



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

IUP - L2



Principales réactions Antigènes-Anticorps utilisées en biologie

**Mr Boudard Frédéric, MCU en Immunologie
Laboratoire d'Immunologie, UFR Pharmacie, UM**

I Généralités

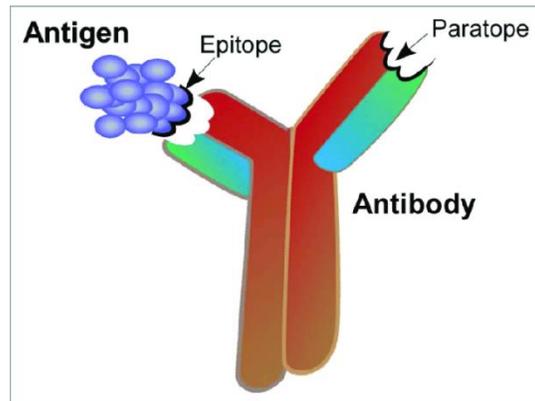
1) Rappels :

Concernant les Ac : le **paratope** est la partie de l'Ac qui se fixe sur l'épitope de l'Ag. Il est situé dans la partie Fab de l'Ac.

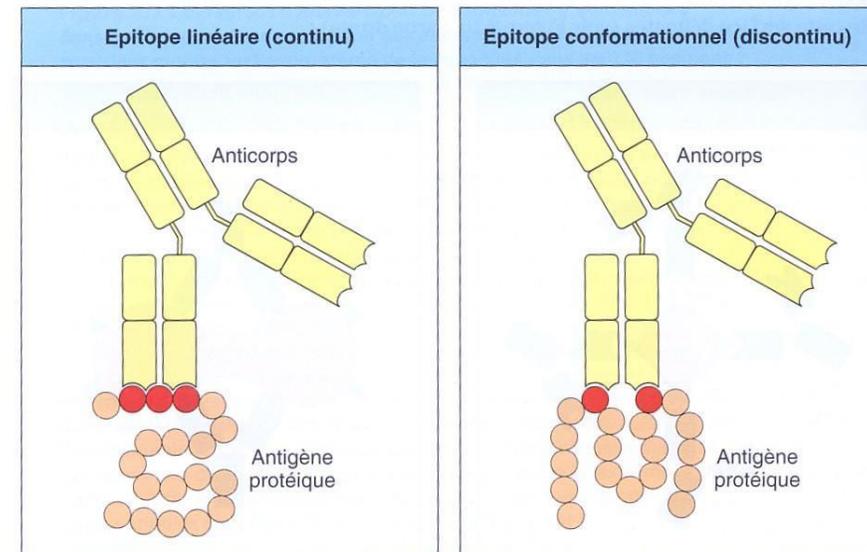
Concernant les Ag : l'**épitope** est la partie de l'Ag reconnue par le paratope de l'Ac.

Ces épitopes peuvent être **linéaires** (structures répétitives sur les polysaccharides, acides aminés qui se suivent sur la séquence laire des protéines) ou **conformationnels** (due aux repliements des chaines dans les protéines).

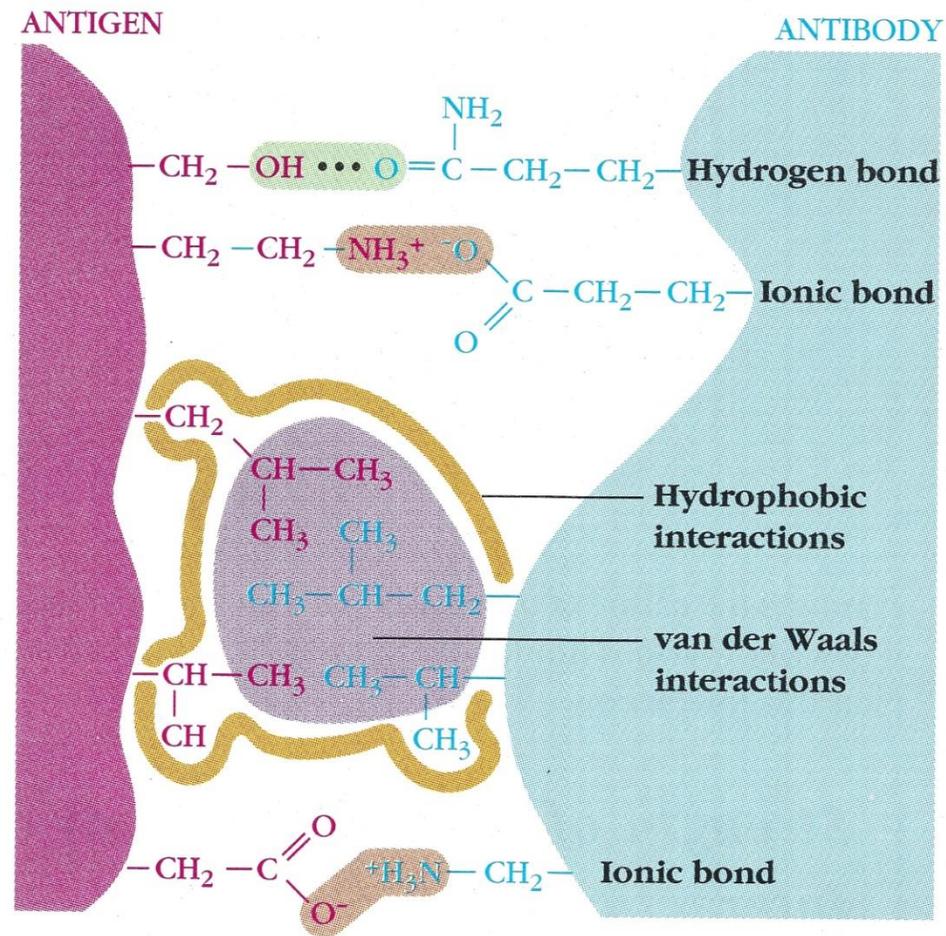
Sur un même Ag, les épitopes peuvent être **identiques** ou **différents**.



<https://i.stack.imgur.com/PtNdP.png>



L'interaction paratope (Ac) et épitope (Ag) fait intervenir des liaisons non covalentes



2) Réaction Ag-Ac

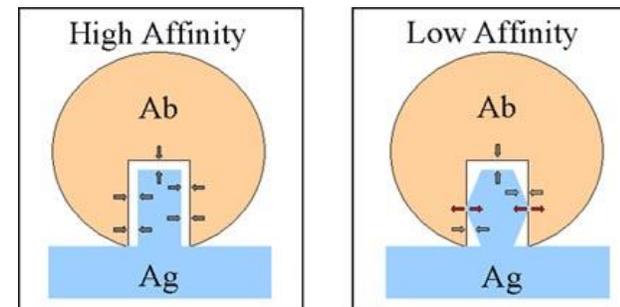
La réaction Ag-Ac est une réaction **spécifique, réversible et exothermique**.

Elle peut s'écrire : **(Ac) + (Ag) ↔ (Ac-Ag) + chaleur** (Ag-Ac étant les complexes immuns qui se sont formés).

A l'équilibre, on a =
$$\frac{\text{(Ac-Ag)}}{\text{(Ac) (Ag)}} = \mathbf{K_a}$$
 (**Ka** étant la constante d'**affinité intrinsèque** de l'Ac).

$K_a \approx 10^5 \text{ L.mol}^{-1}$ correspond à des Ac de **faible affinité**.

$K_a \geq 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}$ correspond à des Ac de **haute affinité**.



<http://www.microbiologybook.org/French-immuno/immchapter7.htm>

Plus l'Ac possède une **affinité élevée** ($K_a \uparrow$), plus il détectera de **faibles concentrations Ag**.

La réaction Ag-Ac permet donc de **mettre en évidence** dans un liquide biologique ou un prélèvement soit l'**Ag**, soit l'**Ac**.

Elle permet de faire une recherche soit **qualitative** (présence/absence de l'élément recherché), soit **quantitative** (dosage précis de l'Ag ou l'Ac).

3) Application des réactions Ag-Ac

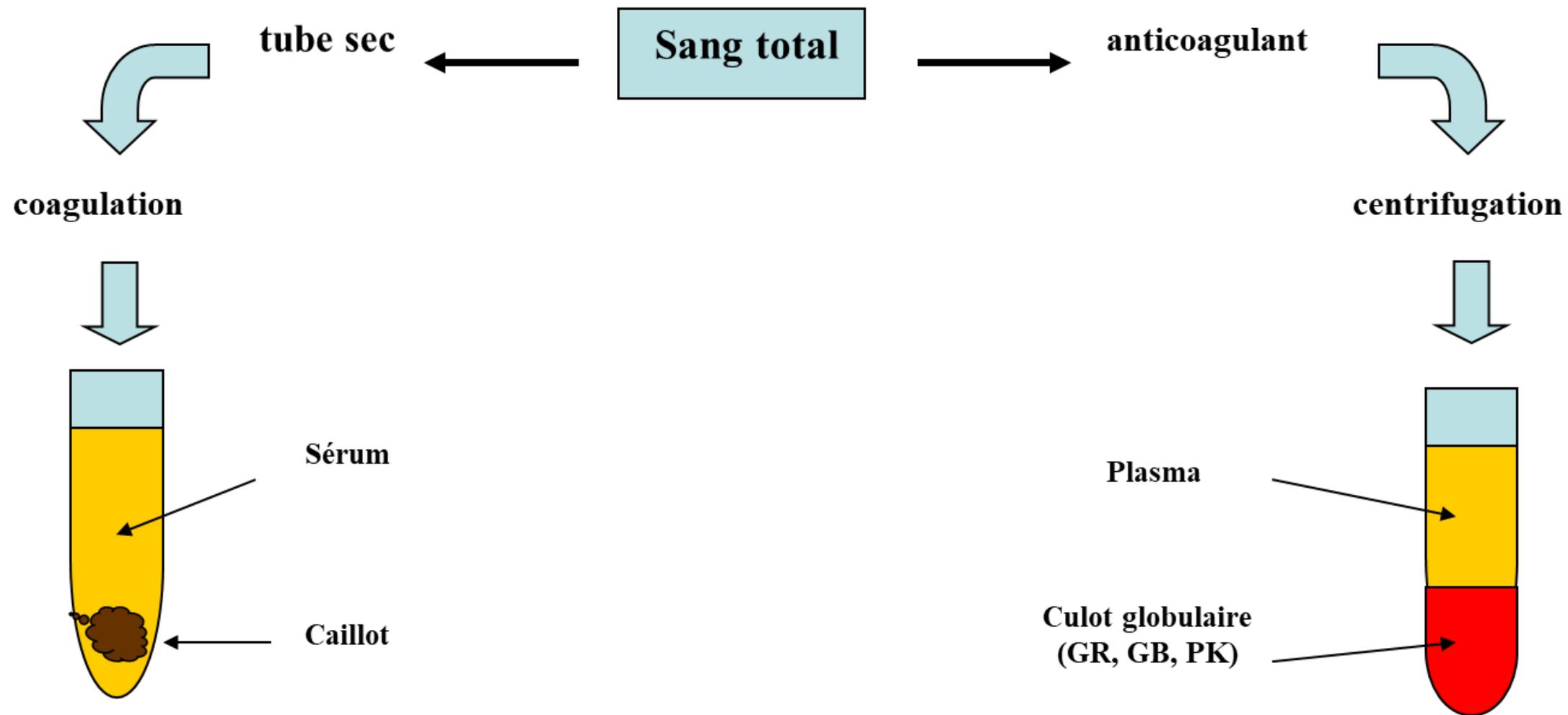
a) en biologie médicale pour faire un :

* diagnostic de maladies infectieuses

- **diagnostic direct** : dans ce cas là, on **recherche l'agent infectieux** avec un Ac spécifique ;

- **diagnostic indirect** : dans ce cas là, on **recherche l'Ac spécifique** vis-à-vis d'un agent infectieux; la recherche d'Ac spécifique se fait par convention internationale dans le sérum du patient et s'appelle la **sérologie**.

Remarque : le **sérum** est obtenu à partir du sang prélevé sur un tube sec en verre. Le contact du verre avec le sang entraîne la coagulation du sang et la formation d'un caillot. Le liquide qui exsude du caillot s'appelle le sérum (liquide jaune clair). Il ne contient pas d'éléments figurés (GR, leucocytes, plaquettes).



* diagnostic de maladies affectant le système immunitaire

Déficits immunitaires (VIH, enfant « bulle »), maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde), hypersensibilités (asthme extrinsèque), syndromes prolifératifs (leucémie, lymphome)

* dosages quantitatifs de molécules (biochimie, endocrinologie)

Hormones protéiques (insuline, GH...), protéines inflammatoires (CRP...), stéroïdes (cortisol...), médicaments (ciclosporine...).

b) dans le domaine de la recherche

II Les réactions de précipitation

1) Généralités

Ce sont des **réactions** qui apparaissent en milieu liquide ou gélifié entre un **Ag soluble** et un **Ac précipitant**, appelé **précipitines**. Seuls les **IgM** et les **IgG** sont des précipitines.

Le précipité est dû à la formation d'un réseau macromoléculaire tridimensionnel entre les Ag et les Ac.

Les Ag/Ac doivent être au moins **bivalent** (2 paratopes, 2 épitopes).

Un Fab seul ou un haptène seul ne donnent pas de réaction de précipitation.

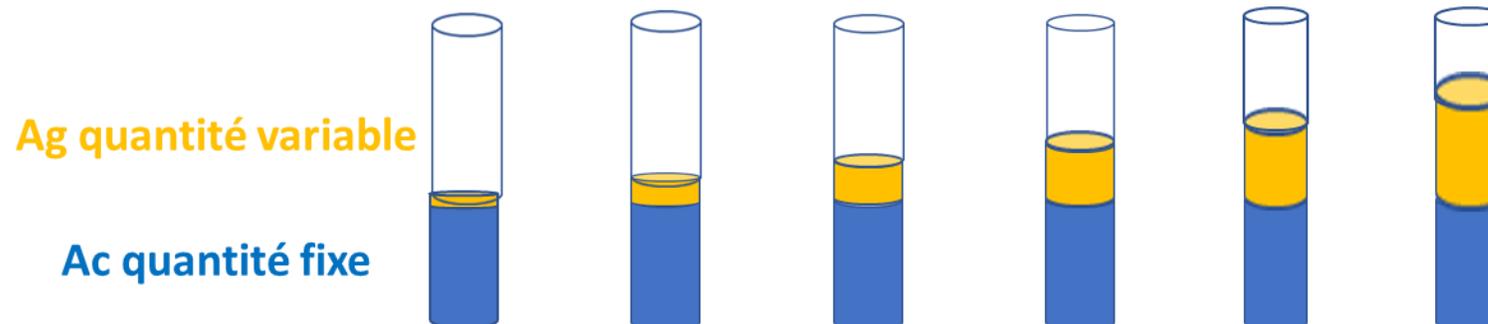
Seuls, les **sérums polyclonaux** (provenant d'un individu ou d'animaux immunisés) **donnent des réactions de précipitation** car ils contiennent un **mélange d'Ac différents** qui reconnaissent le même Ag. Un Ac monoclonal ne précipite pas.

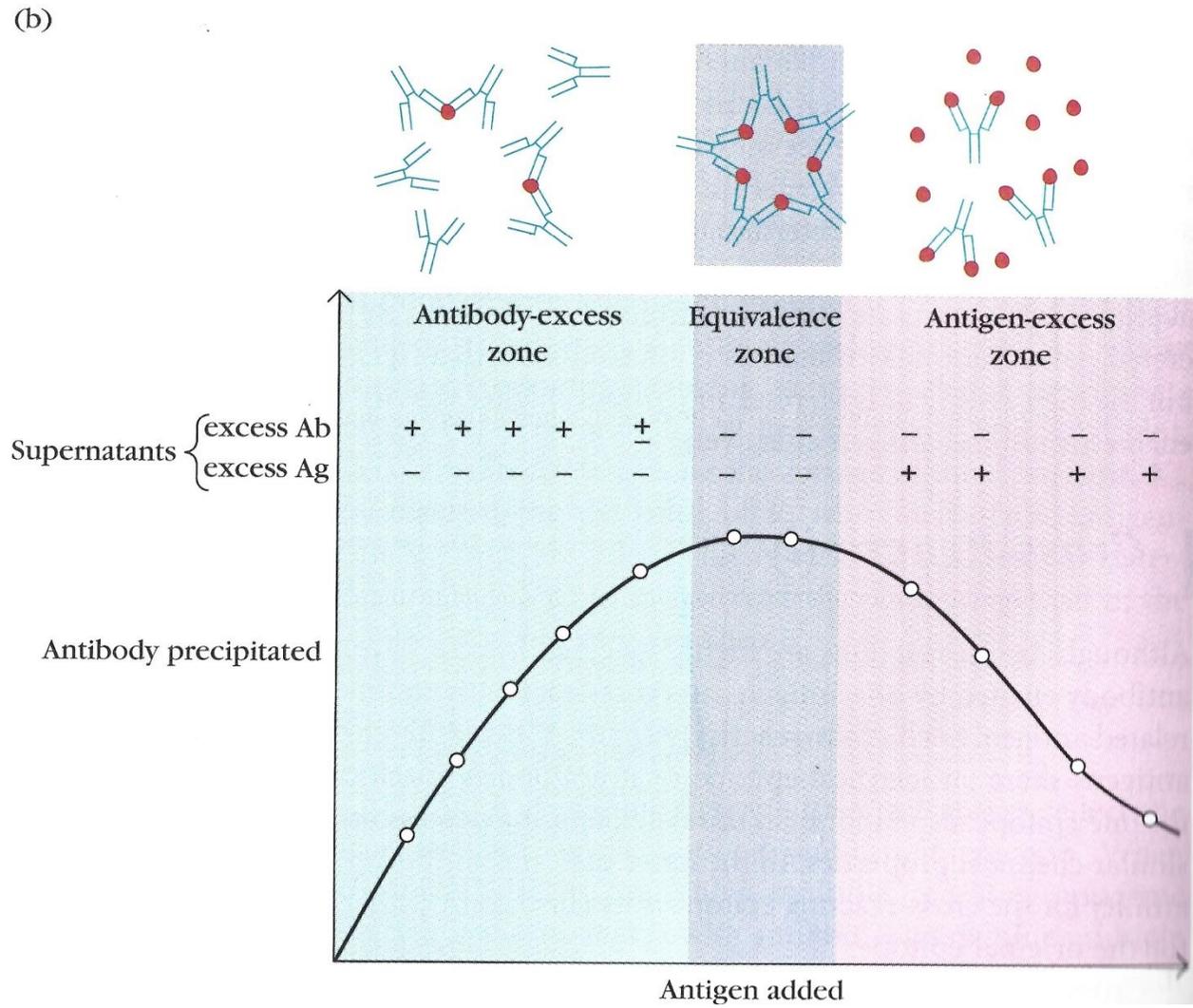
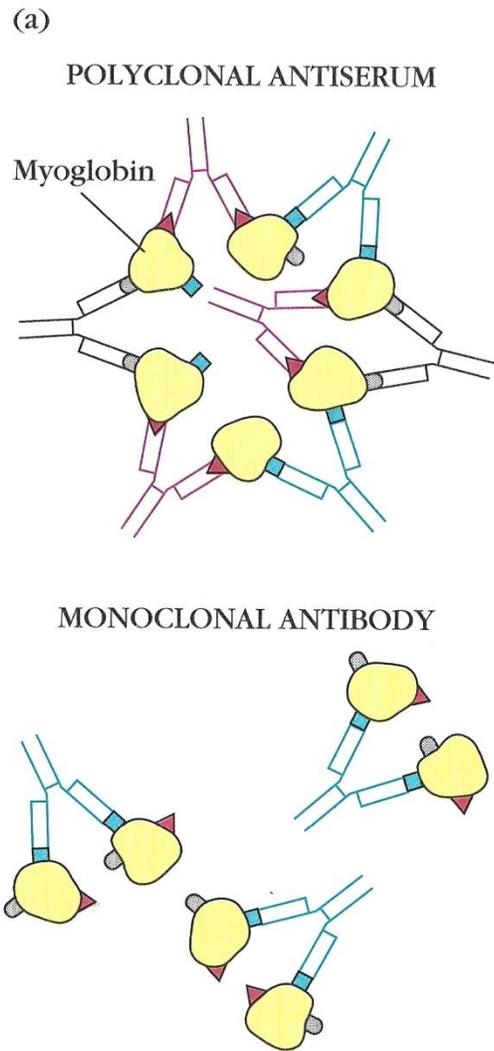
Précipitation en milieu liquide:

→ à une série de tubes, on ajoute une **quantité fixe d'Ac** précipitant (exemple = sérum polyclonal anti-myoglobine),

→ dans chaque tube, on ajoute une **quantité croissante d'Ag soluble** (myoglobine),

→ on quantifie la **quantité de précipité** dans chaque tube.





2) Applications des réactions de précipitation

a- Précipitation en milieu liquide : immunonéphélémétrie et immunoturbidimétrie.

b- Précipitation en milieu gélifié: technique d'immunodiffusion radiale de Mancini.

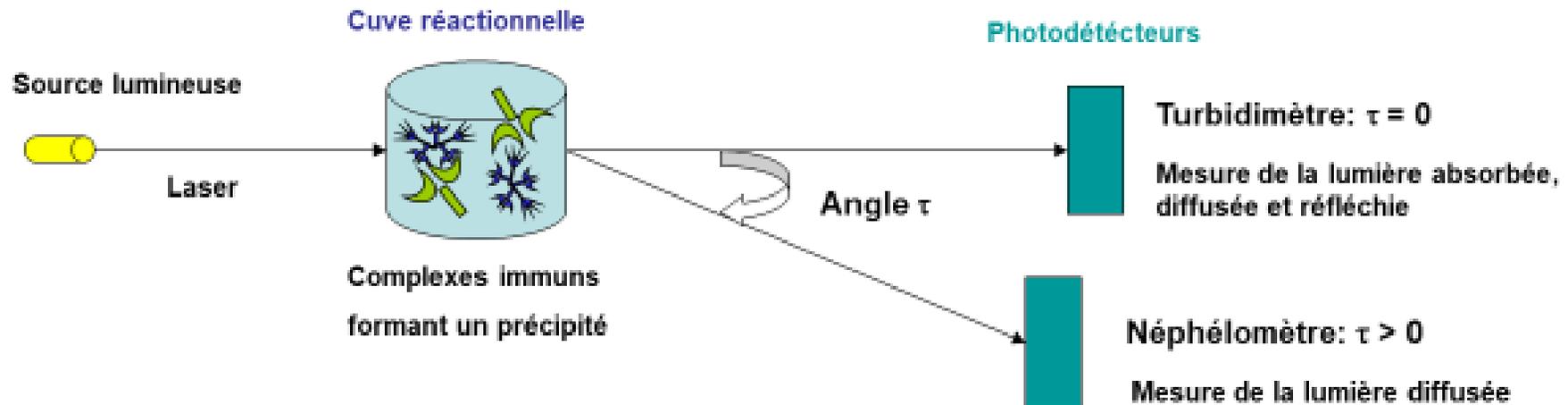
Ces deux techniques permettent de faire des **dosages quantitatifs** de molécules solubles dans différents liquides biologiques.

Ex: dosage des IgM, G et A totales, dosage de l'albumine, dosage des protéines du complément.....

Sensibilité: mg L⁻¹

Immunoprécipitation en milieu liquide

Immunonéphélométrie et Immunoturbidimétrie



Exemple d'application: dosage des IgM totales dans un sérum humain



Ac = sérum immun animal contenant des Ac précipitants anti-IgM humain

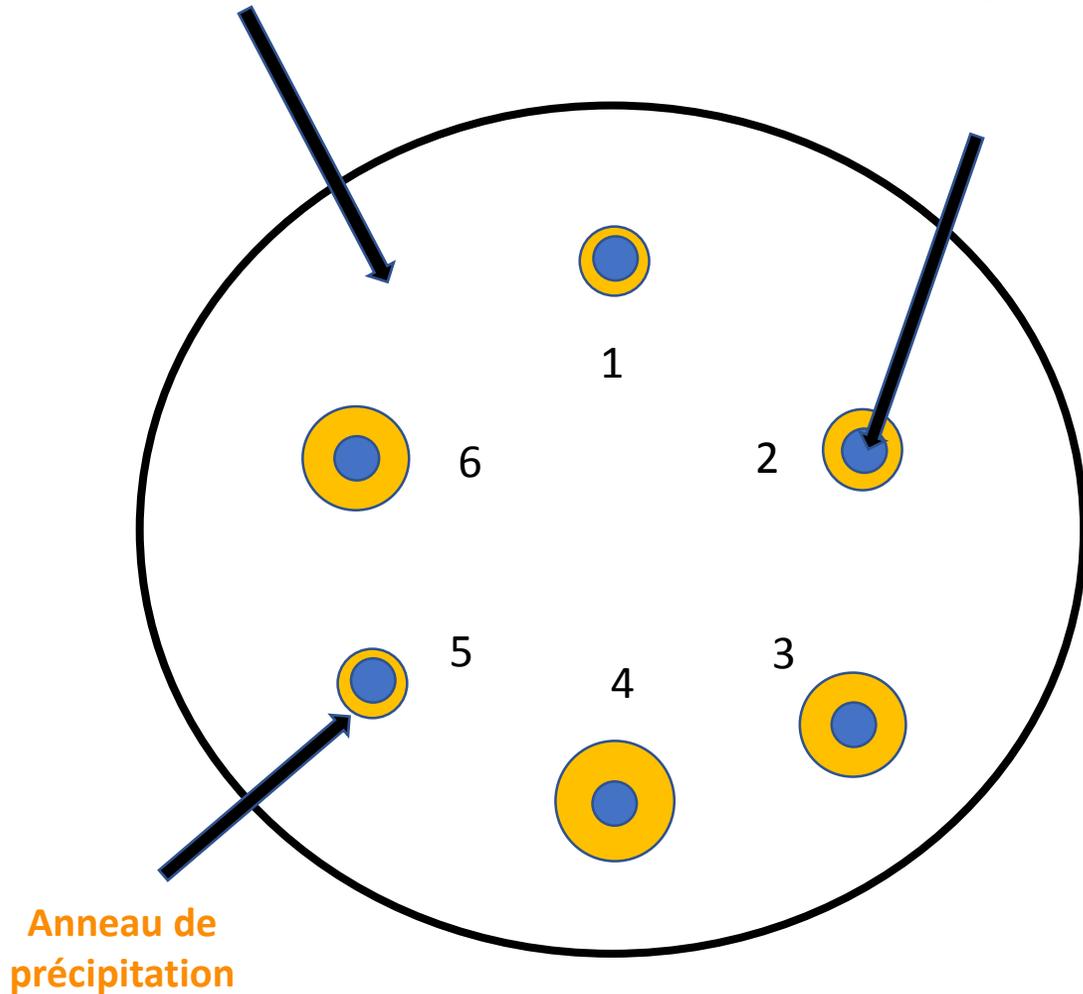


Ag = IgM solubles à doser contenues dans un sérum humain

Immunoprécipitation en milieu gélifié: immunodiffusion radiale de Mancini

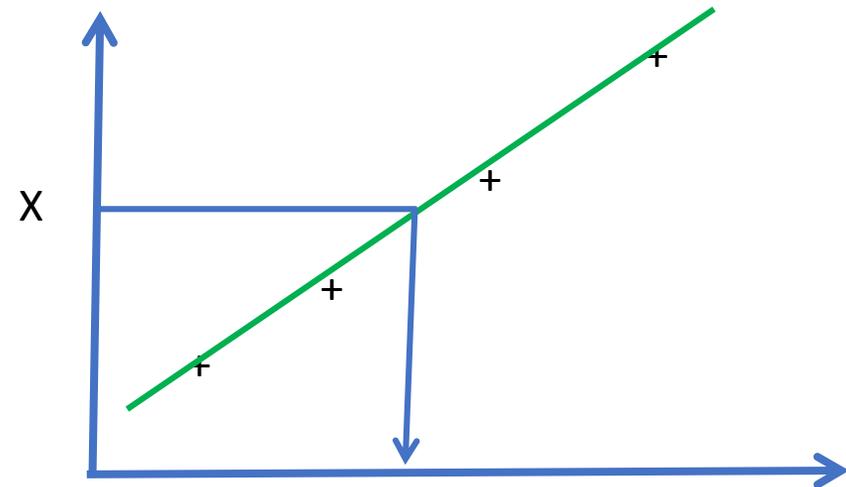
Gélose contenant un Ac précipitant spécifique

Puits contenant l'Ag soluble



Puits 1,2,3,4: concentrations connues d'Ag soluble
Puits 5 et 6: concentrations inconnues ?

Diamètre de l'anneau (mm²)



Concentrations croissantes d'Ag

III Les réactions d'agglutination

1) Généralités

C'est une **interaction spécifique** entre un **Ac agglutinant** (IgM ou IgG, appelées **agglutinines**) et un **Ag particulaire** (globule rouge, cellules, bactéries..). L'Ag est invisible à l'œil nu et son interaction avec l'agglutinine forme des **agglutinats visibles** à l'œil nu.

L'**Ag** doit être **multivalent** (plusieurs épitopes) et l'**Ac** doit être au moins **bivalent** (2 Fab ou paratopes). Les IgM sont plus efficaces (10 paratopes) que les IgG (2 paratopes).

Les IgM sont toujours agglutinantes. Pour les IgG, certaines sont agglutinantes et d'autres ne le sont pas.

Sensibilité de ces techniques : $\mu\text{g L}^{-1}$

2) Agglutination directe et active

Directe = l'**Ac** spécifique est **agglutinant** (IgM et certaines IgG).

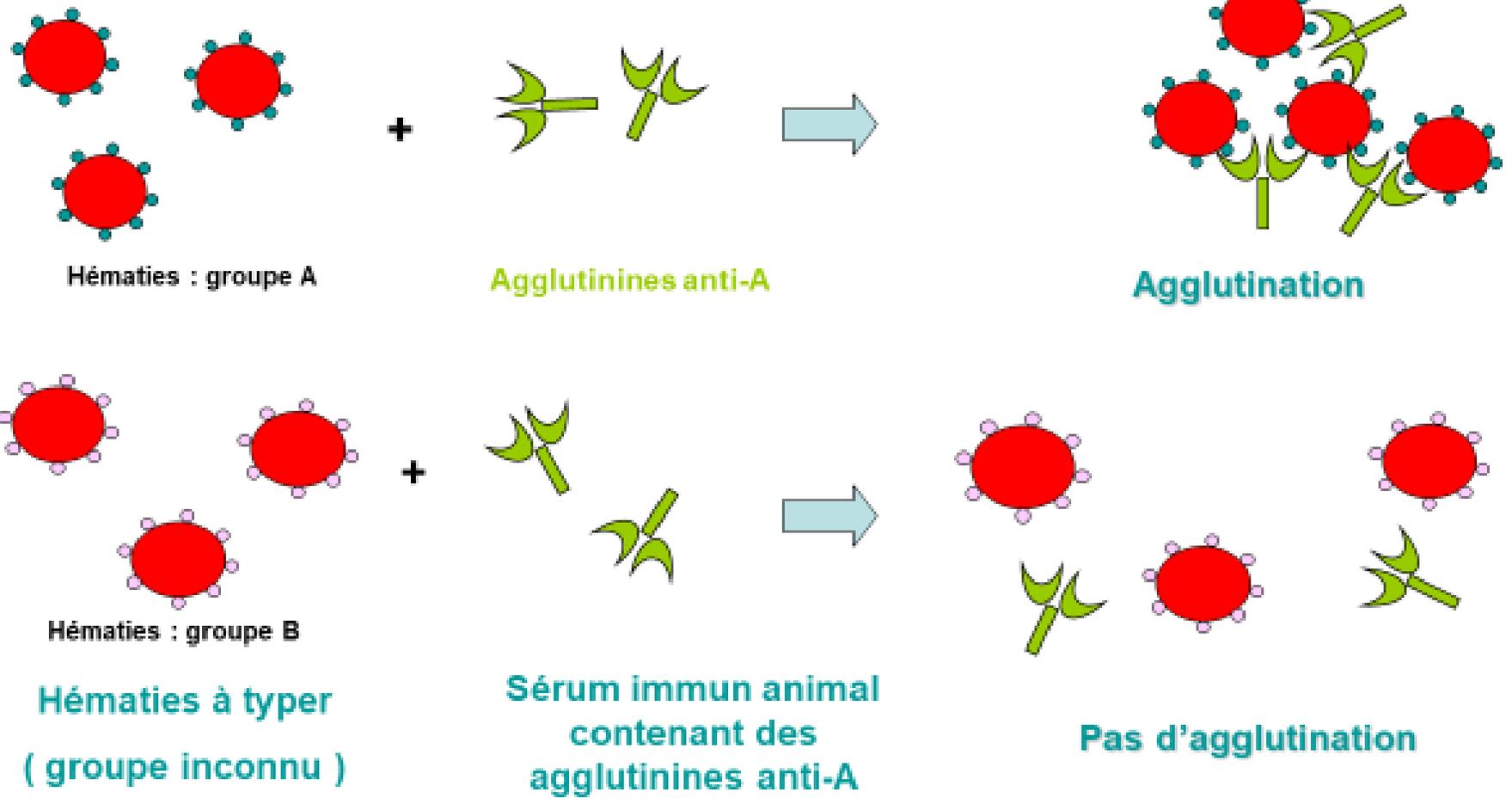
Active = l'**Ag** est une **particule** (cellules, bactéries...).

Ex. d'application : groupes sanguins, épreuve de Beth-Vincent qui permet de connaître le groupe sanguin (A, B, AB, O)

Agglutination

Agglutination directe et active

Epreuve de Beth-Vincent (groupages sanguins)



3) Agglutination passive

Passive = l'Ag pour lequel on recherche des Ac spécifiques n'est pas particulaire mais **soluble**. On le **fixe** alors sur une **particule inerte** (hématies O-, billes de latex) de manière à le rendre particulaire. C'est l'étape de **sensibilisation**.

Ex. d'application : recherche d'IgM/IgG anti-toxoplasme dans le sérum.

Agglutination

Agglutination passive

1 - Sensibilisation des particules

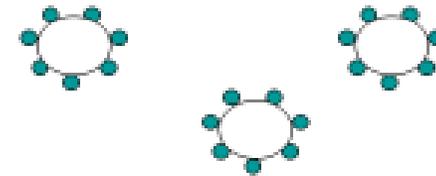


Billes de latex (μ)

+

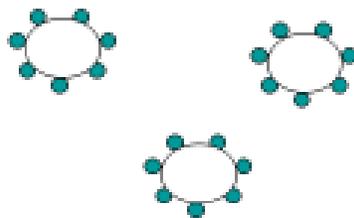


Ag A soluble

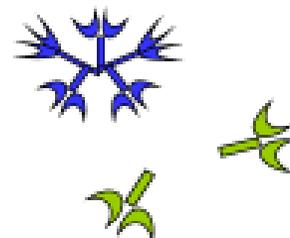


Billes de latex sensibilisées

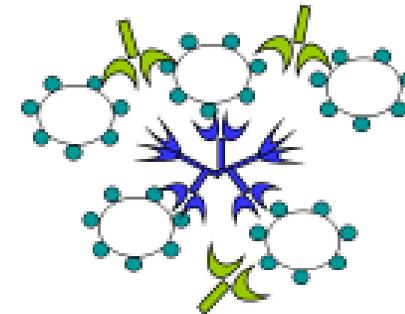
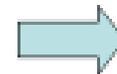
2 - Réaction Ag-Ac proprement dite



+



Sérum à tester (IgM et/ou IgG
agglutinantes anti-AgA)



Agglutination

Exemple d'application: recherche d'IgM-IgG anti-toxoplasme dans un sérum humain

IV) Réactions utilisant des réactifs marqués par des fluorochromes

1) les fluorochromes

Molécules qui absorbent de l'énergie à une λ_1 d'excitation. Elles réémettent cette énergie à une λ_2 d'émission $\rightarrow \lambda_2 > \lambda_1$.

Ex. de fluorochromes:

- Isothiocyanate de fluoresceine (FITC) \rightarrow Vert.
- Phycoérythrine \rightarrow Rouge.
- Rhodamine \rightarrow Orange.....

Les fluorochromes sont fixés sur les Ac par liaisons covalentes.

2) Immunofluorescence indirecte (IFI)

Technique permettant de rechercher:

- soit un **Ag particulaire** (cellules, bactéries...),
- soit un **Ac spécifique** dans un sérum.

On utilise un 2^{ème} Ac (**Ac anti-isotype**) couplé à un fluorochrome pour mettre en évidence le complexe Ag-AC.

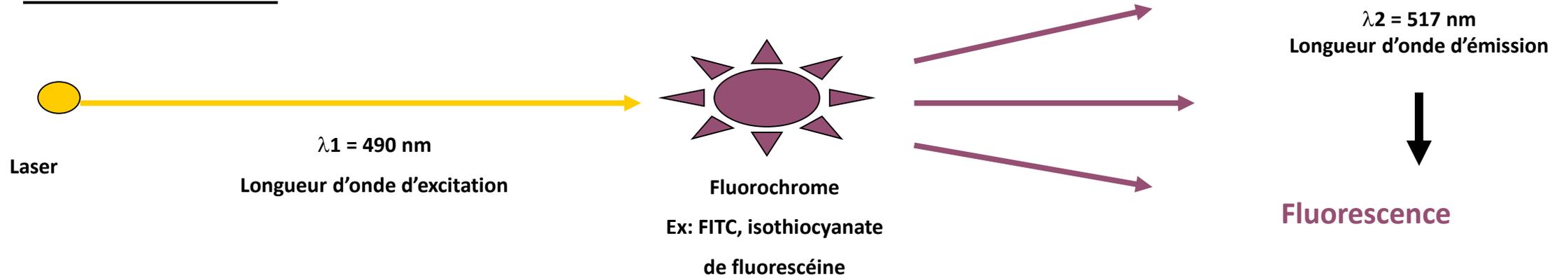
Lecture au microscope optique – UV ou en cytométrie de flux.

Sensibilité: mg L⁻¹

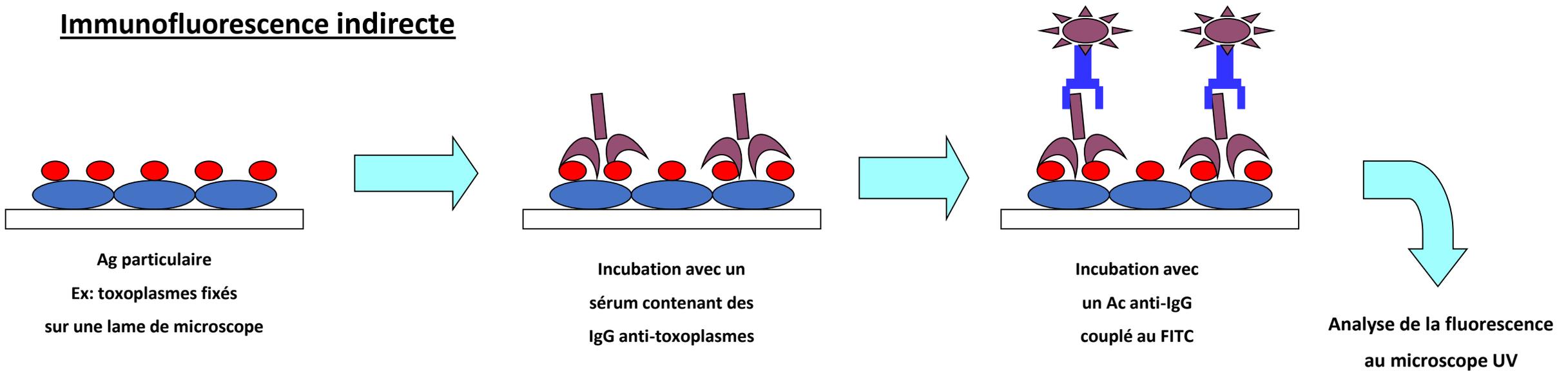
Ex. d'application: recherche d'IgG anti-toxoplasme dans le sérum.

Immunofluorescence

Les fluorochromes



Immunofluorescence indirecte



Exemple d'application: recherche d'IgG anti-toxoplasme dans un sérum

V) Réactions utilisant des réactifs marqués par un(e) enzyme (Ez)

1) Généralités

EIA: Enzyme Immuno Assay.

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

Dans ces techniques, soit l'Ag, soit l'Ac, est **couplé à un Ez** (Ac → Ez fixé au niveau du Fc par liaisons covalentes).

Ez les plus utilisées: **phosphatase alcaline, peroxydase.**

L'Ez est détecté après ajout de son **substrat** (généralement incolore = **chromogène**) → **produit coloré** = mesure de l'absorbance.

Sensibilité \approx ng L⁻¹.

Applications: **très nombreuses** et largement utilisées en pratique courante.

2) ELISA indirect

Recherche et/ou dosage d'un **Ac spécifique** dans le sérum.

Ag soluble pour lequel on recherche des Ac spécifique est **fixé sur un support solide**.

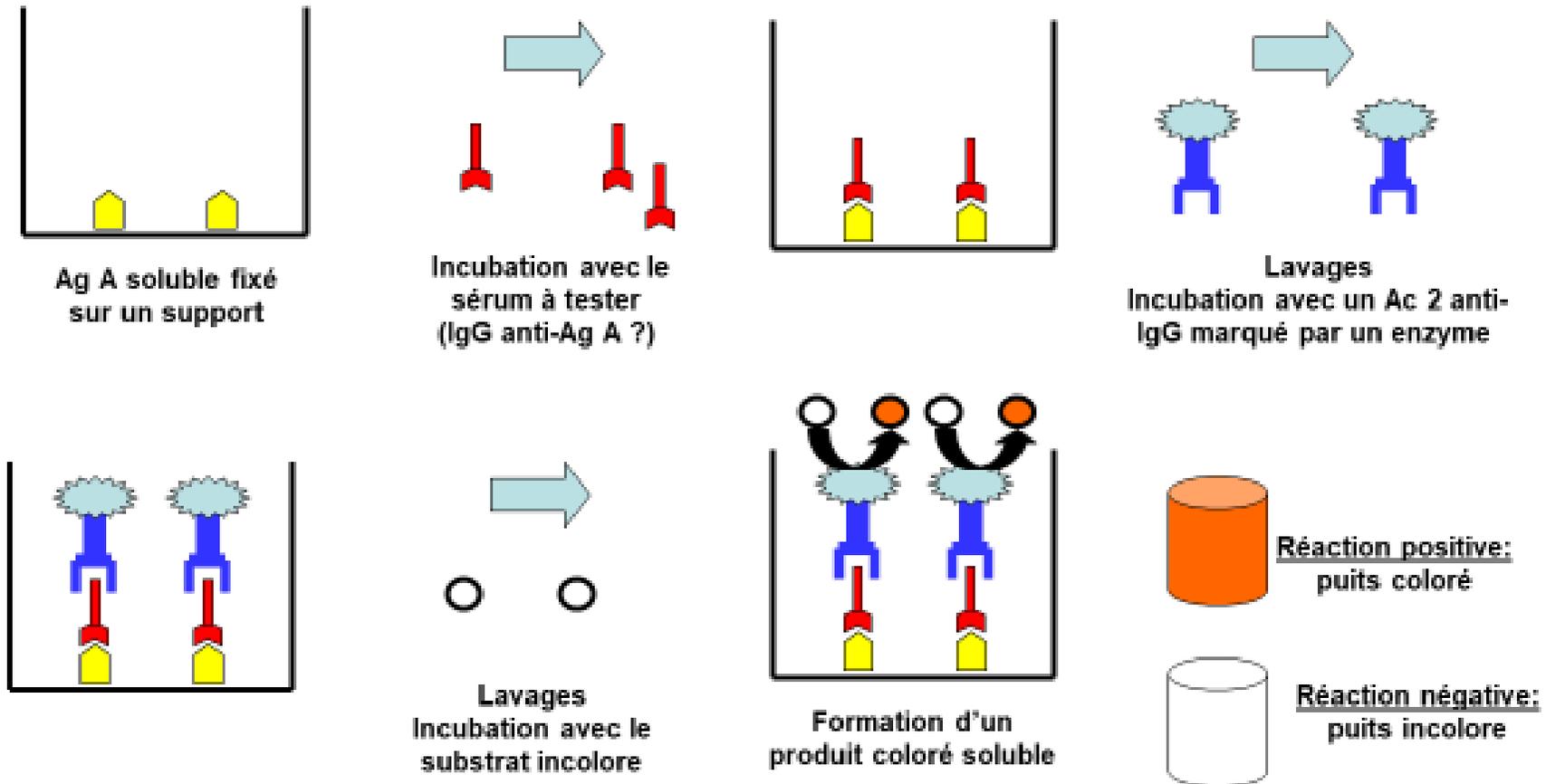
Utilisation d'un **2^{ème} Ac marqué par l'Ez** (Ac **anti-isotype** ou Ac secondaire).

L'absorbance est **proportionnelle** à la quantité d'Ac à doser.

Applications: **sérologies infectieuses** (ex: recherche d'IgG anti-rubéole).

Techniques immunoenzymatiques

ELISA indirect: recherche d'un Ac spécifique



Exemple d'application: recherche d'Ac IgG anti-rubéole