



Faculté de médecine



Les techniques en immunologie

Plan du cours

I- Généralités

II- Classification

III- Techniques d'immuno-précipitation

- 1- Techniques qualitatives
- 2- Techniques quantitatives
- 3- Electrophorèse des protéines

IV- Techniques d'agglutination

- 1- Agglutination directe
- 2- Agglutination indirecte
- 3- Inhibition de l'agglutination
- 4- Tests de Coombs



I. Généralités

I. Généralités :

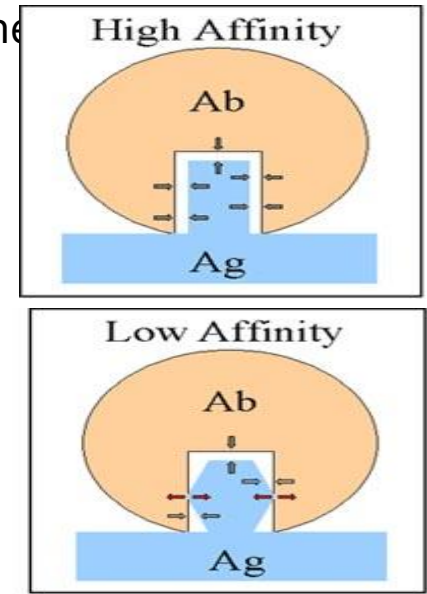
- ➔ Les techniques en immunologie sont basées sur l'interaction antigène-anticorps (Ag-Ac)
- ➔ Cette interaction est due à la reconnaissance **spécifique** (complément structure) et **de forte affinité** de l'anticorps pour l'antigène.

Les applications :

1. En immunologie :

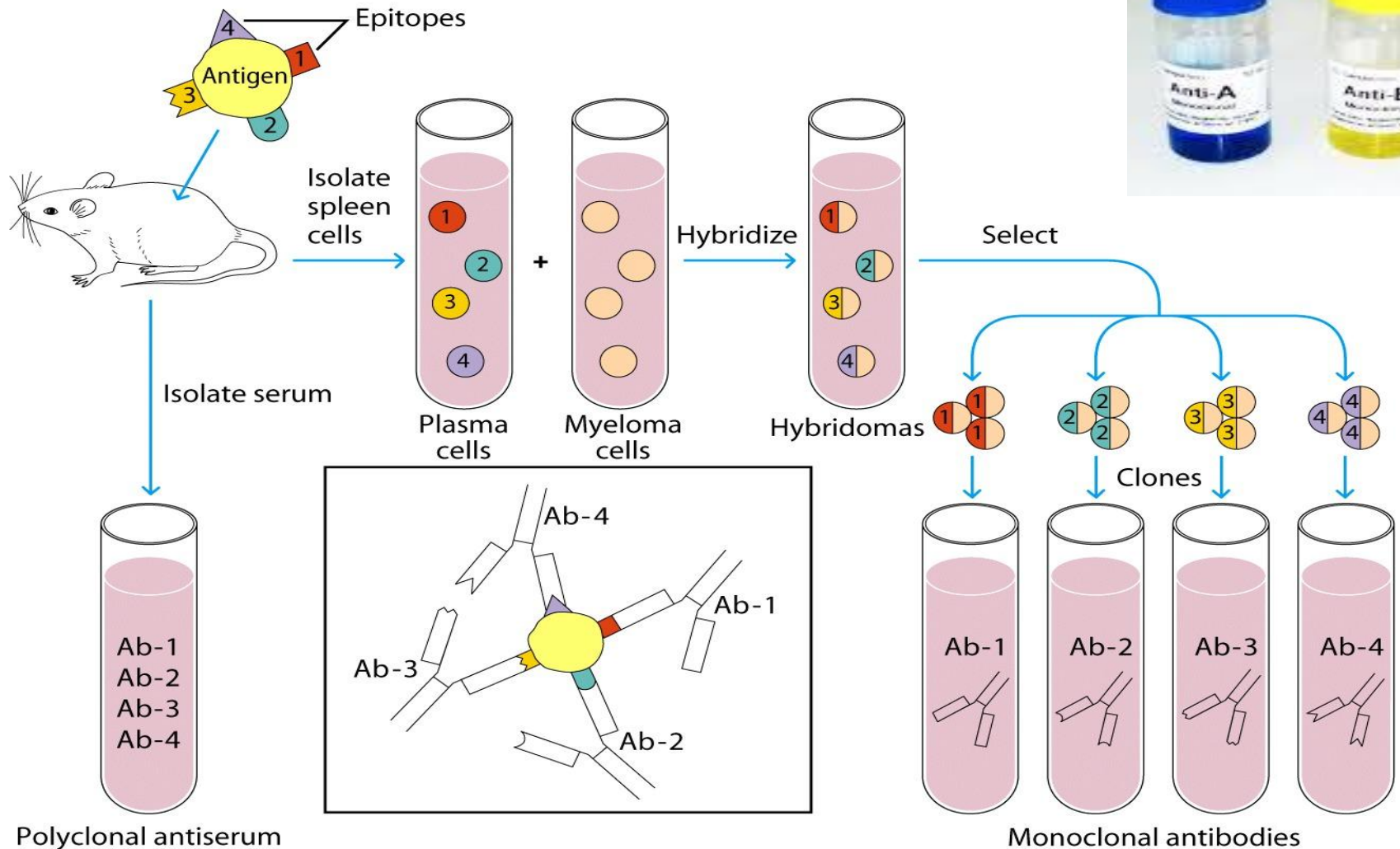
- Diagnostic et suivi d'une maladie auto-immune.
- Diagnostic sérologique d'une allergie.
- Exploration d'un déficit immunitaire inné ou adaptatif
- Bilan pré-greffe et suivi sérologique en post-greffe d'une transplantation
- Diagnostic et suivi d'une gammapathie monoclonale

2. Autres : Groupage ABO / Rhésus, diagnostic et suivi sérologique d'une infection , dosage d'une hormone ou d'un marqueur tumoral.....etc



I. Généralités :

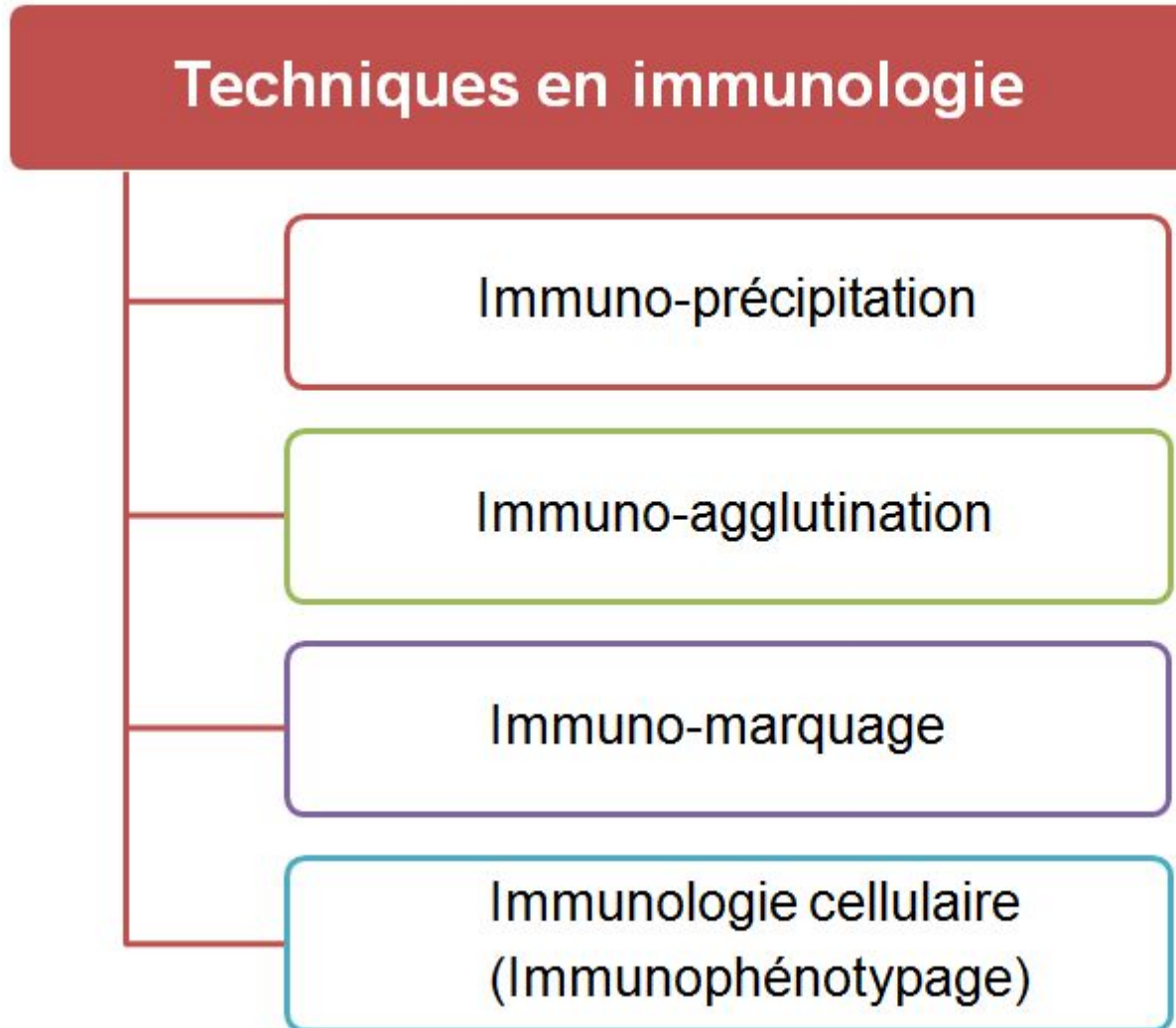
◆ Les anticorps monoclonaux :





II. Classification

II. Classification :



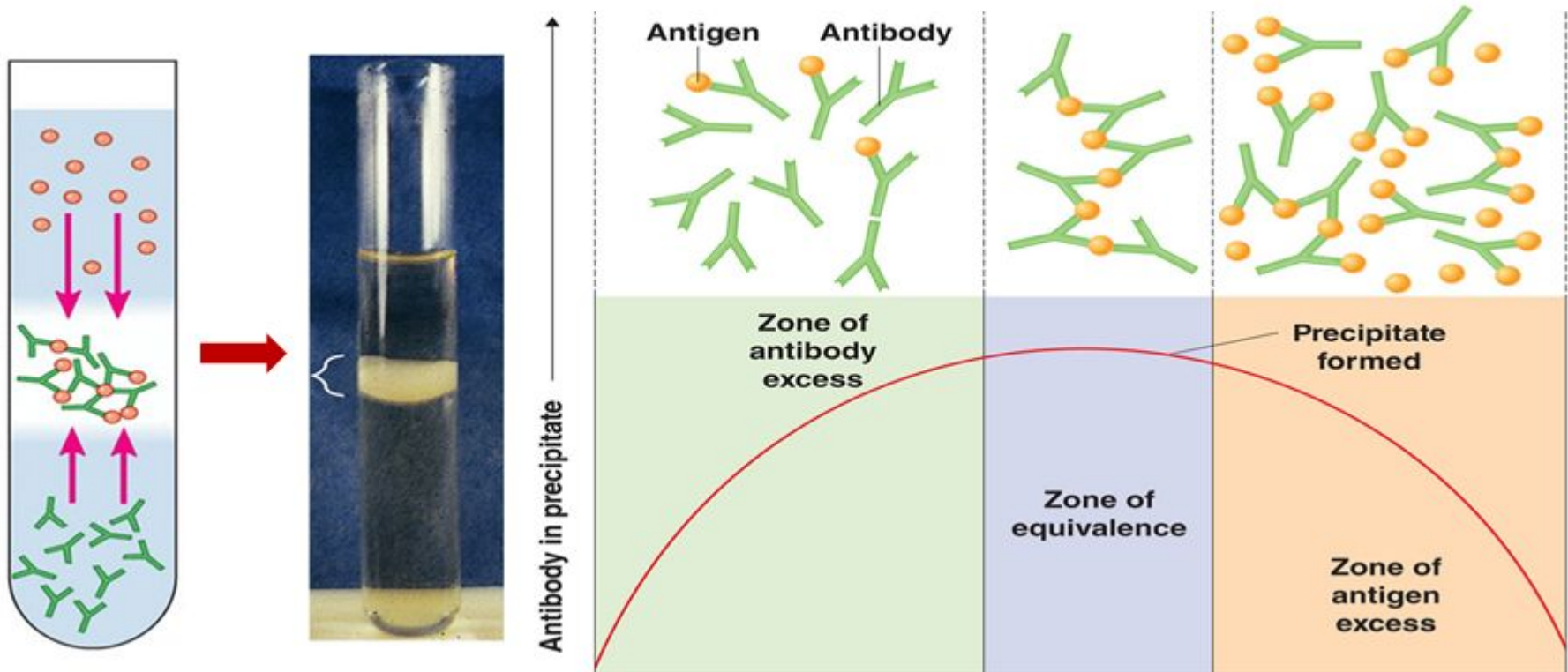


III. Immuno-précipitation

III- Immuno-précipitation :

a- Définition et principe :

- ➔ Technique caractérisée par la formation d'un précipité suite à la reconnaissance spécifique et interaction Ac-**Ag soluble (libre dans un liquide biologique)**
- ➔ Un précipité est la conséquence de la formation d'un **réseau** au niveau de **la zone d'équivalence**

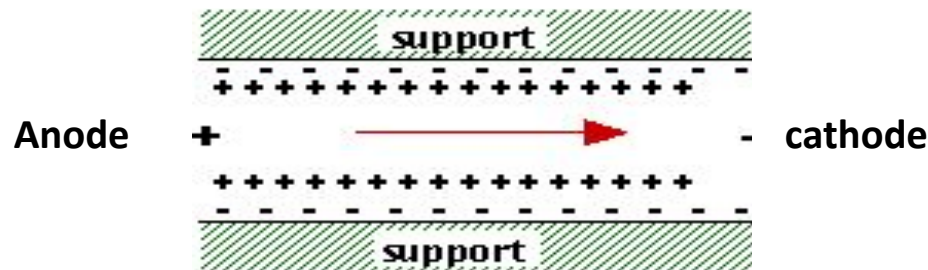


Notions de base :

- Technique **qualitative** : technique permettant la mise en évidence d'un antigène ou anticorps sans le quantifier
- Technique **quantitative** : technique permettant le dosage d'un antigène ou anticorps
- La charge électrique d'une protéine à PH **alcalin** est **négative**, en présence d'un champs électrique elle migre vers l'**anode** (positive)

Contre courant d'électro-endosmose :

- ➡ Certains support (gels ou capillaires) ont la capacité de créer un contre courant de l'anode vers la cathode (inversement au courant électrique)



- La réaction entre le l'échantillon (sérum ou plasma) et le réactif (contenant un antigène ou un anticorps connu) peut se faire en milieu **liquide** ou **solide**

III- Immuno-précipitation :

b- Classification :

- ➡ Se fait en se basant sur le caractère quantitatif ou qualitatif de la technique
- ➡ Ces techniques peuvent se réaliser sur u milieu liquide ou solide (gel), en présence ou en absence d'un champs électrique

Techniques qualitatives:

- Test de l'anneau (ring test)
- Immunodiffusion double
(Ouchterlony)
- Electrosynérèse

Techniques quantitatives:

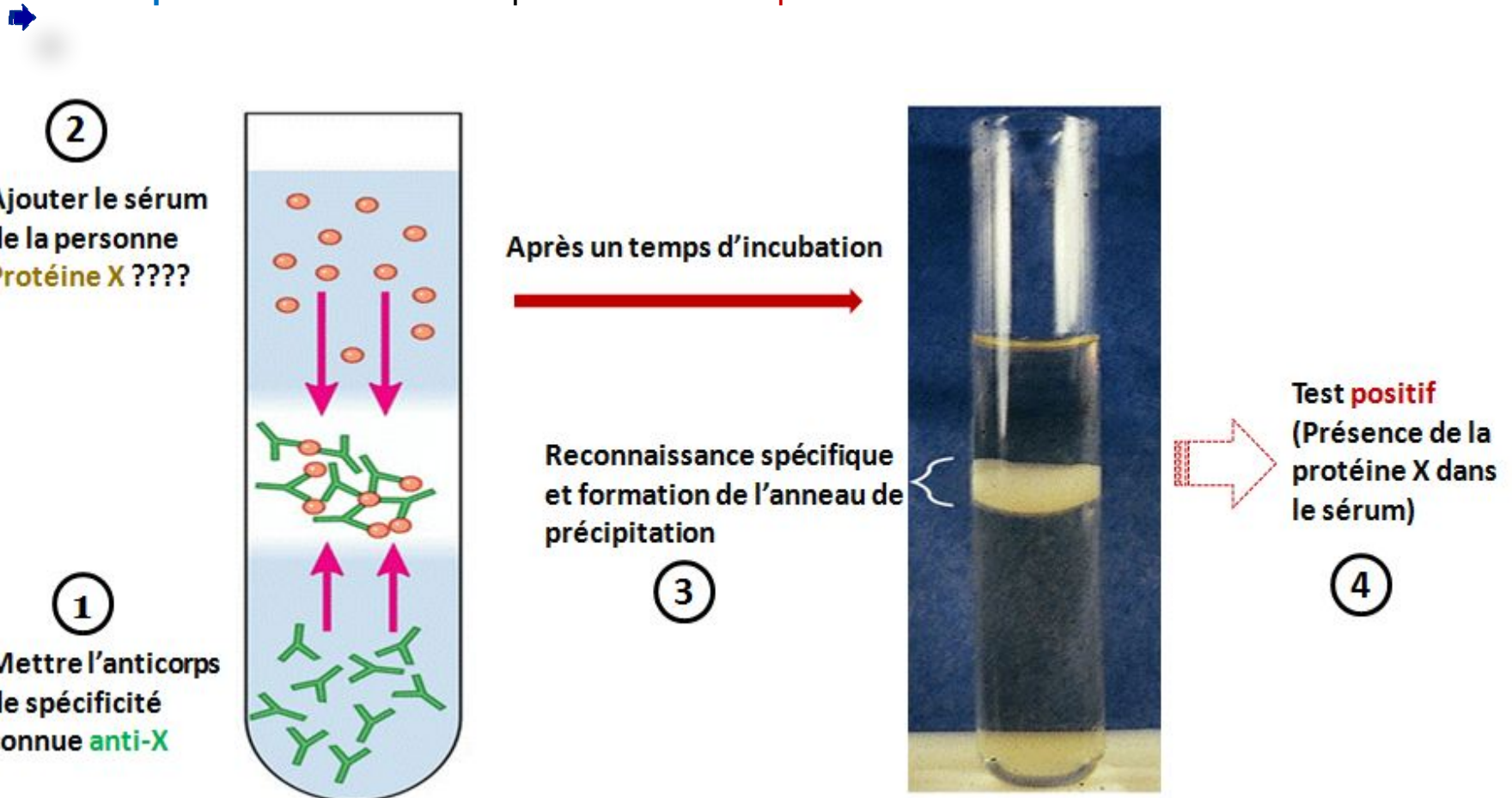
- Immunodiffusion radiale
(Mancini)
- Technique de Laurell
- Néphélométrie-Laser et
turbidimétrie

1. Techniques qualitatives:

a- Ring test (test de l'anneau) :

Technique d'immuno- précipitation en milieu liquide

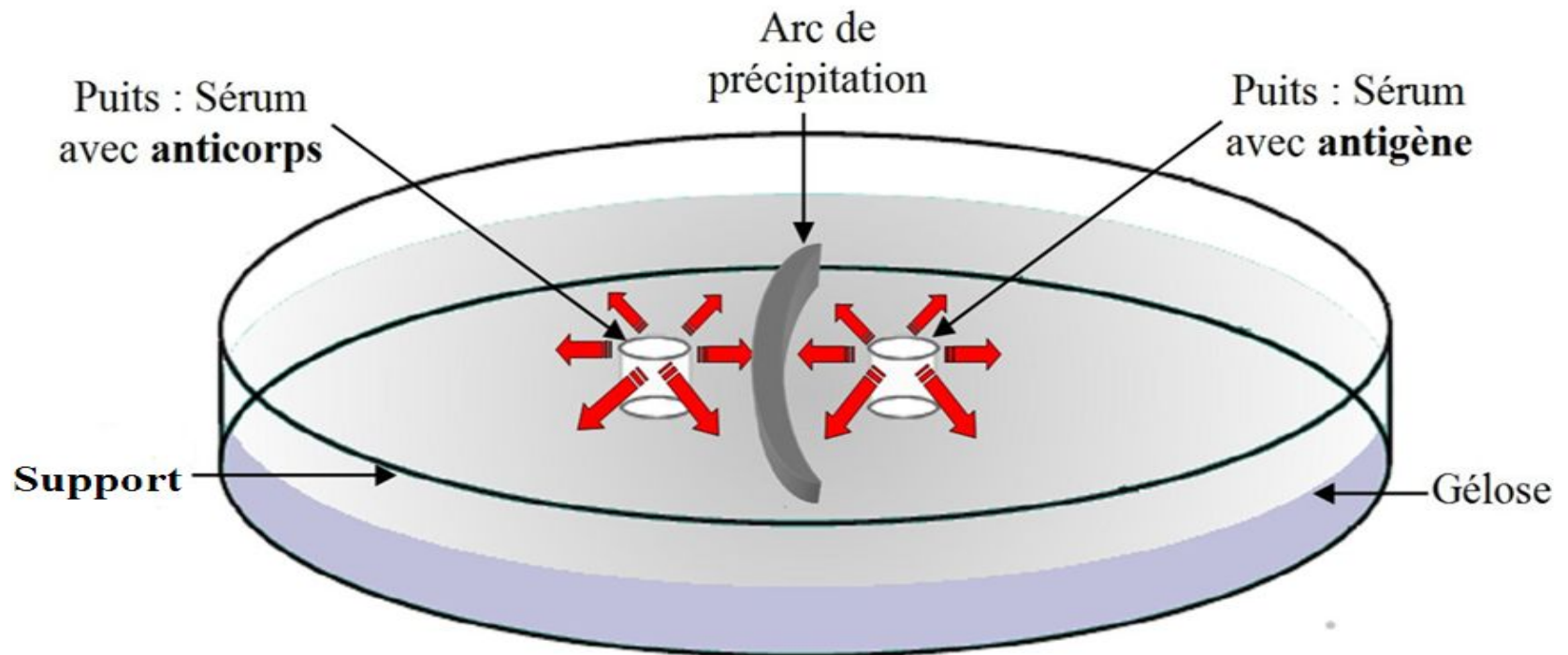
➡ **Exemple :** Recherche de la présence d'une **protéine x** dans le sérum



1. Techniques qualitatives:

b- Immunodiffusion double sur gel (Ouchterlony) :

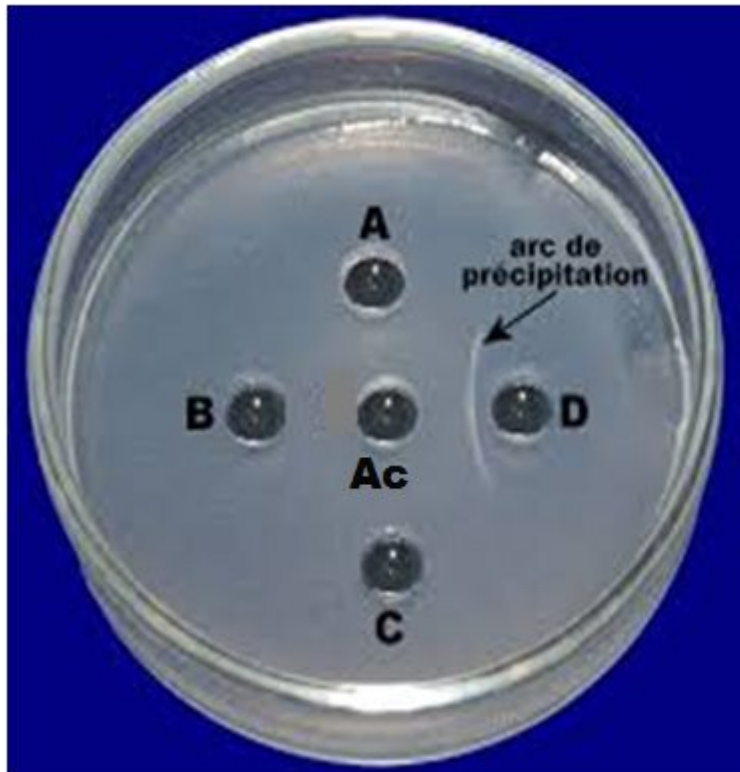
- ➔ Technique qui s'effectue sur gel (contenant des pores) qui peut être vierge ou incorporé de l'ac spécifique de l'Ag à chercher (ou à doser)
- ➔ La diffusion dans tous les sens des solutions contenant l'Ag et l'Ac
- ➔ La rencontre et interaction entre l'Ag et l'Ac donne apparition à un arc de précipitation



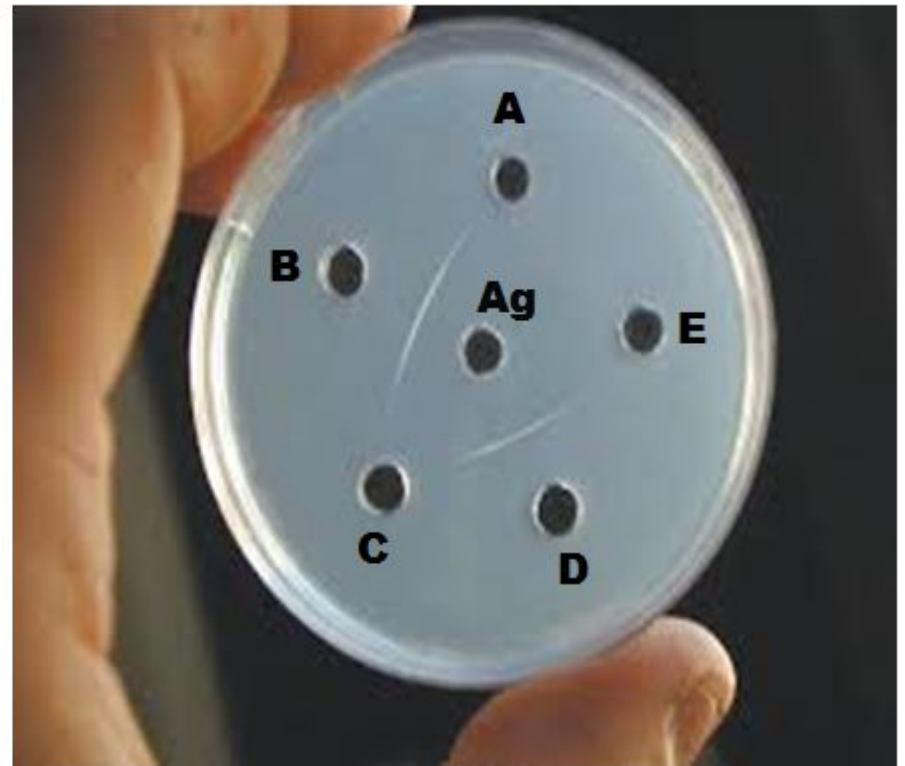
1. Techniques qualitatives:

b- Immunodiffusion double sur gel (Ouchterlony) :

- ➡ Diffusion double (de l'ag et de l'ac)
- ➡ Peut être utilisée pour tester plusieurs échantillons à la fois



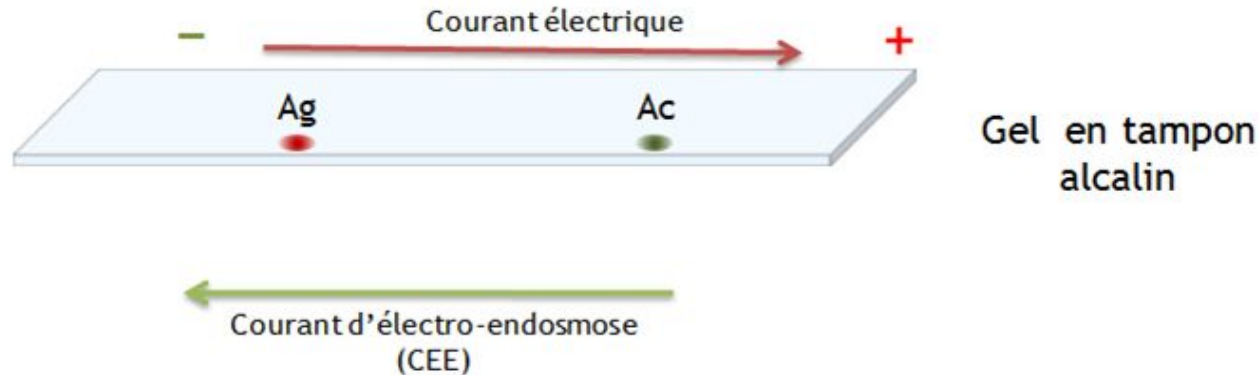
Test positif pour le **D**



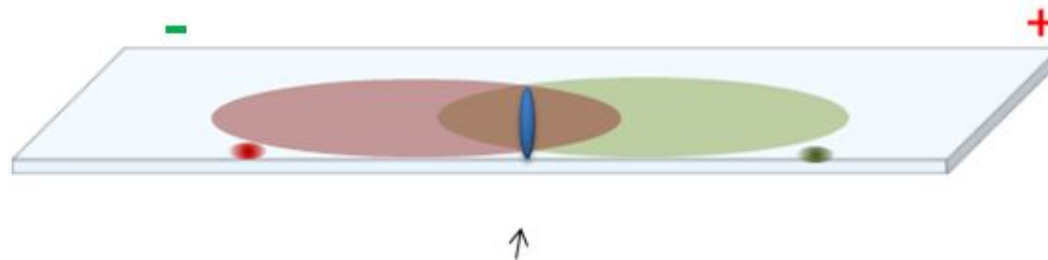
Test positif pour le **B** et le **D**

1. Techniques qualitatives:

c- Électrosynérèse :



- ↓
- Migration de l'Ag vers l'anode (courant électrique)
 - Migration de l'Ac vers la cathode (courant d'électroendosmose)
 - Précipitation dans la zone d'équivalence
 - Coloration
 - Lecture

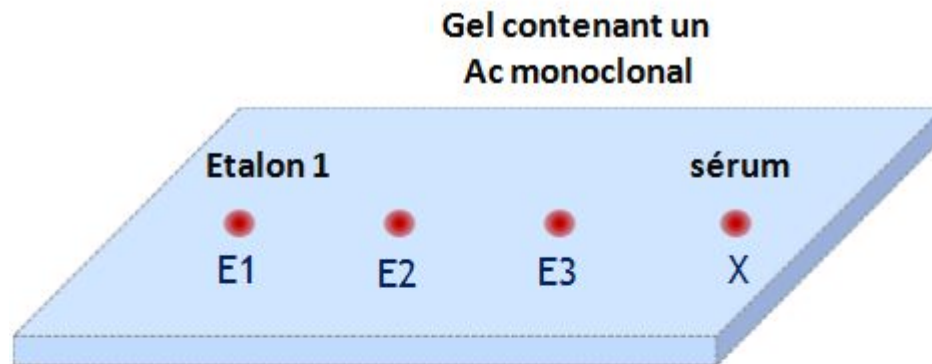


↑
Ligne ou arc de précipitation

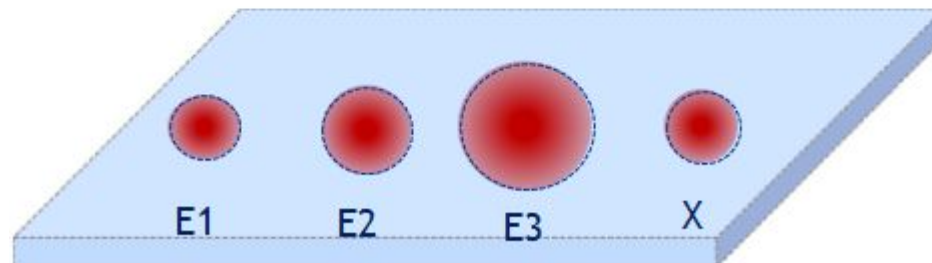
2. Techniques quantitatives :

a- Immunodiffusion radiale (MANCINI):

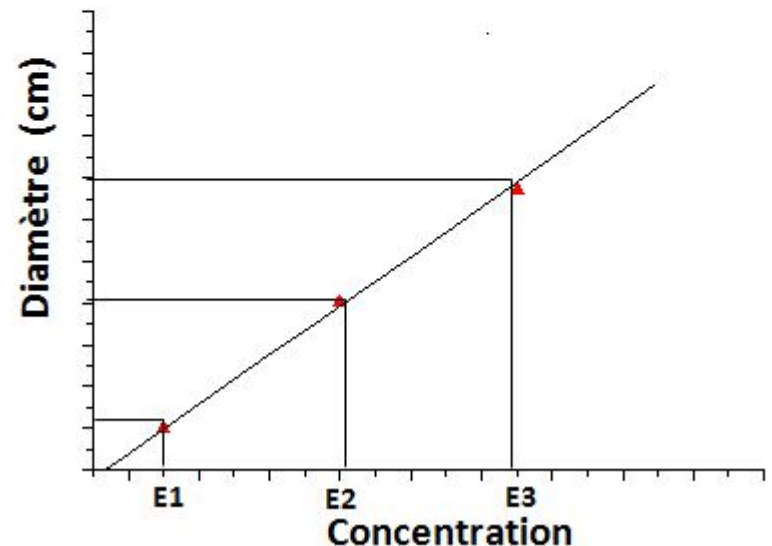
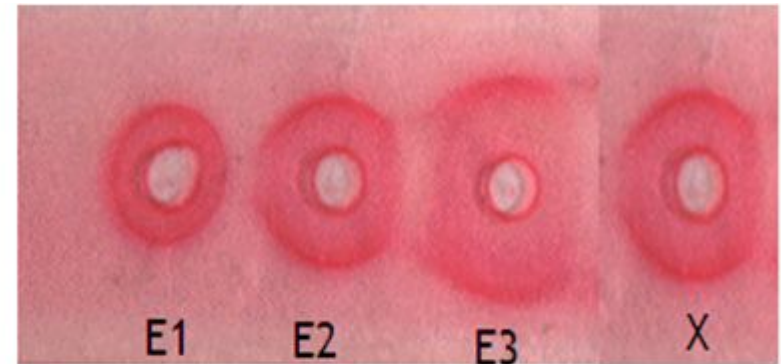
- ➔ Gel incorporé d'un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine à chercher



Diffusion et
précipitation



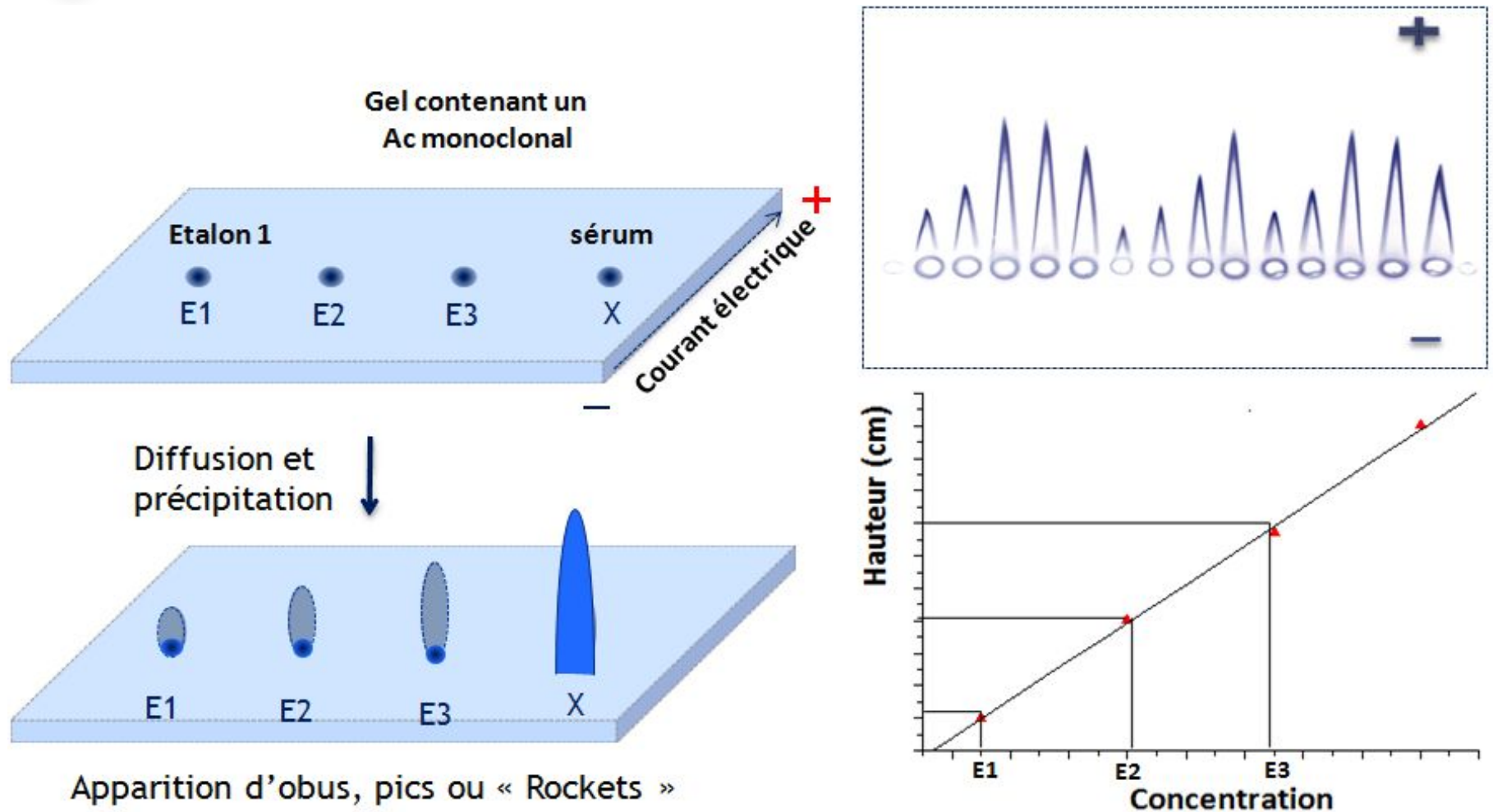
Apparition d'anneaux de précipitation



2. Techniques quantitatives :

b- Technique de Laurell :

- ➔ Même principe que Mancini en présence d'un champs électrique



2. Techniques quantitatives :

c- Turbidimétrie et laser- néphélémétrie :

➡ Techniques d'immuno-précipitation en milieu liquide

- La turbidimétrie

➡ Technique de mesure du degré de turbidité d'une suspension.

➡ Elle est basée sur la capacité des complexes immuns Ac-Ag présents dans une suspension à absorber un faisceau lumineux.

➡ Elle est déterminée grâce à un système optique qui mesure la diminution, due à l'absorbance, de l'intensité d'un faisceau lumineux traversant la suspension.

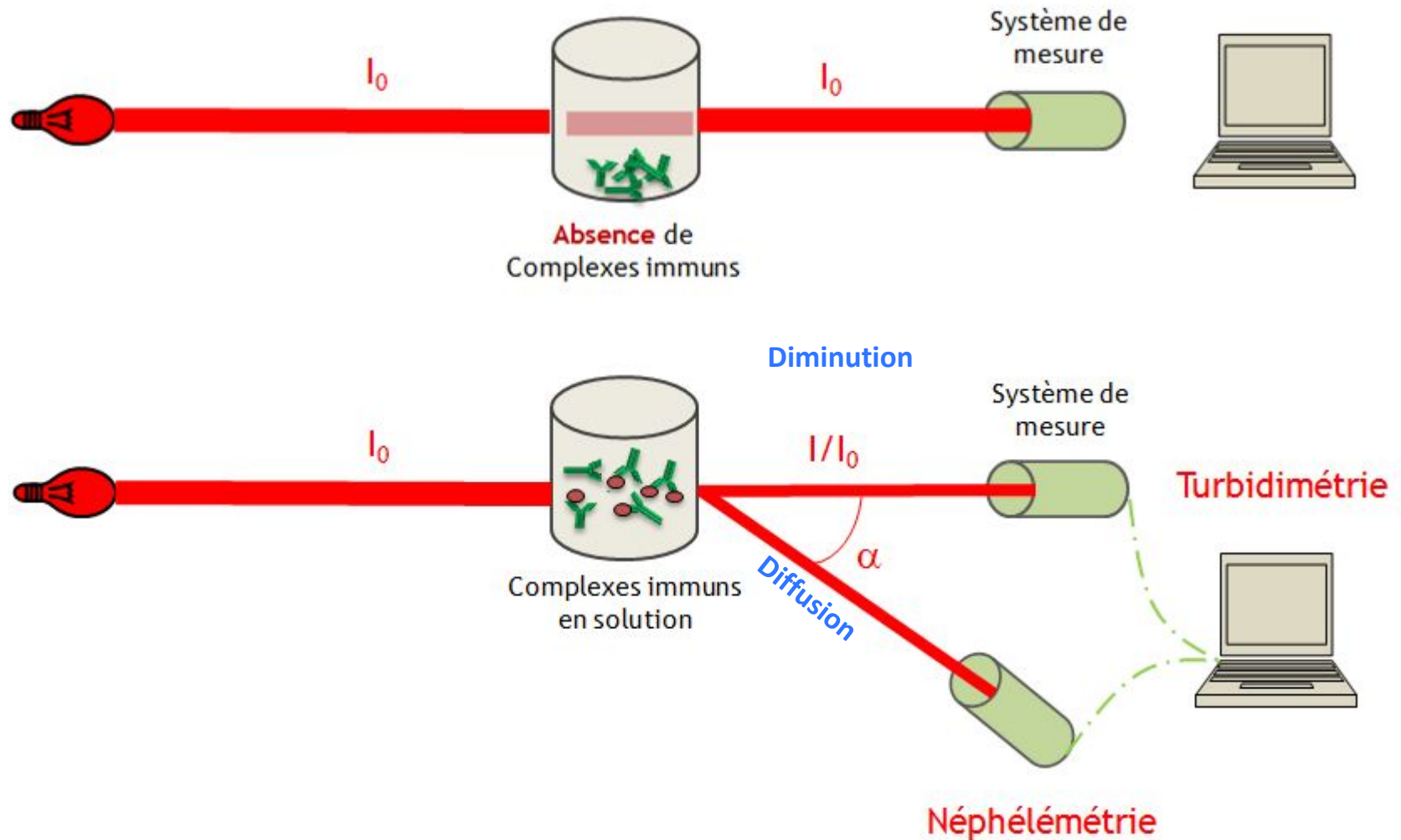
- La néphélométrie

➡ Technique basée sur la diminution de l'intensité par diffusion de la lumière

NB : Etablir une courbe d'étalonnage en fonction de la diminution de l'intensité du rayon lumineux (turbidimétrie) ou de la diffusion selon un angle α (laser-néphélémétrie)

2. Techniques quantitatives :

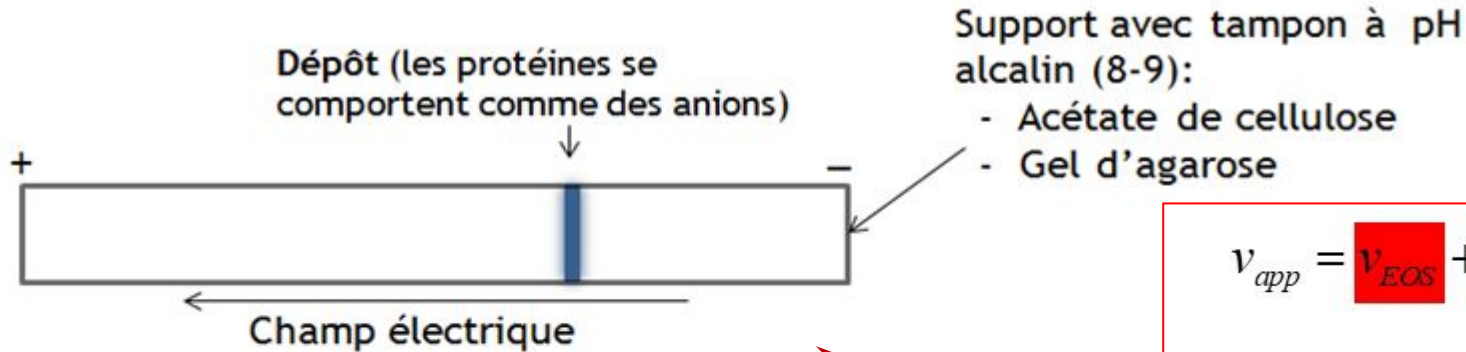
c- Turbidimétrie et laser- néphélémétrie :



3- Electrophorèse des protéines sériques :

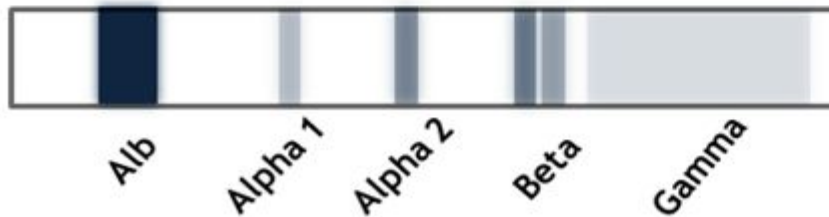
➡ Technique de séparation des protéines en fonction de leur charge électrique et leur taille

a- Sur gel :



Courant d'EOS

Electrophorèse :
Migration des protéines
selon leur charge et taille



Coloration

$$v_{app} = v_{EOS} + v_{EP}$$

$$v_{EP} = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

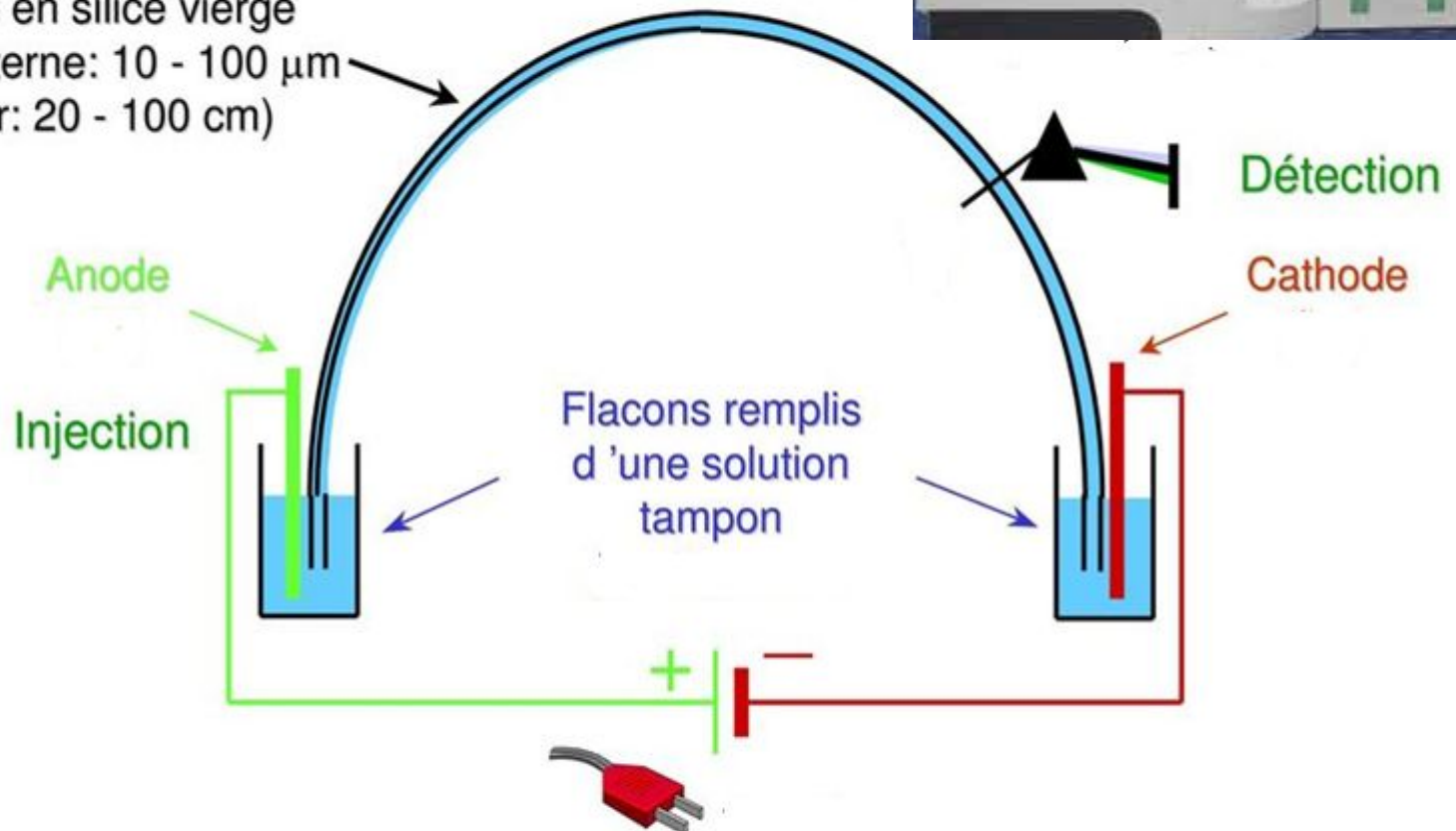
$$\Rightarrow v_{app} = v_{EOS} + \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}$$

U_{app} : vitesse de migration apparente
 U_{EOS} : vitesse de migration électro-osmotique
 U_{EP} : vitesse de migration électrophorétique
 q : charge (coulomb)
 E : champ électrique ($V \cdot m^{-1}$)
 η : viscosité du milieu (poiseuille)
 r : rayon (m)

3- Electrophorèse des protéines sériques :

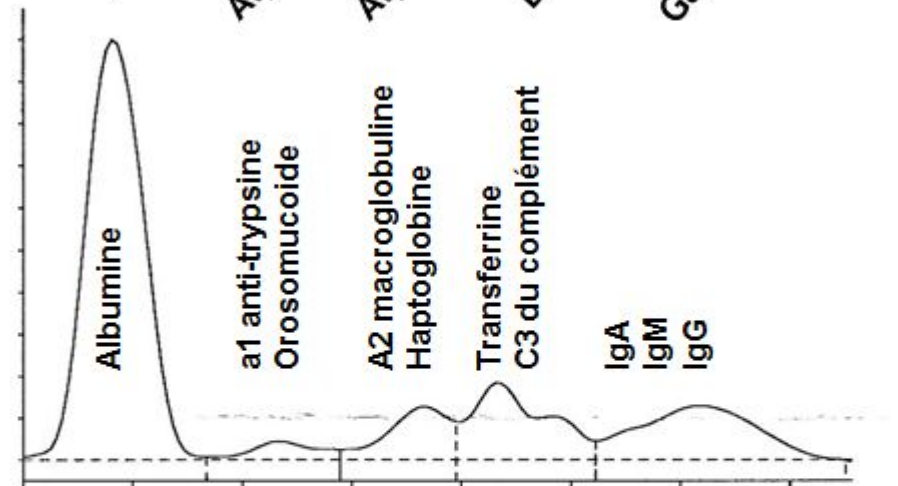
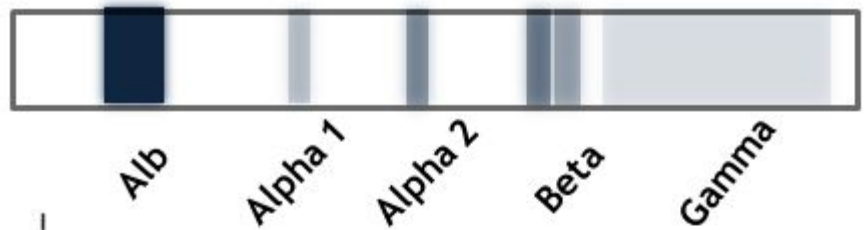
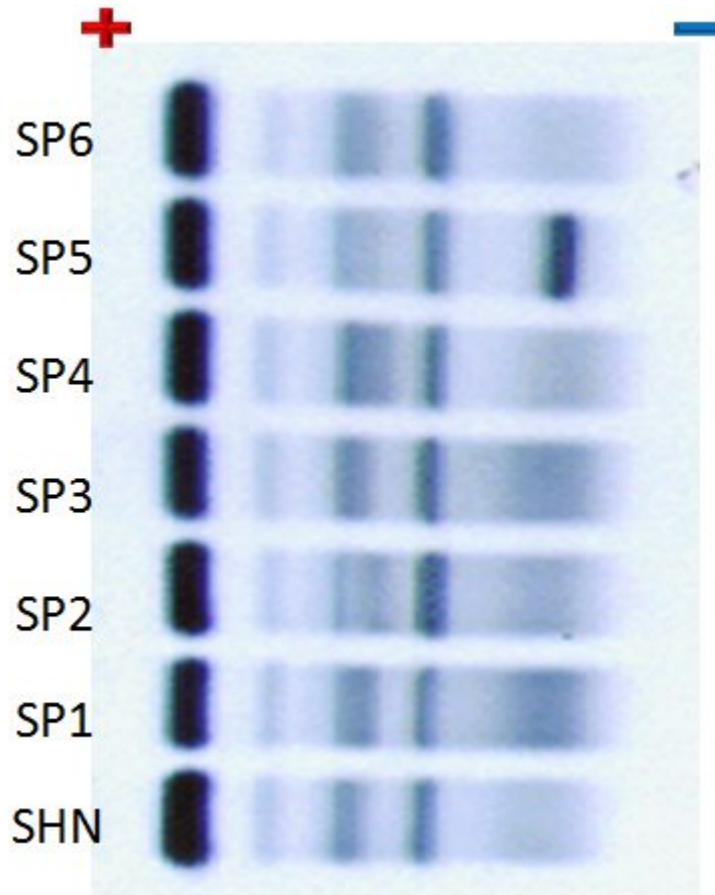
b- Sur tube capillaire de silice :

Capillaire en silice vierge
diamètre interne: 10 - 100 μm
longueur: 20 - 100 cm)



3- Electrophorèse des protéines sériques :

Exemples :

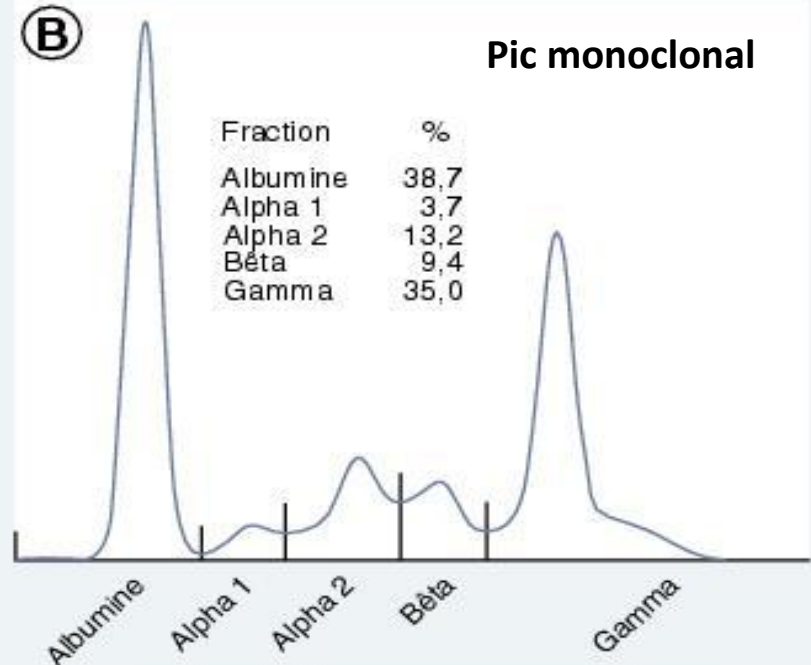
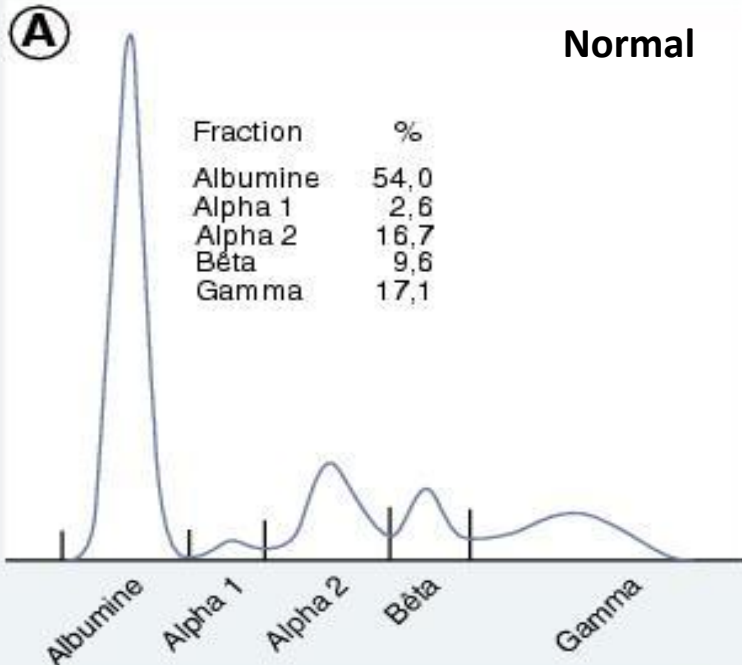


Tracé électrophorétique après lecture densitométrique des fractions protéiques sériques

- Albumine $58 \pm 5\%$ 32-50 g/l
- $\alpha 1$ globulines $3 \pm 1,5\%$ 1-4 g/l
- $\alpha 2$ globulines $9 \pm 3\%$ 6-10 g/l
- β globulines $14 \pm 3\%$ 6-13 g/l
- γ globulines $16 \pm 4\%$ 7-15 g/l

3- Electrophorèse des protéines sériques :

- La présence d'un pic monoclonal à l'EPP sérique est observée en cas de gammopathie monoclonale (prolifération maligne d'un clone plasmocytaire) → typage du composant par IEP ou immunofixation



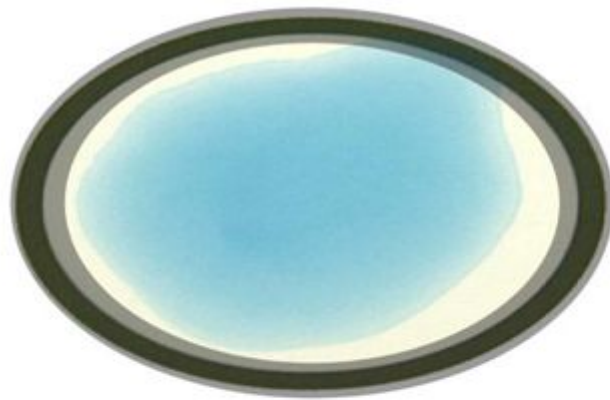


IV. Immuno-agglutination

IV- Immuno-agglutination :

a- Définition et principe :

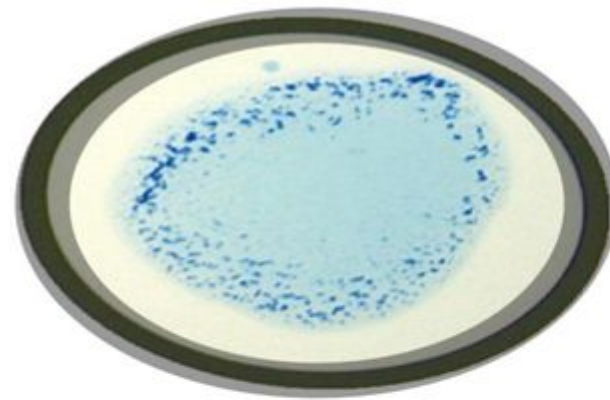
- Technique sensible utilisant des anticorps agglutinants le plus souvent IgM , qui vont interagir spécifiquement avec des antigènes présents à la surface d'une particule ou cellule **(Ag particulaire) avec** formation d'amas (agrégat) de particules visible à l'œil nu ou au microscope à faible grossissement



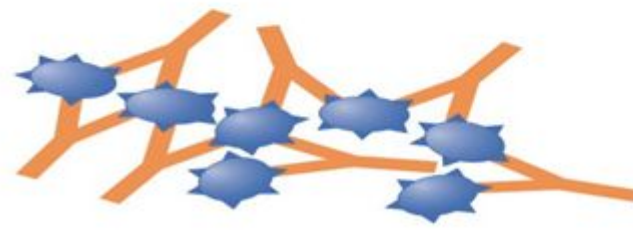
Negative result



Negative result



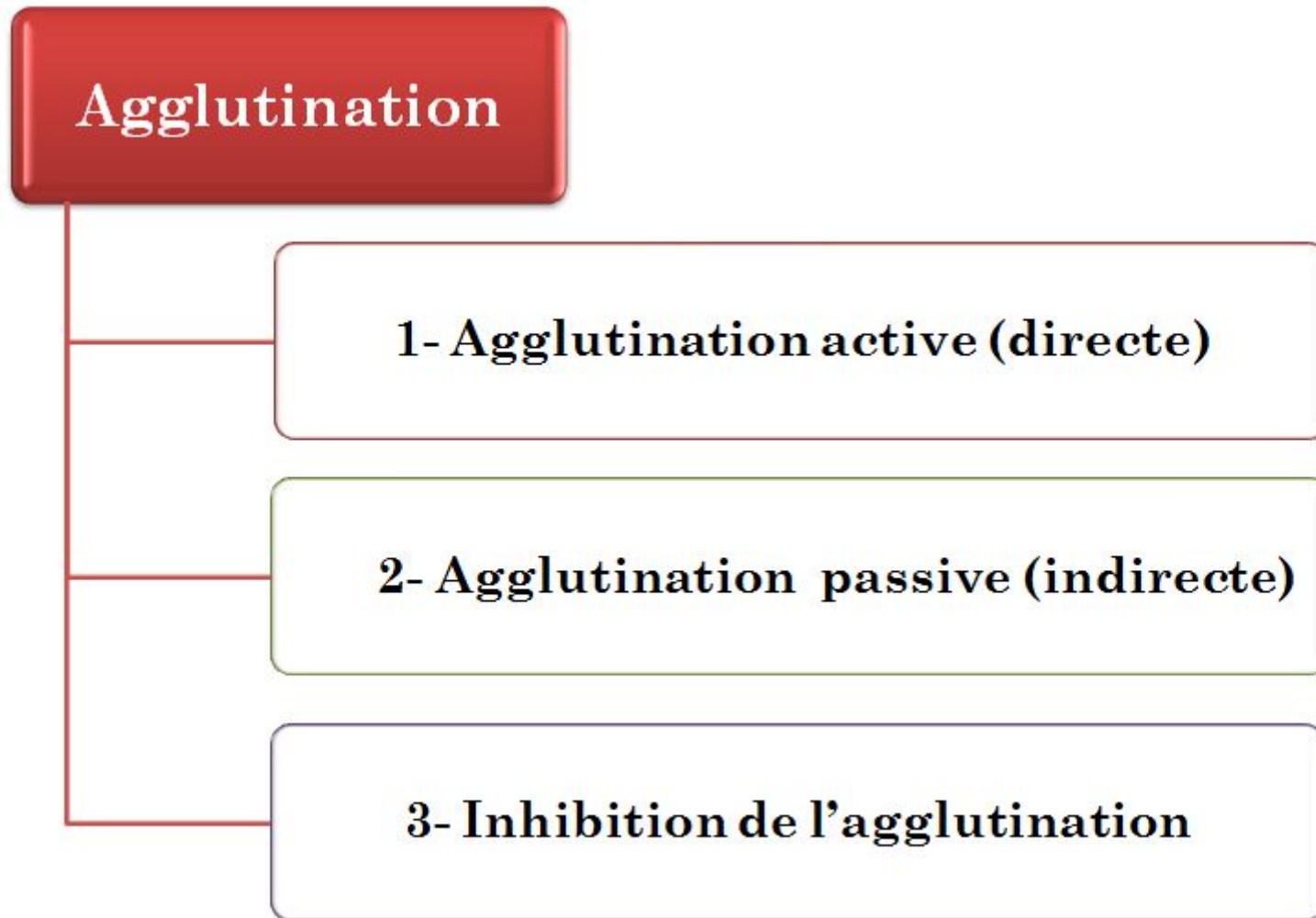
Positive result



Positive result

IV- Immuno-agglutination :

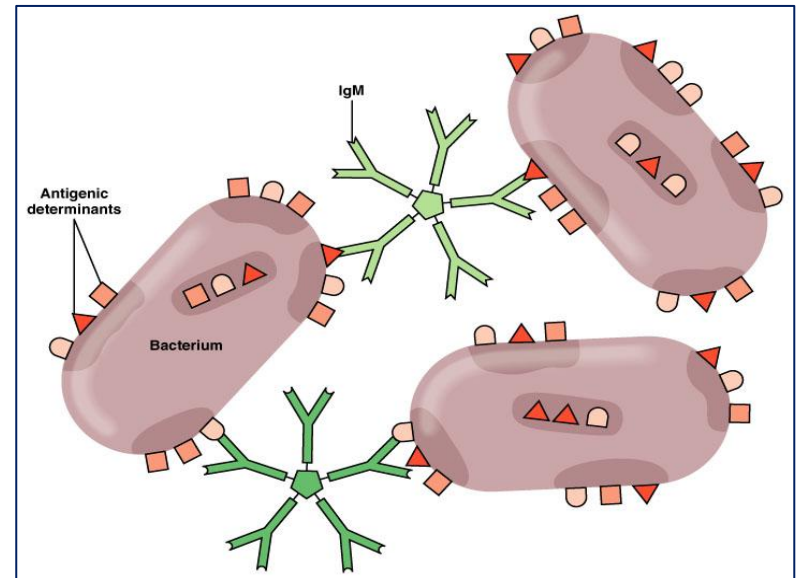
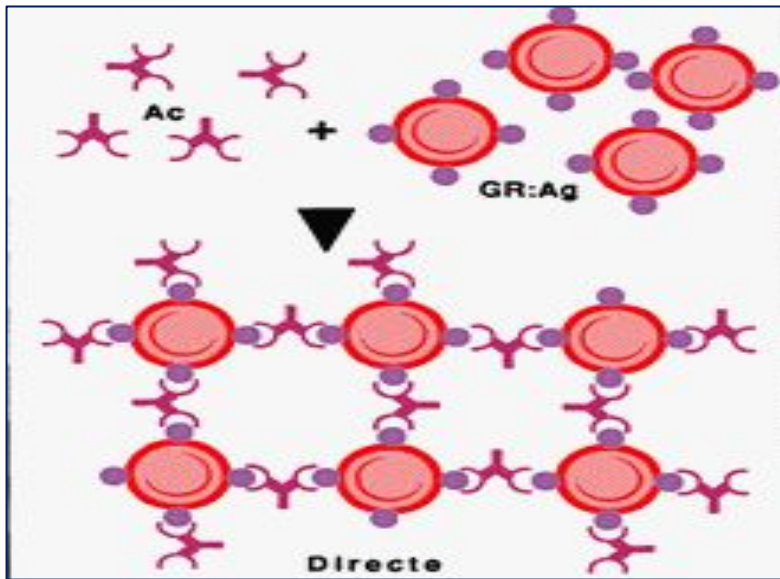
b- Classification :



IV- Immuno-agglutination :

1. Réactions d'agglutination directe:

➡ L'antigène est naturellement porté par une cellule (globule rouge, bactérie..)

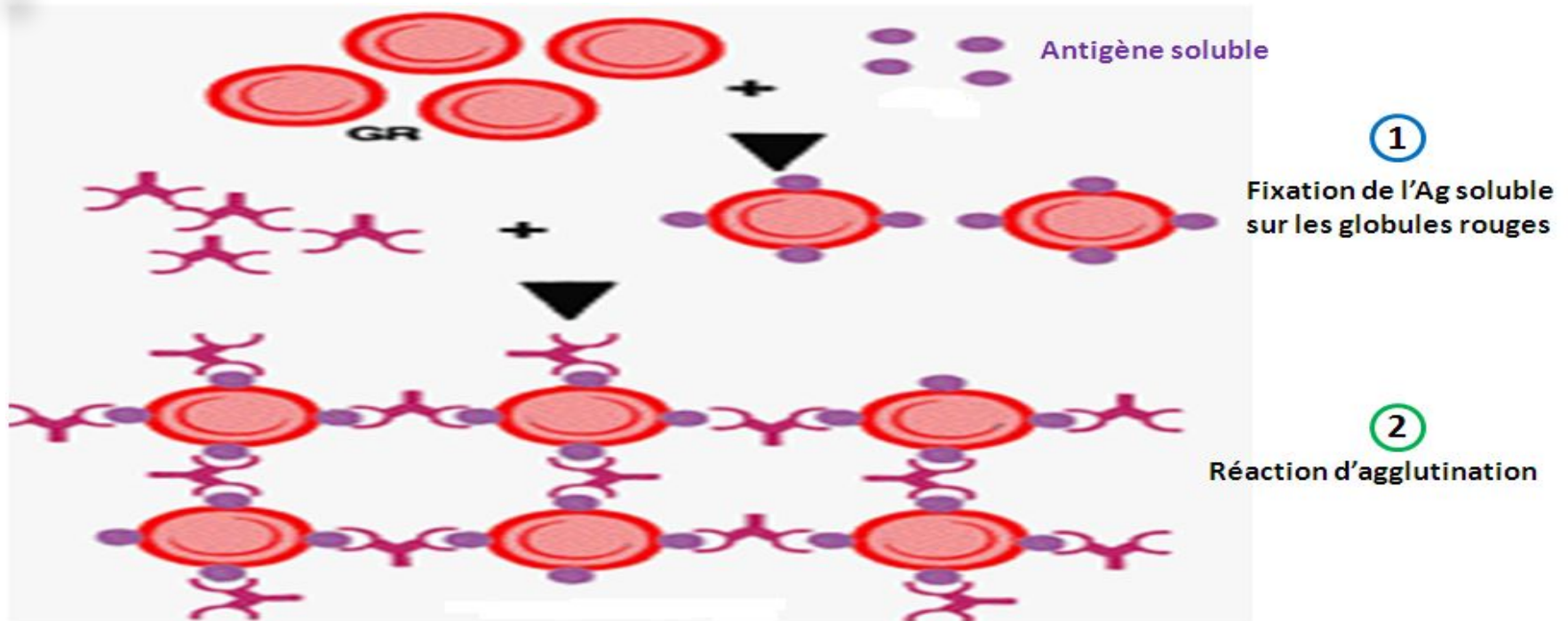


- Groupage ABO
- Réaction de Whright (Brucellose) : Recherche indirecte des IgG et IgM anti-brucelles
- Réaction de Widal et Felix : Recherche indirecte des anticorps anti- salmonelles

IV- Immuno-agglutination :

2. Réactions d'agglutination indirecte:

- ➡ Techniques permettant de visualiser les réactions Ag – Ac invisibles ou discrètes, en les faisant bénéficier de la grande sensibilité des réactions d'agglutination.
- ➡ Deux particules support sont utilisées (cristaux de cholestérol, ou particules de latex)
- ➡ Les globules rouges peuvent être utilisés comme support ➡ hémagglutination

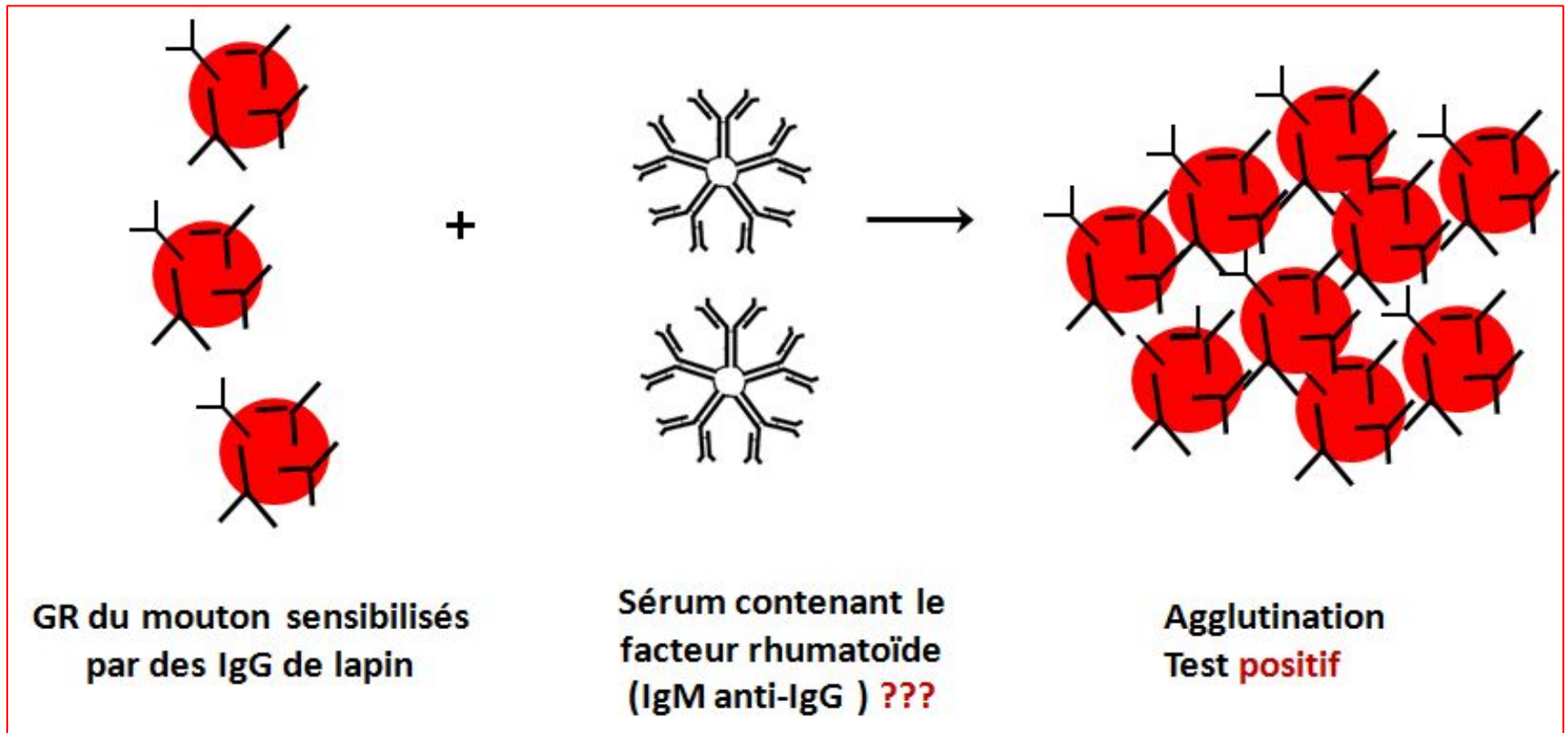


2. Réactions d'agglutination indirecte:

Exemple d'application:

- ➡ Recherche du facteur rhumatoïde (IgM anti-IgG) dans le sérum des malades atteints de polyarthrite rhumatoïde (maladie auto-immune) peut se faire par deux techniques :

❖ Réaction de Waaler-Rose (hémagglutination)

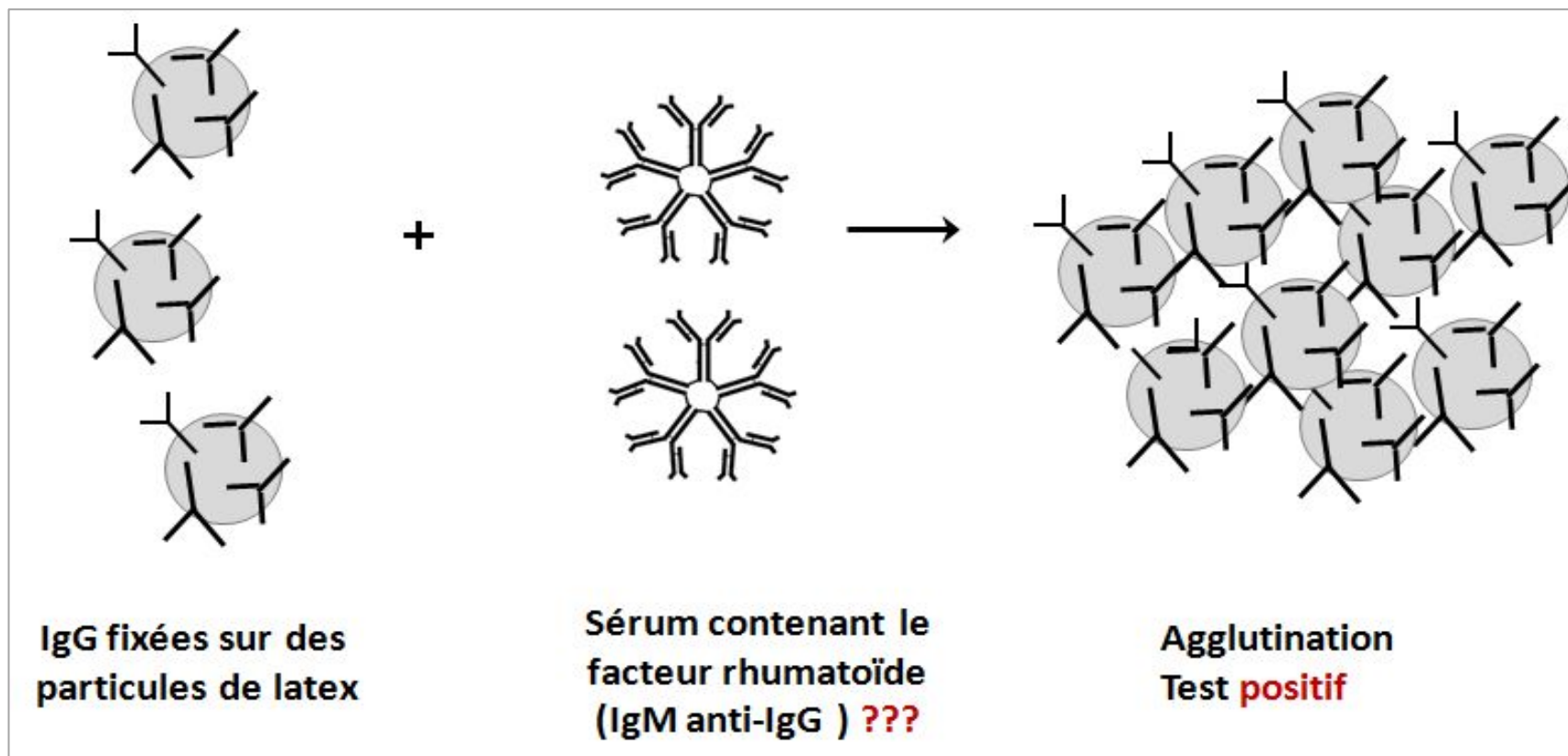


2. Réactions d'agglutination indirecte:

Exemple d'application:

- ➔ Recherche du facteur rhumatoïde (IgM anti-IgG) dans le sérum des malades atteints de polyarthrite rhumatoïde (maladie auto-immune) peut se faire par deux techniques :

❖ Test au Latex



IV- Immuno-agglutination :

3. Réactions d'inhibition de l'agglutination :

Principe:

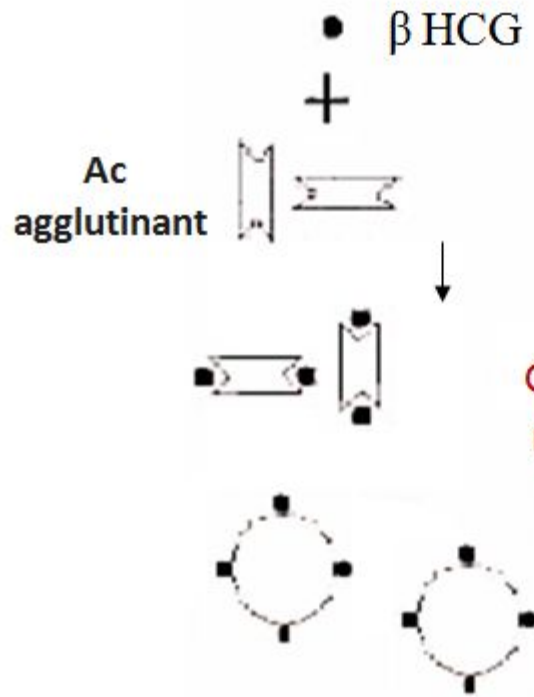
- ➡ Techniques destinées à mettre en évidence un Ag, grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques

Exemple d'application :

- ➡ Test de grossesse : dosage de la β HCG (hormone chorionique gonadotrope) : glycoprotéine sécrétée par la placenta (au début par le syncytiotrophoblaste)
- ➡ L'absence d'une agglutination est en faveur d'un test de grossesse **positif**

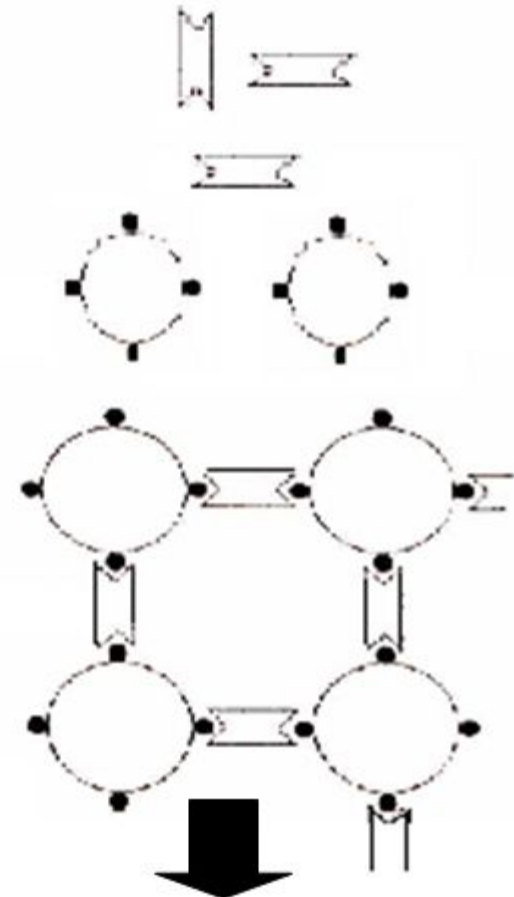
3. Réactions d'inhibition de l'agglutination :

Femme enceinte



Absence d'agglutination (Réaction positive)

Femme non enceinte



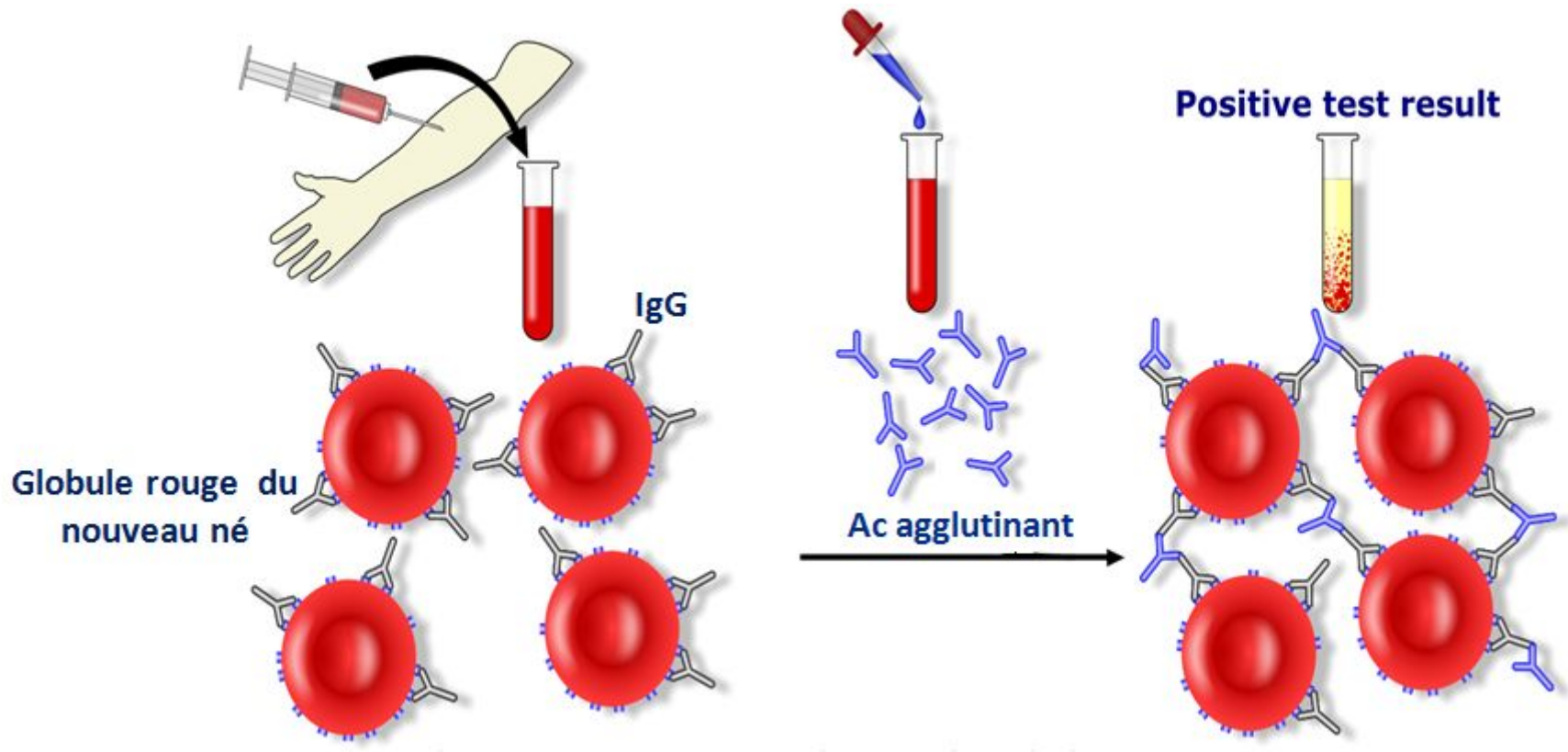
Agglutination (Réaction négative)

4-Test de Coombs : (test à l'anti-globuline)

Exemple d'application :

- ➔ Incompatibilité rhésus foëto-maternelle dans le système rhésus (IgG anti-D)

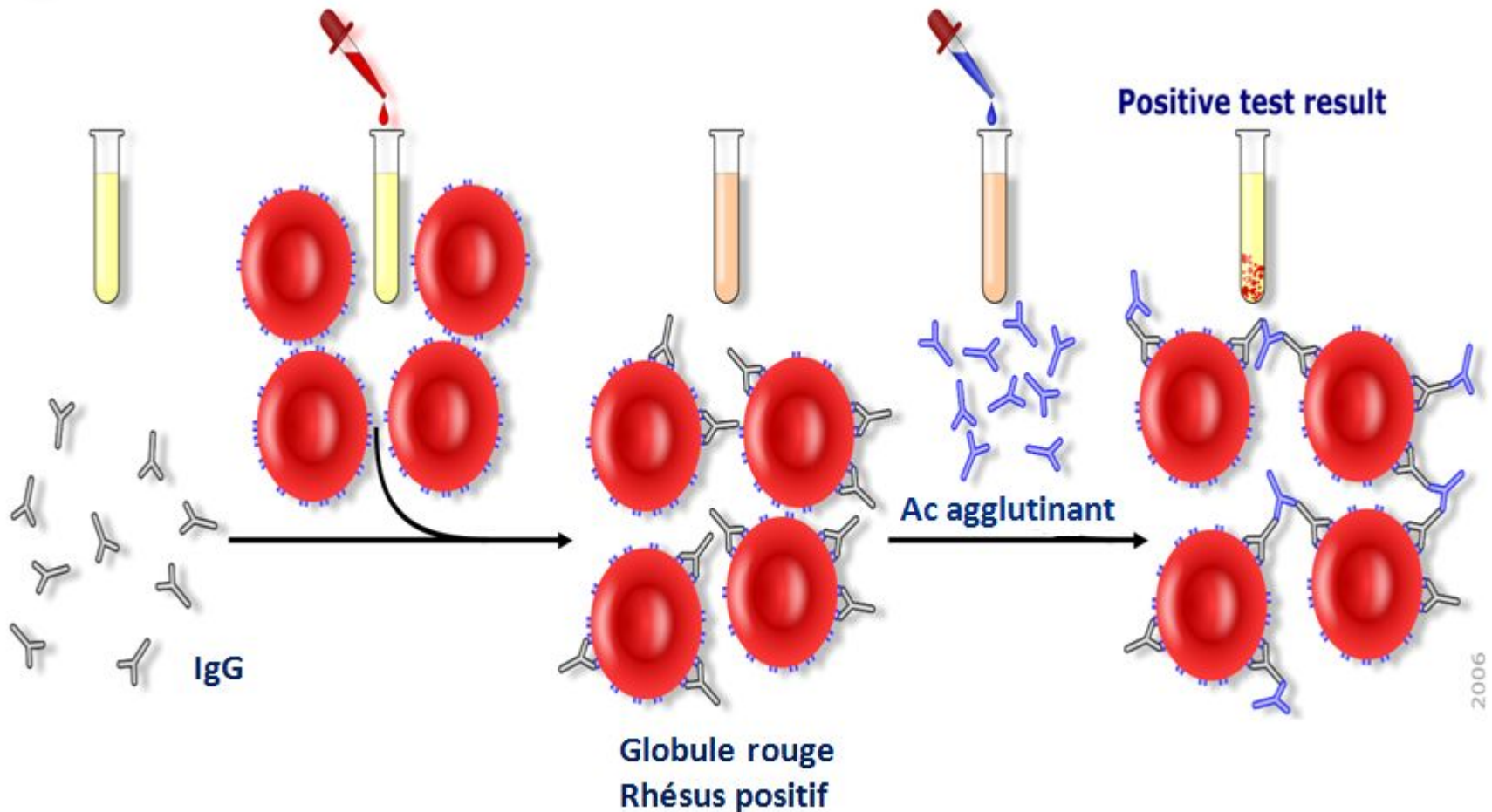
❖ Test de Coombs direct:



4-Test de Coombs : (test à l'anti-globuline)

❖ Test de Coombs indirect:

➡ La fixation des IgG maternelles précède l'étape d'agglutination



MERCI!
THANK YOU!

