$K_a = [Ag-Ac] / [Ag].[Ac] = r / c(n - r)$$

$$r = [Ag \text{ lié}] / [Ac \text{ total}] ; c = [Ag \text{ libre}] ; n = \text{nombre de sites de liaison par molécule d'Ac}.$$

Cette expression peut être réarrangée pour donner l'équation de Scatchard :

$$r / c = K_a n - K_a r$$

2. Avidité de l'Ac :

L'avidité est la force avec laquelle un Ac multivalent lie un Ag multivalent. L'avidité est donc largement supérieure à la somme des affinités, ainsi l'avidité augmente très fortement avec la valence de l'Ac. L'avidité conditionne la rapidité de la formation du complexe Ag / Ac. Elle dépend de l'affinité des paratopes, mais aussi de la valence de l'Ag et de l'Ac et des conditions du milieu (température, pH et force ionique). Une forte avidité peut compenser une faible affinité. Par exemple, l'IgM pentamérique a souvent une plus faible affinité que l'IgG, mais la haute avidité de l'IgM, qui résulte de sa valence plus élevée, la rend capable de fixer efficacement l'Ag.

Par ailleurs, les IgG synthétisés au cours d'une infection récente ont une avidité faible. A l'inverse, les IgG produites lors des réinfections ont une avidité forte. L'indice d'avidité mesure la dissociation de la liaison Ag-Ac en présence d'urée et permet donc de dater l'infection.

III. Réactivité croisée :

Bien que les interactions Ag-Ac soient très spécifiques, dans certains cas, l'Ac peut présenter une réactivité croisée avec un Ag non apparenté. Cette réactivité apparaît lorsque deux Ag différents partagent un épitope identique ou lorsque des Ac spécifiques d'un épitope se fixent aussi à un épitope non apparenté possédant des propriétés chimiques semblables. Dans ce dernier cas, l'affinité de l'Ac qui établit une réaction croisée avec l'épitope est habituellement moindre que celle de l'épitope original.

Les Ag microbiens induisent la formation d'Ac qui peuvent établir des réactions croisées avec des Ag de la cellule hôte, il en résulte une réaction auto-immune dommageable pour les tissus (exemple des Ac produits contre l'Ag M de la bactérie *Streptococcus pyogenes* qui établissent des réactions croisées avec des protéines musculaires).

METHODES D'IMMUNOCHIMIE

L'étude du système immunitaire nécessite l'utilisation d'un grand nombre de techniques et procédés dont certains sont empruntés à d'autres disciplines telles que la biochimie ou la génétique moléculaire, par exemple. Toutefois, l'immunologie a aussi développé ses propres techniques (méthodes d'immunochimie) basées sur l'interaction Ag-Ac : Une réaction équilibrée et réversible. En effet, la spécificité de la réaction Ag-Ac permet, d'un côté, la recherche, l'identification ou le dosage de toute molécule capable d'induire la production d'Ac, et, d'un autre côté, la recherche, l'identification ou le dosage d'Ac grâce à l'Ag correspondant.

Lors de l'interaction Ag-Ac, deux cas peuvent se présenter :

♦ On peut observer la survenue de phénomènes secondaires, physiques ou biologiques, inconstants mais visibles d'où différents types de **techniques sans marquage** :

- Précipitation,
- Agglutination immunologique,
- Techniques du complément,

♦ L'union des molécules d'Ag au Fab des Ac est un phénomène constant mais invisible. Cette union peut être mise en évidence par le marquage de l'Ag ou de l'Ac, ce sont les **techniques dites de marquage** :

- Immunofluorescence,
- Immuno-enzymologie,
- Radio-immunologie.

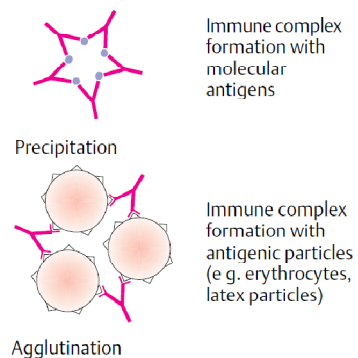
Le choix de la technique immunologique repose sur un certain nombre de critères dont la concentration de l'Ag ou de l'Ac (pg, µg ou mg, par exemple), la forme de l'Ag (soluble ou particulaire) ou encore la localisation de l'Ag ou de l'Ac.

TD N°3 : TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES SANS MARQUAGE

I. Précipitation et agglutination :

La précipitation est la formation de complexes immuns avec des *Ag moléculaires* (solubles). En maintenant constante la concentration de l'Ac, l'Ag est dilué par diffusion, jusqu'à la formation d'un précipité lorsque la région d'équivalence est atteinte.

L'agglutination est la formation de complexes immuns avec des *Ag particulaires*. On distingue les tests d'agglutination directe (par exemple, test d'héماغglutination pour déterminer les groupes sanguins) et les tests d'agglutination indirecte (par exemple, latex-agglutination et héماغglutination passive de Boyden).



B. Precipitation and agglutination
Burmester, *Color Atlas of Immunology* ©
2003 Thieme.

II. Précipitation :

1. Généralités :

Les techniques de précipitation peuvent être effectuées en phase solide (immunodiffusion radiale ou immunoélectrophorèse) ou en phase liquide (turbidimétrie ou néphélométrie).

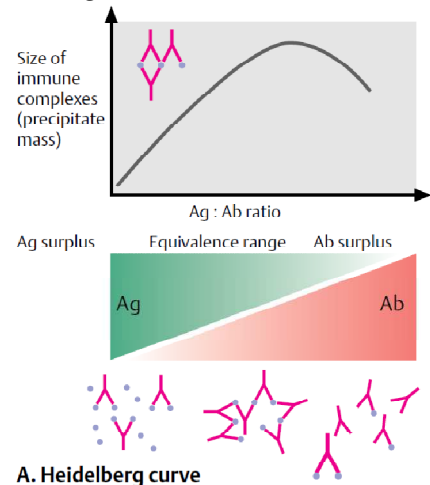
2. Etude de la courbe de précipitation : *Courbe de Heidelberg*.

Lorsque des concentrations croissantes d'Ag sont ajoutées à une concentration fixe d'Ac, trois zones sont à distinguer : zone d'excès d'Ac, zone d'équivalence et zone d'excès d'Ag. La *courbe de Heidelberg* décrit ces trois zones : en cas d'excès d'Ac (faible rapport Ag/Ac), des complexes immuns solubles se forment, dont la quantité est proportionnelle à la concentration de l'Ag. Avec une concentration croissante de l'Ag, la région d'équivalence est atteinte (les complexes sont les plus grands et le précipité est maximum). On observe alors la formation de complexes immuns insolubles qui précipitent et peuvent être visualisés. Si l'Ag est en excès, il y a formation de complexes immuns solubles dont la concentration correspond à celle de l'Ag.

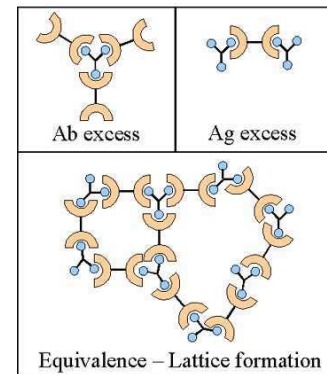
En présence d'excès d'Ac ou d'Ag, on accroît la proportion de complexes plus petits et donc moins précipitables.

L'union d'Ag multivalents avec des Ac au moins bivalents induit donc la formation d'un réseau tridimensionnel et multimoléculaire insoluble (théorie du réseau, Marrack). Des paramètres tels que le pH, la température et la force ionique ont leur importance dans la formation du réseau.

Par exemple, la réaction est inhibée aux pH extrêmes (en dessous de 6 et au-dessus de 8,5) : Effet dissociant des pH acides (élution). Aussi, à 37°C, la précipitation est accélérée et à 0°C, la quantité de précipité est augmentée. Concernant la force ionique μ , chez les mammifères, la quantité maximale de précipité est obtenue pour $[\text{NaCl}] < 0,15 \text{ M}$.



Burmester, *Color Atlas of Immunology* © 2003 Thieme.



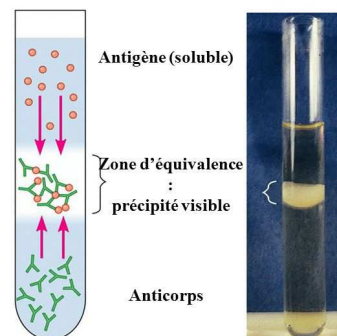
3. Précipitation en milieu liquide :

La réaction de précipitation en milieu liquide est l'illustration classique de la réaction Ag-Ac : l'Ag et l'Ac étant tous les deux en phase soluble. Le pré-requis d'une telle réaction est au minimum la bivalence des deux partenaires, toujours valable pour les Ig, mais non valables pour des Ag mono-épitopiques comme les haptènes.

a. Réactions qualitatives : Test de l'anneau (*Ring Test*).

C'est le test qualitatif le plus simple. L'Ac est introduit dans un tube capillaire de faible diamètre, puis l'Ag soluble est ajouté. Si la réaction est spécifique, un anneau de précipitation apparaît à l'interface.

Le test de l'anneau de précipitation est réalisé dans un tube



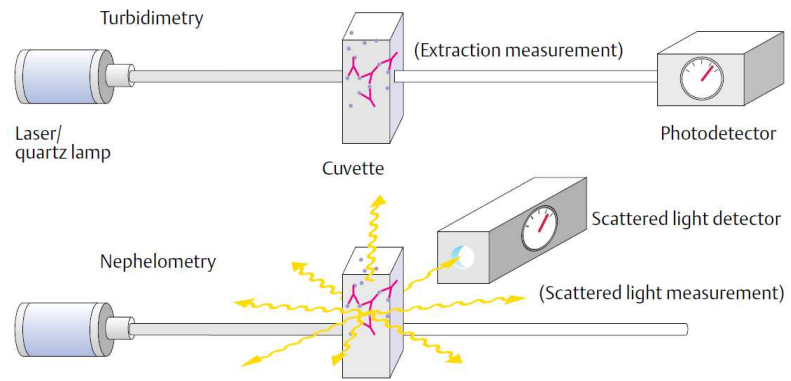
Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

b. Réactions quantitatives :

- *Immunoturbidimétrie* : L'échantillon contenant l'Ag est mis en contact avec un excès d'Ac spécifique et déposé dans une cuve d'analyse. La formation de complexes immuns solubles change l'absorbance de la solution qui peut être mesurée par photométrie.

Lors de la détermination du point final, l'accroissement de l'absorption dans une période donnée correspond à la concentration de l'Ag.

- **Immunonéphélométrie laser** : Cette technique mesure également la formation de complexes immuns entre l'Ag dans l'échantillon et un antisérum spécifique.



C. Precipitation techniques in fluid phase

Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.

Les complexes immuns dispersent les rayons laser passant par la cuve. Les rayons dispersés sont focalisés par un système optique vers un photodétecteur qui mesure la diffusion de la lumière sous un angle différent de zéro par rapport à l'axe de propagation de la lumière incidente. La concentration de l'Ag est déterminée selon une courbe d'étalonnage préétablie avec des solutions d'Ag de concentrations croissantes connues. Le test est peu sensible (seuil 0,5mg/ml). Une variante permet de baisser le seuil de détection en utilisant des microparticules (latex, par exemple) sur lesquelles sont fixés des Ac (dosage des IgE).

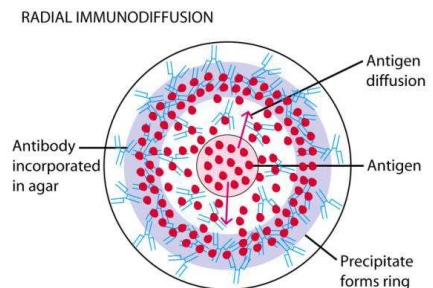
4. Précipitation en milieu gélifié :

Elle permet l'analyse qualitative de mélanges d'Ag, on parle d'*immunodosage* d'un Ag. Les solutions d'Ag et d'Ac diffusent dans le milieu gélifié à partir de réservoirs en formant des gradients réguliers de concentrations décroissantes. A l'équivalence, il y a précipitation du complexe Ag-Ac, le précipité retenu dans les mailles du gel sera lavé et éventuellement coloré. Les gels les plus usuels sont la gélose (polyosides d'algue marine), l'agarose ou le gel de polyacrylamide.

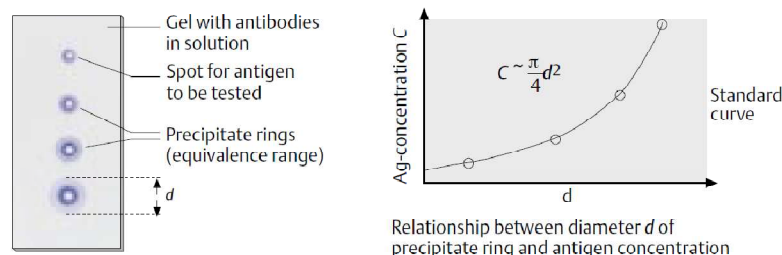
a. Immunodiffusion simple : Ac inclus dans la gélose à concentration constante

- Immunodiffusion radiale : *Technique de MANCINI*.

L'immunodiffusion radiale simple (Mancini) permet de quantifier les Ag. La solution d'Ag à doser est déposée dans des puits creusés dans un gel contenant l'Ac. Les Ag diffusent de façon radiale dans le gel et forment des anneaux de précipitation quand les concentrations relatives des deux éléments sont proches du point d'équivalence. La surface du disque est proportionnelle à la concentration en Ac.



Dans la méthode de Mancini, la concentration de l'Ag est proportionnelle au carré du diamètre de l'anneau de précipitation. Elle est déterminée par référence à la courbe de calibrage obtenue avec des standards. La concentration en Ac d'une solution peut également être mesurée, de la même manière, en utilisant un gel contenant l'Ag à concentration constante.

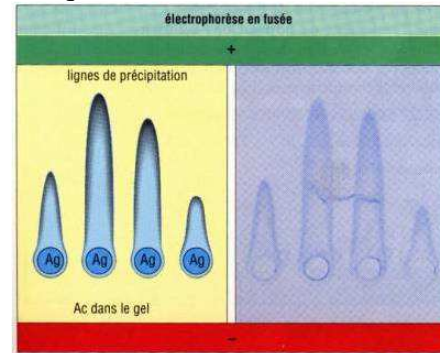


D. Simple radial immunodiffusion (RID) according to Mancini

Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.

- Electro-immunodiffusion : *Electrophorèse en fusée* (Technique de LAURELL).

Cette technique permet d'accélérer le temps de diffusion en obligeant l'Ag à migrer sous l'effet d'un champ électrique, dans un gel contenant l'Ac. Le pH du gel est choisi de façon à ce que les Ac soient immobiles (pHi des Ig) et que l'Ag chargé négativement migre (blocage des NH₂ ; carbamylation, formylation).



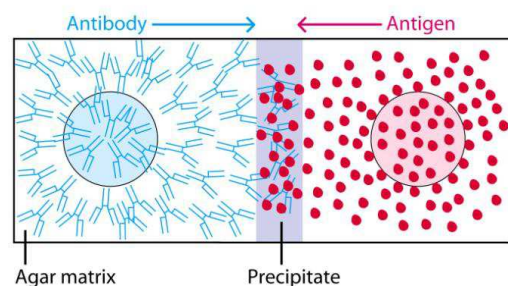
http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%2024.htm

b. Double immunodiffusion :

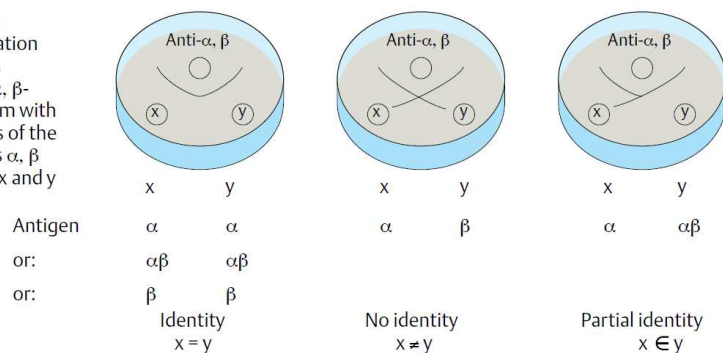
- Diffusion spontanée : Technique d'OUCHTERLONY.

Dans cette technique, l'Ag et l'Ac diffusent dans un gel d'agarose aqueux. Dans les zones de réaction entre l'Ag et l'Ac, des arcs de précipitation sont formés qui peuvent être colorés. Cette méthode est particulièrement adaptée à la détection d'Ag inconnus, qui peut être fondée sur le principe de symétrie des profils de précipitation. En cas de similarité de deux Ag, les arcs de précipitation fusionnent alors qu'elles se croisent pour deux Ag différents ; en cas de similarité partielle, on observe la formation d'un «épéron».

DOUBLE IMMUNODIFFUSION



Possible precipitation patterns of anti- α , β -antiserum with mixtures of the antigens α , β in spots x and y

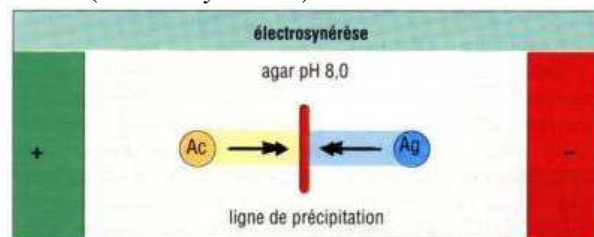


A. Radial double diffusion (Ouchterlony)

Burmester, Color Atlas of Immunology
© 2003 Thieme.

- Diffusion non spontanée : Electro-immunodiffusion (*Electrosynérèse*).

L'électrosynérèse est une électrophorèse à contre-courant qui utilise un champ électrique pour forcer Ag et Ac à migrer l'un vers l'autre. C'est une technique plus sensible que l'immunodiffusion double. Les conditions doivent être telles que les charges des Ac et des Ag soient de sens contraire (à un pH donné, par exemple).



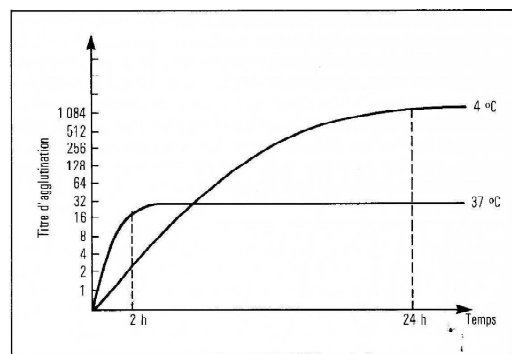
http://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%2024.htm

L'Ag et l'Ac possédant des charges différentes, ils migrent en sens opposé dans un champ électrique. Si le sérum du patient analysé contient des Ac contre l'Ag évalué, des complexes immuns se forment au point de rencontre. Ces complexes sont détectables sous forme de lignes de précipitation colorées.

III. Agglutination immunologique :

L'agglutination immunologique est une union en amas de particules à la suite d'une interaction Ag-Ac (suspension homogène de particules, puis agrégats visibles à l'œil nu). La seule restriction est que l'Ag doit être particulaire, et qu'une relation entre l'agglutinabilité et la densité en sites antigéniques existe. Les Ac agglutinants sont surtout les IgM (10 à 100 fois plus que les IgG). Ces Ac dits agglutinants (IgM en majorité) sont capables de produire une agglutination des particules en suspension dans un milieu salin de $[NaCl] = 0,15\text{ M}$. Les Ac dits non-agglutinants sont incapables de provoquer une agglutination dans ces conditions.

Aussi, des facteurs expérimentaux tels que la température, le pH (6 à 8) et la force ionique peuvent influencer sur l'importance de l'agglutination immunologique. La température, plus elle est élevée plus l'agitation moléculaire est importante et l'agglutination est plus rapide (37°) ; cependant, la quantité finale d'Ac fixés est plus élevée à basse température (après 24 h). On distingue alors des Ac "chauds" et des Ac "froids". La force ionique, quant à elle, contrarie l'union Ag-Ac, mais favorise la formation du réseau.



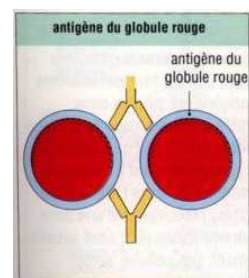
1. Hémagglutination :

L'hémagglutination repose sur la capacité de l'Ac à agréger les GR grâce à la présence d'Ag à leur surface. Elle est utilisée pour la détection d'Ac agglutinant dans le sérum de patients. Les Ac complets (naturels) sont des IgM qui se lient sous forme de pentamères aux déterminants antigéniques des érythrocytes et peuvent les agglutiner. On les qualifie de «complets» puisque leur structure pentamérique leur permet d'agglutiner en l'absence de facteurs supplémentaires. Les Ac contre les groupes sanguins ABO appartiennent à ce groupe.

On trouve aussi des Ac incomplets (IgG). Ces Ac se lient aux déterminants antigéniques des érythrocytes mais ne peuvent pas former un pont entre deux cellules. En revanche, une hémagglutination devient possible si l'écart entre les érythrocytes est diminué par l'ajout de supplément (albumine) ou d'une solution de faible concentration ionique ; les IgG (incomplets) peuvent alors faire le pont entre deux cellules.

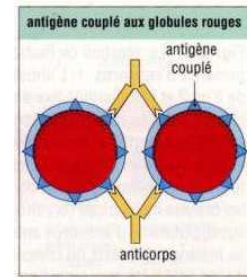
2. Agglutination directe :

L'Ag est situé sur la face externe de la particule, sur une membrane cellulaire ou bactérienne, directement accessible par l'Ac. L'agglutination directe est utilisée, par exemple, pour la détermination des groupes sanguins ou le typage des bactéries comme les salmonelles. L'agglutination de bactéries peut être utilisée pour la détection d'Ac (*réaction de Widal*) où des suspensions de bactéries (Ag) sont incubées avec une dilution sérielle du sérum de patient. Dans le cas d'une agglutination, le sérum contient un Ac spécifique de l'Ag. Elle peut aussi servir pour détecter des Ag et typer des bactéries (*réaction de Gruber*) : incubation de cultures de bactéries avec des Ac spécifiques de classes ou types de bactéries.



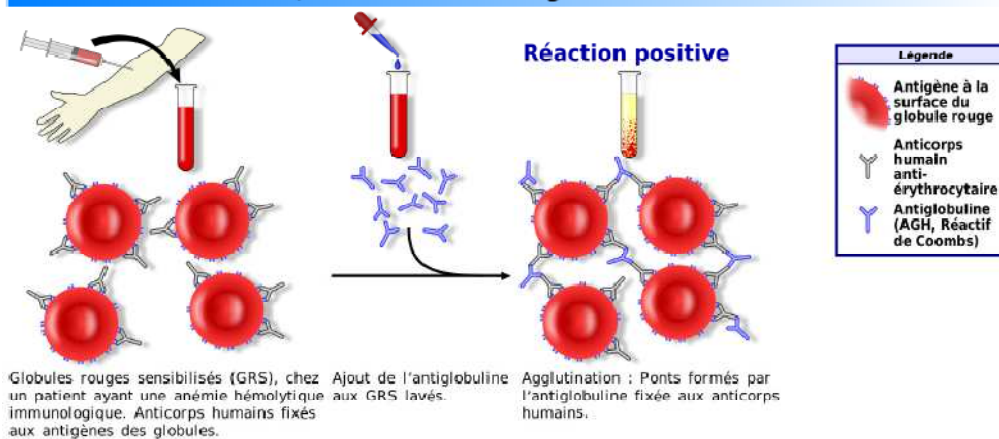
3. Agglutination artificielle :

Elle implique l'utilisation d'artifices techniques permettant de favoriser l'agglutination ou permettant la détection d'Ac non agglutinants. L'Ag est couplé à des substances macromoléculaires (albumine, polyvinylpyrrolidone, dextran), à des enzymes protéolytiques (papaïne, pepsine, broméline) ou à une antiglobuline laquelle permet de décélérer des Ac anti-GR non agglutinants.



- *Test de Coombs direct (test globulaire)*: Il s'agit de l'étude des hématies du patient pour rechercher une immunisation *in vivo* (Ac fixés sur les hématies). Le même mécanisme génère des maladies telles que la maladie hémolytique du nouveau-né ou la maladie hémolytique auto-immune ;

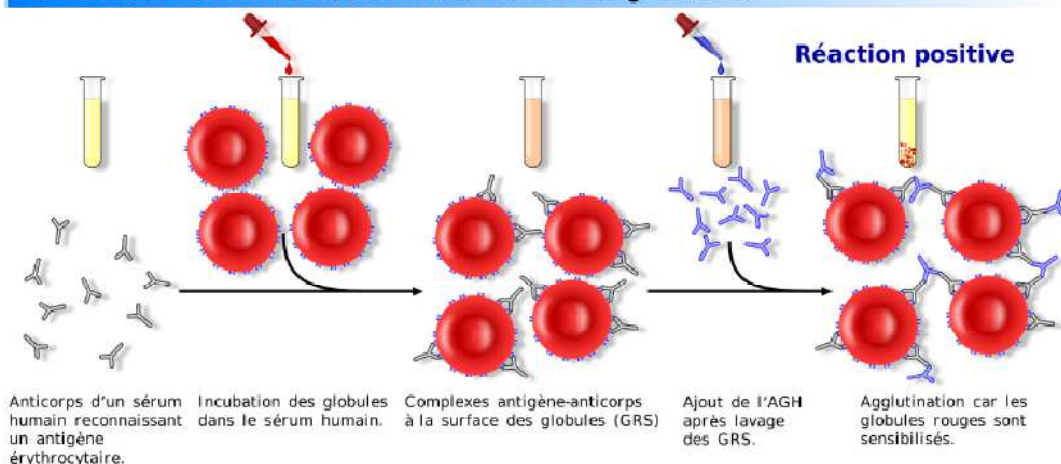
Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline



http://wikige.wikia.com/wiki/Gestes_techniques_6:_Transfusion

- *Test de Coombs indirect (test sérique)* : Il s'agit de la détection d'Ac libres anti-GR dans le sérum du patient. On procède à un contact du sérum avec un panel de GR à 37°, puis, après lavage, une antiglobuline est additionnée pour induire une agglutination. Dans le cas où la réaction est positive, une recherche d'agglutinines irrégulières est engagée.

Test de Coombs indirect / Test indirect à l'antiglobuline

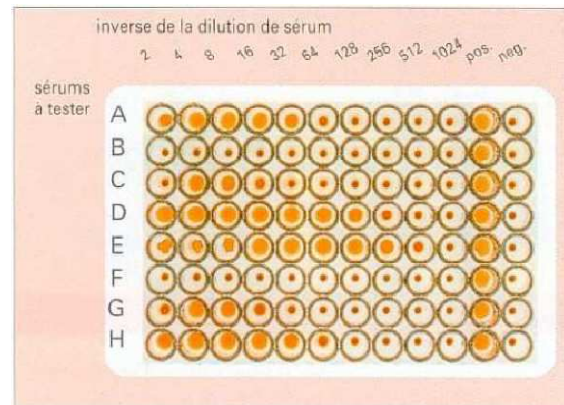


http://wikige.wikia.com/wiki/Gestes_techniques_6:_Transfusion

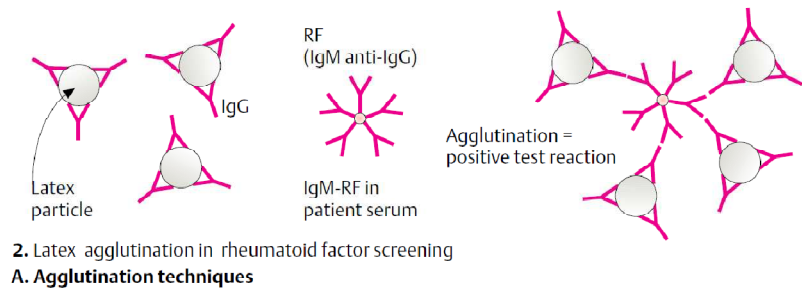
4. Agglutination passive :

L'Ag soluble est fixé sur une particule neutre servant uniquement de support qui peut être soit des hématies (humaines groupe O, mouton, dinde : hémagglutination passive de Boyden) formolées pour surveiller leur stabilité pendant plusieurs mois à 4°C, soit des particules de latex (inertes et calibrées). Selon les particules et l'Ag à fixer, la fixation de l'Ag sur les particules se fait par simple contact, par fixation chimique ou fixation immunologique. Il existe plusieurs modalités techniques des réactions d'agglutination telles que la réaction sur lame, en tubes ou en microplaque.

Hémagglutination passive de Boyden : L'Ac est dilué dans des puits d'une microplaque auxquels les érythrocytes sont ajoutés. Si l'Ac est présent, les cellules sont agglutinées et apparaissent comme un tapis au fond du puits. S'il n'y a pas d'Ac, elles roulent sur la pente douce du puits pour former un culot. L'illustration montre huit titrations dans des plaques en «U». Les titrations sont faites en utilisant des micropipettes.
http://lvt.s.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immunologie/chapitre%2024.htm.



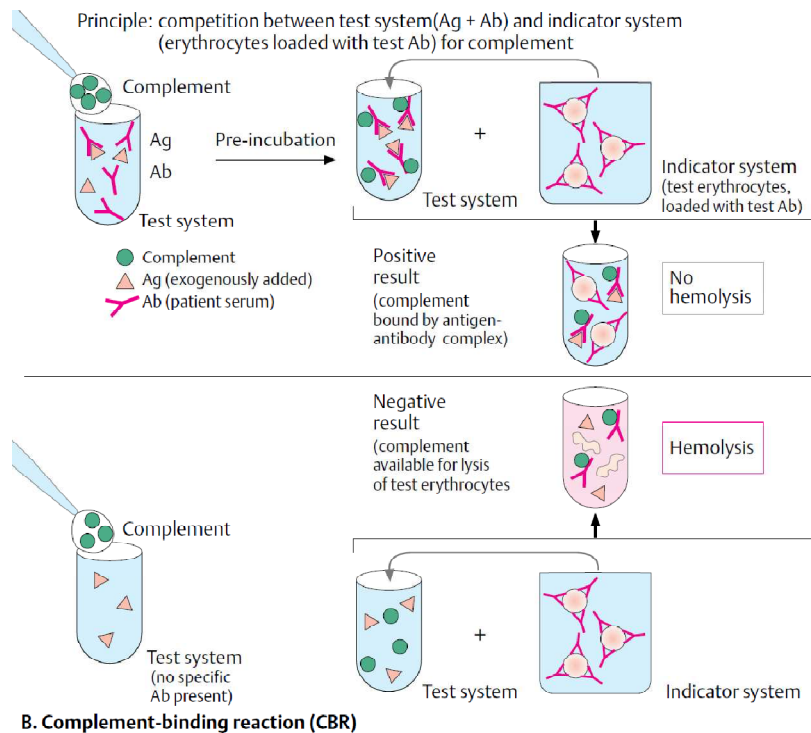
Agglutination au latex : L'Ag reconnu par les Ac recherchés est fixé à des particules de latex. Dans l'exemple ici, l'IgG est liée aux particules de latex. Si le sérum analysé contient le facteur rhumatoïde (FR) (= IgM-anti-IgG), les particules sont agglutinées (test positif). Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.



IV. Techniques utilisant le complément : Réaction de fixation du complément (RFC).

1. Principe :

Détection d'Ac dans le sérum ou dans le liquide céphalo-rachidien de patients par la fixation et l'activation du complément par des complexes Ag-Ac. Dans le sérum du patient sont ajoutés l'Ag correspondant à l'Ac recherché et du complément. Si cet Ac est présent dans le sérum, il y aura formation de complexes immuns (Ag-Ac) et la fixation du complément sur ces complexes. On ajoute ensuite des érythrocytes chargés d'Ac (GR sensibilisés par des Ac) : 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. La quantité d'hémoglobine libérée après hémolyse peut être évaluée grâce à une lecture photométrique puisqu'il existe une relation entre le degré d'hémolyse et la quantité de complément présent dans le liquide.



Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.

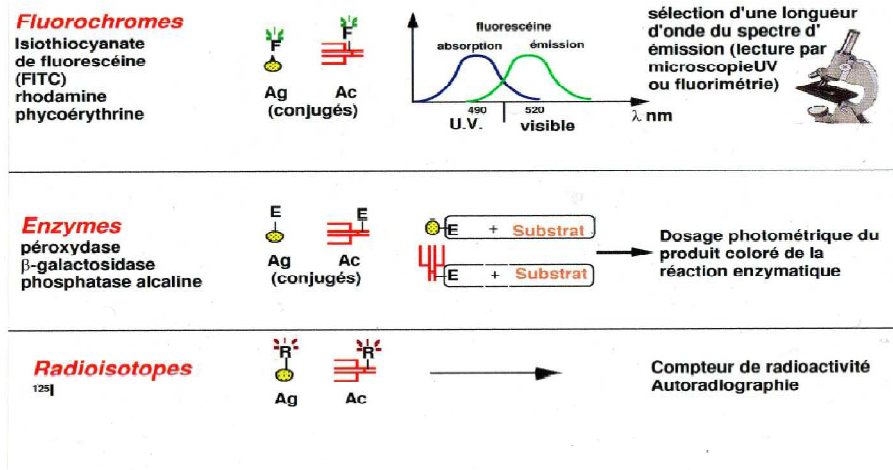
2. Applications :

- Sérodiagnostics d'infections bactériennes, virales, parasitaires par recherche et titrage d'Ac spécifiques présents à des concentrations inférieures à 1 µg/ml ;
- Détection des Ag d'histocompatibilité de classe I et II (groupage HLA) par la réaction de *microlymphocytotoxicité* (Complement-dependent cytotoxicity test, CDC test) :
 - les lymphocytes sont mis en contact avec une "batterie" d'Ac anti-HLA de spécificité connue, pré-déposés dans les puits d'une microplaque,
 - après incubation, on ajoute du sérum de lapin (= source de complément),
 - les lymphocytes sont lysés dans les puits où les Ac se sont fixés sur les Ag HLA (visualisée par la pénétration d'un colorant normalement exclu des cellules vivantes).

TD N°4 : TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES DITES DE MARQUAGE

La réaction Ag-Ac est rendue visible par un marquage préalable de l'Ag, de l'Ac ou d'une anti-globuline (anti-Ig ou anti-complément). Différents marqueurs sont utilisés :

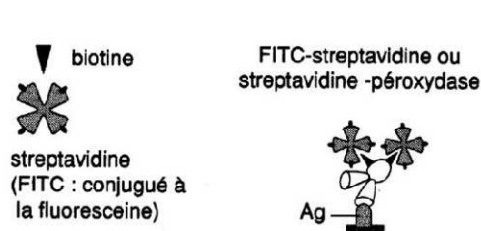
- corps fluorescents : immunofluorescence,
- enzymes : immuno-enzymologie,
- éléments radioactifs (radio-éléments) : radio-immunologie (RIA).



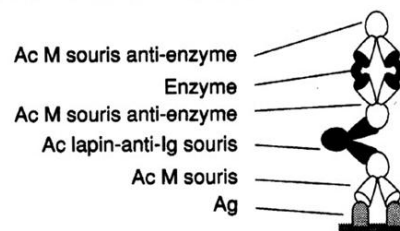
Marquage des antigènes et des anticorps

Dans ces réactions utilisant un marquage, le problème est de pouvoir distinguer le corps marqué qui a réagi dans l'interaction Ag-Ac. Des systèmes d'amplification du signal sont alors utilisés pour augmenter la sensibilité des techniques immunologiques avec marquage tels que le système avidine-biotine (ABC) ou le système enzyme-anti-enzyme. La biotine (coenzyme facile à lier aux Ig) a une très forte affinité pour l'avidine (blanc d'œuf) et la streptavidine (*Streptomyces avidinii*).

2. Complexe biotine-streptavidine



3. Enzyme-anti-enzyme



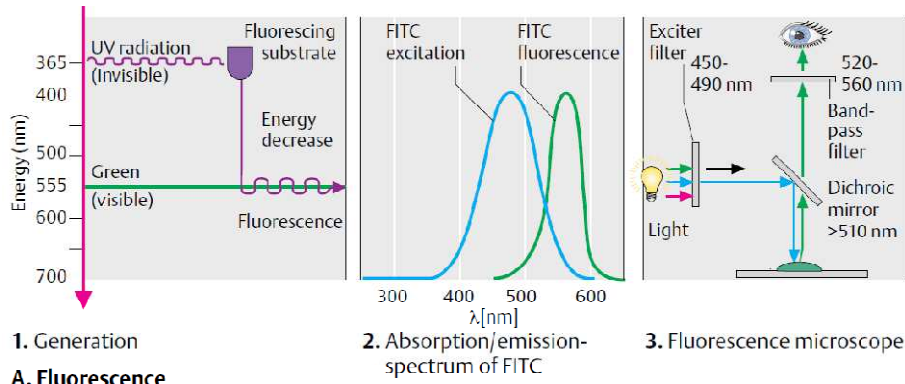
I. Immunofluorescence :

L'immunofluorescence est une méthode qui utilise un marquage par un corps fluorescent (conjugaison au fluorochrome) permettant d'identifier les Ag ou les Ac dirigés contre ces Ag ou encore un réactif réagissant avec le complexe Ag-Ac. Elle permet de déceler une réaction Ag-Ac sur des cellules en suspension, des frottis cellulaires, des microorganismes ou des coupes d'organe. La lecture de l'Ag ou de l'Ac marqué avec un fluorochrome se fait au microscope à fluorescence ou avec la cytomètre en flux. L'immunofluorescence est une technique très sensible (mg/mL-pg/mL).

1. Principes fondamentaux :

La fluorescence est un phénomène physique où l'absorption d'un rayonnement par une molécule se traduit par une émission d'une lumière de plus faible énergie. La matière

fluorescente n'absorbe qu'une partie de l'énergie du rayonnement, de sorte que la partie restante peut être émise avec une énergie plus faible, c'est-à-dire une longueur d'ondes plus élevée. Plusieurs fluorochromes sont utilisés tels que la fluorescéine (fluorescéine isothiocyanate, FITC), la rhodamine, la phycoérythrine, etc. qui nécessitent une microscopie à fluorescence.



La fluorescéine isothiocyanate (FITC) est le réactif le plus souvent utilisé ; la FITC est excitée par la lumière d'une longueur d'ondes entre 450 et 500 nm (bleu) et émet de la lumière fluorescente de plus faible énergie avec une longueur d'ondes entre 500 et 550 nm (jaune-vert). Les microscopes à fluorescence utilisent des filtres sélectifs qui ne laissent passer vers l'échantillon fluorescent que la lumière d'une longueur d'ondes choisie (par exemple 470 nm) ; inversement, un filtre dichromique et un filtre de bande passante ne dirigent vers l'observateur que la lumière d'une longueur d'ondes entre 520 et 550 nm. Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme

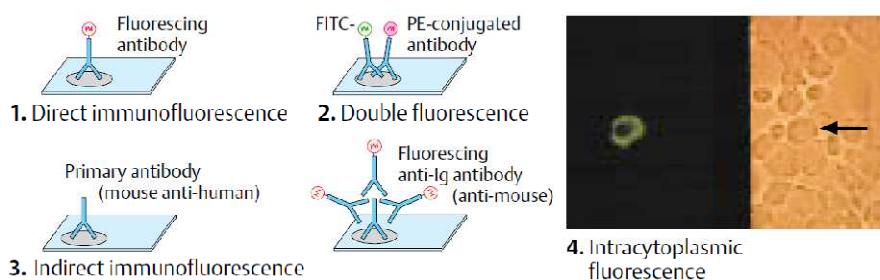
2. Méthodes :

a. Immunofluorescence directe :

L'Ac est couplé de manière covalente à une molécule fluorescente, puis incubé avec les cellules ou la section de tissu congelé (certains Ac peuvent se lier aux sections paraffinées). L'Ac se lie à l'Ag et il est visualisé par microscopie sous une lumière ultraviolette. L'immunofluorescence directe permet de détecter simultanément deux Ag ou plus.

b. Immunofluorescence indirecte :

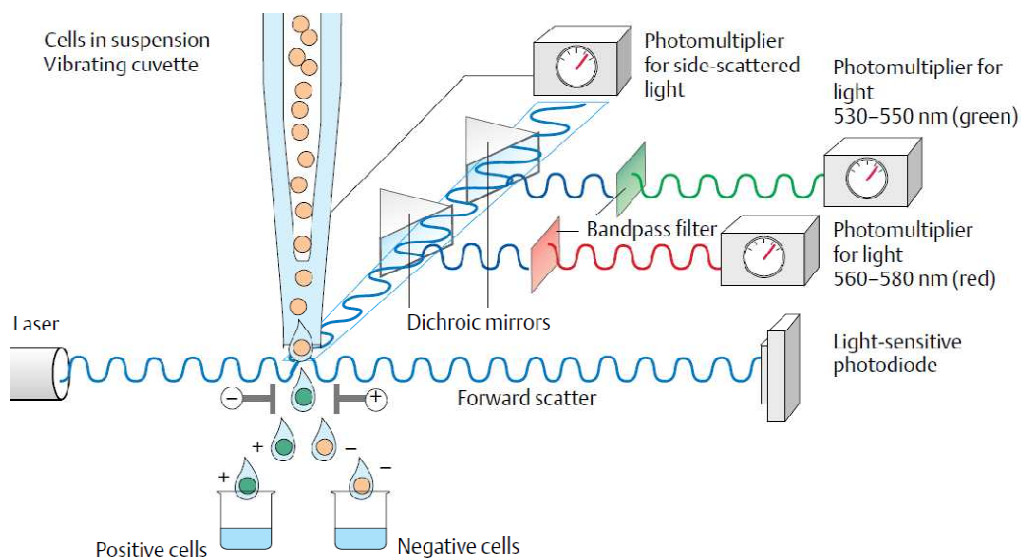
La section tissulaire ou les cellules en suspension (coupes d'organes, frottis de micro-organismes ou cellules, suspension de cellules) sont d'abord incubées avec l'Ac à analyser qui est, ensuite, visualisé (après lavage pour éliminer le premier réactif en excès) par l'addition d'un second Ac anti-Ig fluorescent. L'amplification due à ce second Ac augmente la sensibilité de l'essai. La membrane cellulaire peut être perméabilisée par fixation afin de permettre la détection d'Ag cytosoliques. Par ailleurs, l'utilisation de réactifs spécifiques d'une classe ou d'une sous-classe d'Ig permet d'identifier un isotype particulier dans l'Ac à analyser. Cette technique prend beaucoup d'intérêt pour l'identification des Ac dirigés contre des Ag tissulaires.



Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.

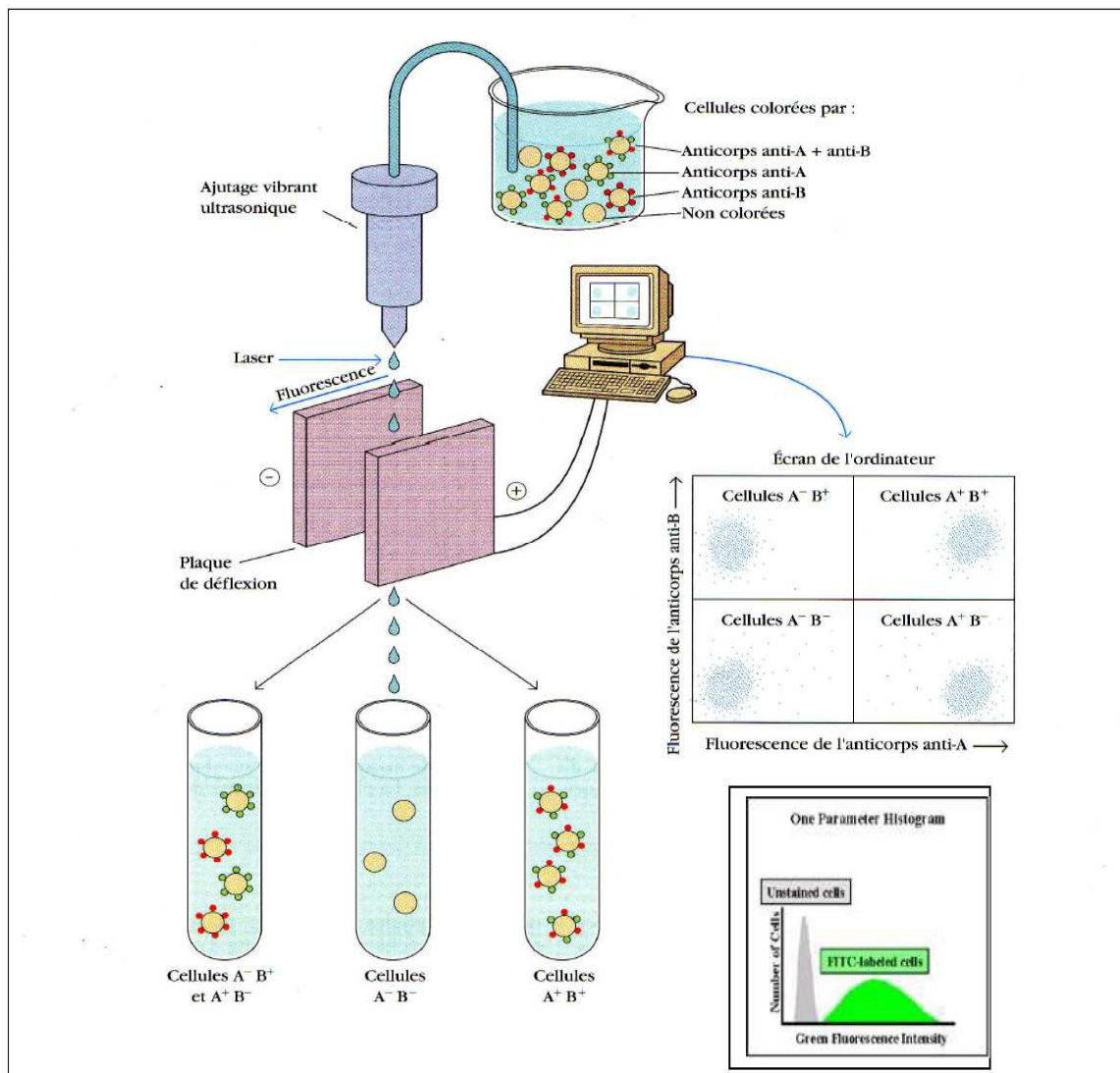
c. Cytométrie de flux :

La cytométrie de flux (CMF) est une technique permettant de faire défiler des particules à grande vitesse, entraînées par un flux liquide ou gazeux, dans le faisceau d'un laser sous forme de gouttes monocellulaires. La CMF permet la numération et la caractérisation de cellules exprimant des Ag au sein d'une suspension hétérogène. Les cellules de l'échantillon sont marquées avec des réactifs fluorescents qui se fixent spécifiquement à des molécules de la surface cellulaire (ex : anti-CD4, anti-CD8, etc.). C'est la lumière réémise (par fluorescence, par exemple) qui permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier. Un trieur cellulaire activé à la fluorescence (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) dispose d'un système pour donner des charges électriques aux gouttes contenant les cellules : les gouttes contenant une cellule fluorescente obtiennent une charge positive et celles sans fluorescence, une charge négative. Grâce à des filtres et des photomultiplicateurs, l'appareil enregistre l'intensité de fluorescence de chaque cellule passant devant la source laser. L'intensité de la fluorescence est assez bien corrélée à la densité de l'Ag à la surface cellulaire. La dispersion en avant de la lumière est corrélée à la taille des cellules, alors que la dispersion latérale (mesurée dans un angle de 90°) correspond à la granulosité et au rapport cytosol/noyau des cellules. Le flux cellulaire passe ensuite entre des plaques électriques de déviation : les cellules positives et négatives sont déviées en direction opposée et peuvent ainsi être récoltées séparément. Cette technique permet donc une analyse multiparamétrique en déterminant pour chaque cellule, la taille, la granulosité, l'intensité de fluorescence avec différents fluorochromes, elle permet d'obtenir des populations cellulaires d'une pureté de 99%.

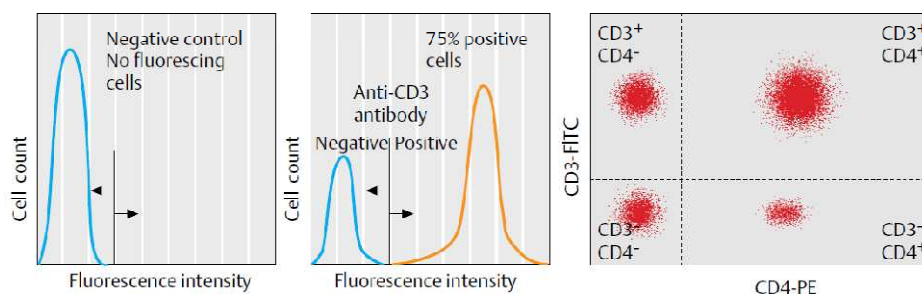


D. Cell separation by flow cytometry

Séparation cellulaire par cytométrie de flux : ❶ Les cellules sont immunomarquées et analysées une par une en défilant dans un flux hydrostatique à grande vitesse devant une source lumineuse : un laser. ❷ L'analyse de la dispersion de la lumière se fait par des photodiodes (en ligne "forward scatter, FSC" et latéralement "side scatter, SSC") et la fluorescence émise est capturée par les photomultiplicateurs. ❸ Récupération de la fluorescence issue d'un immunomarquage fluorescent préalable (*fluorescence activated cell sorting*, FACS).
Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme.



Les résultats de la CMF sont présentés sous la forme d'histogrammes. La méthode permet de se servir simultanément de plusieurs Ac dirigés contre des Ag différents et couplés à des fluorochromes différents, tels que la FITC et la phycoérythrine (PE). Ces deux réactifs sont excités par une lumière laser d'une longueur d'ondes de 588 nm, mais émettent des lumières fluorescentes de longueurs d'ondes différentes (lumière verte pour BTC, lumière rouge pour PE). Une telle analyse permet ainsi de distinguer, par exemple, les populations cellulaires exprimant les deux Ag (émettant de la lumière rouge ainsi que verte), de celles exprimant un seul des Ag (lumière rouge ou verte) et enfin de celles n'exprimaient aucun Ag.



1. Histograms

D. Flow cytometry: Histograms

2. Dot plot, two-color analysis

Burmester, *Color Atlas of Immunology* © 2003
Thieme.

II. Immuno-enzymologie et radio-immunologie :

1. Principe :

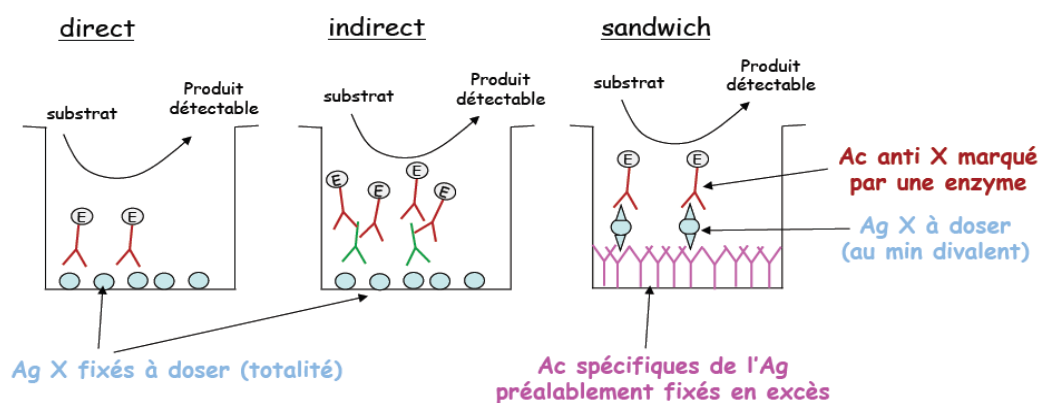
Ce sont des techniques immunologiques qui mettent à profit le signal émis par les molécules marquées par une enzyme (*ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ou un radio-isotope (*RIA = Radio Immuno Assay*). Elles sont utilisées pour la mise en évidence et le dosage de substances présentes en très faibles quantités dans les milieux complexes (liquides biologiques, coupes de tissus, cellules, etc.) en associant l'utilisation de la spécificité très stricte de la combinaison Ag-Ac mise en jeu dans la réaction et l'introduction d'un signal très sensible marquant cette combinaison.

Concernant l'immuno-enzymologie (ELISA), la révélation du complexe Ag-Ac marqué par l'enzyme (peroxydase de raifort, phosphatase alcaline ou bêtagalactosidase d'E. coli, etc.) est réalisée par une mise en présence du substrat spécifique de cette enzyme dont le produit de la réaction est mesuré par spectrophotométrie ou par colorimétrie, alors que pour la radio-immunologie (RIA), la révélation du complexe Ag-Ac radioactif (marqué à l' ^{125}I , rayonnement γ ou β , par exemple) se fait par un compteur.

Des marqueurs luminescents qui émettent de la lumière après une excitation photonique de longueur d'onde appropriée peuvent également être utilisés (fluorescéine, rhodamine, etc.).

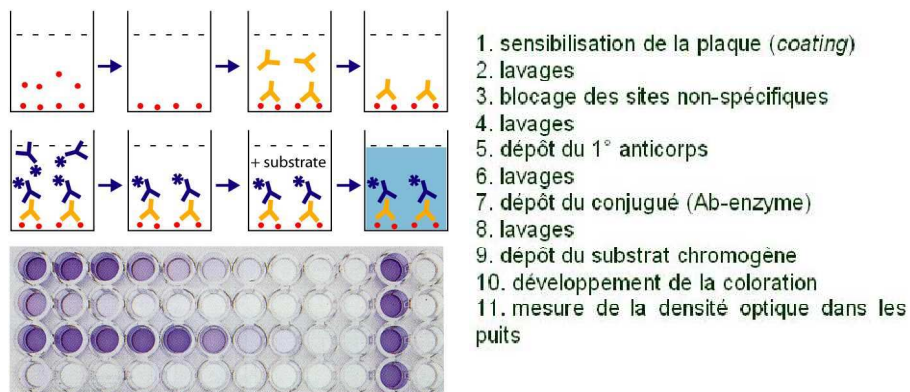
2. ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

Le test immuno-enzymatique d'ELISA est une méthode analytique quantitative où l'Ag ou l'Ac porte un marqueur enzymatique. Un support solide (en général une plaque de microtitration) est recouvert avec l'Ag reconnu par l'Ac recherché. Si le matériel à analyser (par exemple, du sérum) contient ces Ac, il se lie à l'Ag (ELISA direct). Dans une deuxième étape du test, un Ac secondaire, marqué par une enzyme, se lie aux Ac recherchés. Puis, l'enzyme transforme un substrat non coloré en un substrat coloré. À l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue avec un réactif standard, la concentration d'Ac correspondant à la quantité de substrat coloré produite peut être calculée grâce à une lecture au spectrophotomètre. Il s'agit d'une technique très sensible (pg/mL) dont il existe des variantes (ELISA indirect, sandwich, compétitive, ELISPOT, etc.).



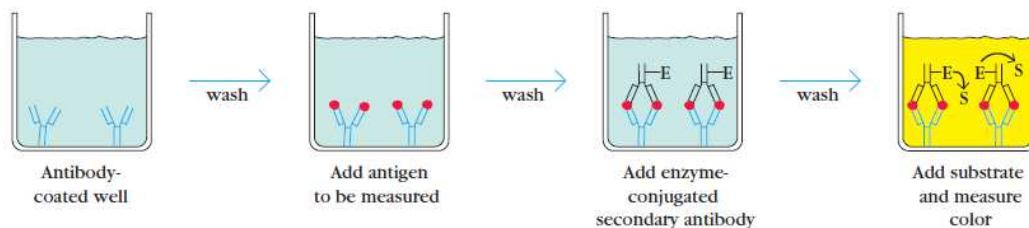
a. Analyse par méthode indirecte (ELISA indirect) :

L'ELISA indirect permet le dosage d'Ac. L'échantillon contenant l'Ac primaire (Ac1) est déposé dans un puits où est adsorbé l'Ag (*coating*), avec lequel il réagit ; après lavage, la présence de l'Ac1 est détectée en ajoutant un Ac secondaire (Ac2) anti-isotype conjugué à une enzyme. L'Ac2 libre est éliminé par lavage, et un substrat de l'enzyme est ajouté. La quantité de produit coloré est mesurée par un lecteur spectrophotométrique approprié.



b. Analyse immunométrique (ELISA sandwich) :

Cette analyse est basée sur un protocole dit "sandwich" ou "à deux sites". La réaction sera totale (et non à l'équilibre). Lors de la détection d'un Ag par ELISA sandwich, un Ac reconnaissant l'Ag recherché est fixé au support solide. La quantité de l'Ag contenue dans l'échantillon analysé est déterminée par l'ajout d'un Ac secondaire qui, en fixant l'Ag, complète la formation d'un «sandwich». Après des lavages, le signal fixé est mesuré, il est proportionnel à la concentration d'Ag à doser par référence à une courbe d'étalonnage.

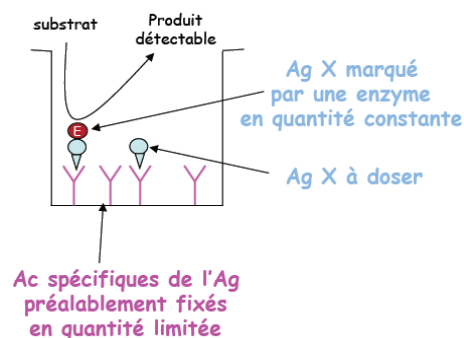


Kuby Immunology, 7th edition, W.H. Freeman and Company, 2013.

c. Analyse par compétition (ELISA compétitif) :

Un liquide biologique contenant une substance X à doser qui constitue l'Ag "froid" (Ag^o) en quantité inconnue et un traceur constitué de l'Ag marqué (Ag^*) identique à l'Ag X à doser, en quantité fixe et très faible, sont ajoutés à de l'Ac spécifique anti-X en quantité connue fixé sur un support solide. Une compétition s'établit entre l'Ag marqué et l'Ag non marqué à doser : les complexes Ag^o -Ac et Ag^* -Ac se forment selon la loi d'action de masse. Un lavage permet d'éliminer les réactifs non fixés et de séparer la phase libre et liée du marqueur. Une mesure du signal final fixé sur le support qui est l'inverse de la quantité d'Ag à doser est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage.

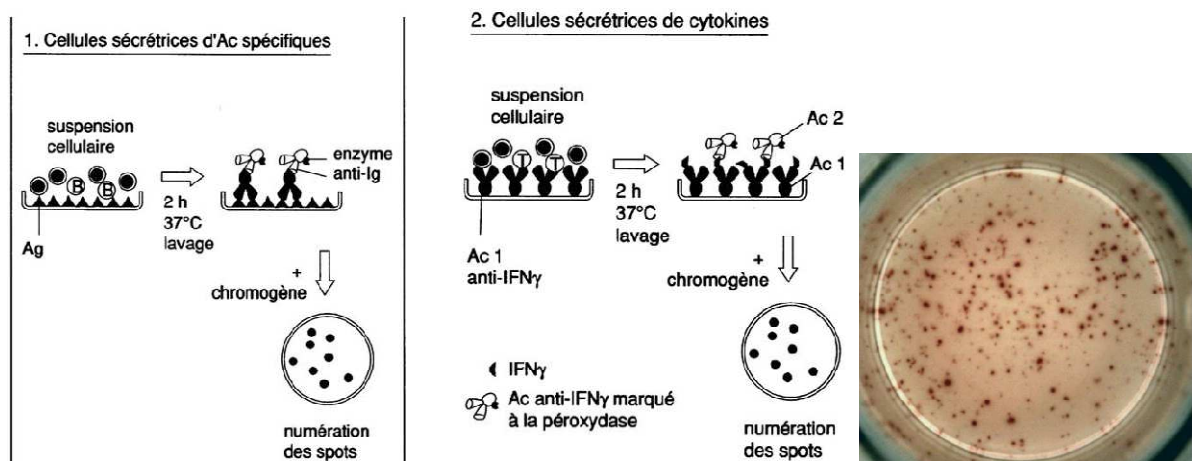
compétition



d. Dosage ELISPOT :

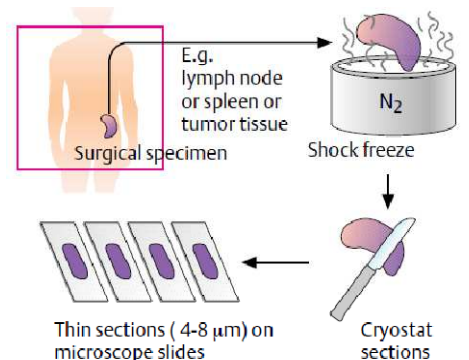
ELISPOT (*enzyme-linked immunospot*) est un test immunologique basé sur la technique ELISA. Son principe consiste à capturer la sécrétion de molécules par des cellules (Ac ou cytokines) sur un support solide sensibilisé. Après élimination des cellules, le complexe immunitaire est révélé par une méthode ELISA utilisant un substrat chromogène insoluble, dont la précipitation localisée génère des taches colorées ou *immunospots*.

Le dosage ELISPOT, grâce à sa haute sensibilité, sa reproductibilité et sa simplicité, reste la technologie de référence pour la mesure des réponses spécifiques des lymphocytes T avec des applications dans de multiples domaines de recherche (développement de vaccins, maladies infectieuses, allergies, tumeurs et maladies auto-immunes).

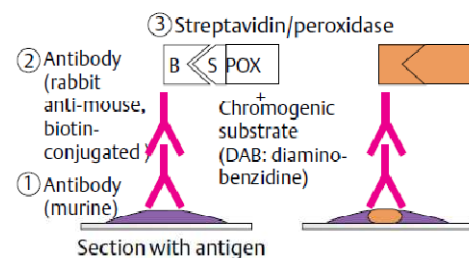


3. Colorations immunohistologiques :

Les échantillons de tissus destinés à l'évaluation histologique sont en général fixés dans du formol. Néanmoins, cette procédure altérant les déterminants antigéniques de nombreuses structures cellulaires, on préfère les sections préparées au cryostat à partir d'échantillons congelés rapidement pour l'immunohistologie. Ces sections sont d'abord incubées pendant 20 à 30 minutes à 4 °C avec des Ac, majoritairement des Ac monoclonaux murins, spécifiques de l'Ag choisi ; après des étapes de lavage, l'incubation avec un Ac secondaire contre les Ig de souris a lieu. On se sert fréquemment d'Ac secondaires biotinylés, c'est-à-dire couplés à la biotine. La biotine possède une affinité extrêmement élevée pour la protéine streptavidine ; cette dernière est ajoutée sous forme d'un complexe associé à l'enzyme peroxydase, marquant ainsi l'Ag cible par cette enzyme. Après l'ajout d'un substrat chromogène tel que la diaminobenzidine (DAB) ou l'aminéthylcarbazole (AEC), une réaction colorante est déclenchée qui reflète précisément la distribution de l'Ag dans le tissu.



1. Preparation of samples



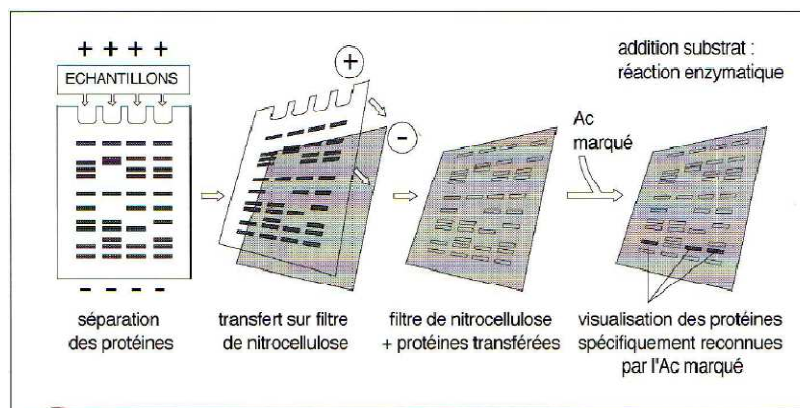
2. Biotin-avidin/peroxidase staining

Burmester, Color Atlas of Immunology © 2003 Thieme

4. Immuno-transfert ou Immuno-empreinte ou *Western-blot* :

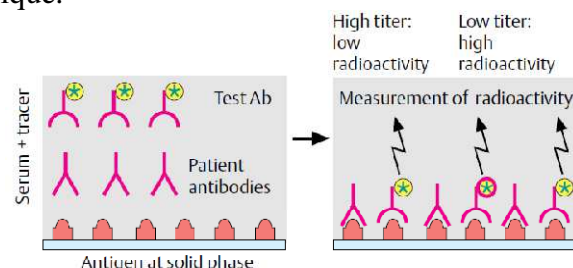
Le *Western-Blot* est également une technique immuno-enzymatique. Cette méthode permet de déterminer la masse moléculaire d'un Ag et de mettre en évidence dans un sérum des Ac dirigés contre différentes protéines (virales par exemple : application, Ac anti-VIH). Cette technique combine le pouvoir de séparation de l'électrophorèse et la grande sensibilité de l'immuno-détection, ce qui en fait un outil performant pour l'identification d'un Ag ou d'un Ac.

Dans un 1^{er} temps, une séparation électrophorétique des protéines en gel de polyacrylamide (dénaturant) est opérée (*sodium dodecyl sulfate-polycrylamide-gel electrophoresis*, SDS-PAGE). En présence de SDS (détergent anionique qui dénature les protéines en enveloppant la chaîne polypeptidique selon un ratio de masse de 1,4g SDS pour 1g protéine), toutes les protéines portent une charge électrique négative ; de plus, l'ajout du β -mercaptoéthanol ($\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) réduit les ponts disulfure à l'intérieur ou entre les protéines. Ainsi, les paramètres de charge et de forme n'influencent-ils plus sur la migration électrophorétique, et la séparation des protéines se fait uniquement selon leur poids moléculaire. Dans le gel, les protéines peuvent être colorées avec le bleu de Coomassie qui se lie à l'arginine (Arg, R), la tyrosine (Tyr, Y), le tryptophane (Trp, W), l'histidine (His, H) et la phénylalanine (Phe, F). Dans le cas du *Western-blot*, les protéines séparées sont transférées, dans un 2^{ème} temps, sur une feuille de nitrocellulose (membrane inerte = "*blot*") par capillarité ou *via* un champ électrique (image du gel, *blotting*) ; enfin, dans un 3^{ème} temps (révélation immunologique), des sérums contenant des Ac sont appliqués sur la nitrocellulose, après lavage, les Ac fixés sur les bandes protéiniques sont révélés par une anti-globuline marquée par une enzyme (on ajoute son substrat = réaction colorée) ou par un radioélément (autoradiographie).



5. Radio-immunoessai (RIA) : Test classique.

Le radio-immunoessai classique repose sur le principe d'une liaison compétitive. Dans le cas représenté, l'Ag reconnu par l'Ac recherché est fixé à la phase solide. Les Ac dans l'échantillon analysé et les Ac radiomarqués ajoutés entrent en compétition pour les déterminants antigéniques disponibles ; les Ac libres sont ensuite éliminés par un lavage. Plus il y a d'Ac dans le sérum, moins les Ac radiomarqués peuvent lier l'Ag.



Principle: antibody in patient serum competes with radioactively labeled test antibody

C. Radioimmunoassay (classical method)

Burmester, *Color Atlas of Immunology* © 2003 Thieme.

Une concentration élevée d'Ac dans le sérum donne donc un signal radioactif faible et *vice-versa*.

Méthodes	Exemples d'application	Sensibilité* (µg d'Ac/ml)
Immunodiffusion radiale de Mancini	Dosage des Ig sériques	20-200
Immunodiffusion d'Ouchterlony	Sérodiagnostics de l'échinococcose et de l'aspergillose	20-200
Immunoélectrophorèse	Profil électrophorétique des protéines sériques (albumine, globuline)	
Agglutination active directe	Groupage sanguin ABO	
Immunofluorescence directe	Localisation d'Ag cellulaires et tissulaires	1.0
Immunofluorescence indirecte	Sérodiagnostic de la toxoplasmose	1.0
Cytométrie de flux	Typage des leucémies ; Détermination du taux de lymphocyte T CD4 (SIDA)	0.006-0.06
ELISA	Dosage des Ac anti-VIH ; Détection des marqueurs de l'hépatite B ; Dosage de l'HCG urinaire : test de grossesse	≈ 0.0001-0.01
Western Blot	Test de confirmation d'une séropositivité au VIH	

* Kuby Immunology, 7th edition, W.H. Freeman and Company, 2013.