



Université Montpellier
Faculté de Pharmacie

Travaux Pratiques d'Immunologie

TP n°1

IUP L2

2017-2018

Responsable : Boudard Frédéric, Maître de Conférences, Immunologie
Assistance technique : Caroline Guzman

Principe des dilutions successives appliqué au titrage des Ac spécifiques

Le titrage des Ac spécifiques dans un sérum fait appel au principe des dilutions successives. A partir d'un sérum pur à titrer, on effectue des dilutions successives (au $\frac{1}{2}$, au $\frac{1}{4}$, etc....variables selon les techniques). Le sérum est ainsi dilué de façon croissante d'un tube à l'autre. Pour chaque dilution, on effectue une réaction Ag-Ac appropriée permettant de mettre en évidence la présence des Ac spécifiques recherchés. A partir de la gamme de dilutions, on définit le titre du sérum comme étant l'inverse de la plus grande dilution donnant encore une réaction Ag-Ac positive. Ainsi, plus le titre est élevé, plus le sérum contient un taux d'Ac spécifiques important. Le titrage est donc une méthode semi-quantitative. On peut également exprimer le taux d'Ac spécifiques en Unités Internationales/mL. Dans ce cas, on doit disposer d'un sérum étalon permettant de déterminer le taux des sérums inconnus.

Dans la figure 1 ci-dessous, nous avons représenté le principe des dilutions successives.

V_i représente le volume initial du sérum à diluer (prise d'essai) ;

V_f représente le volume final dans le tube après avoir dilué le sérum dans le diluant.

La dilution exprime le rapport V_i/V_f .

Exemple pour le tube 1 : $V_i = 0,5 \text{ mL}$ et $V_f = 1 \text{ mL}$ (0,5 mL de diluant + 0,5 mL de prise d'essai). La dilution dans le tube 1 est donc de 0,5mL/1 mL soit une dilution au $\frac{1}{2}$. Dans les tubes suivants, le facteur de dilution entre chaque tube est de 2 puisque la dilution est identique dans tous les tubes.

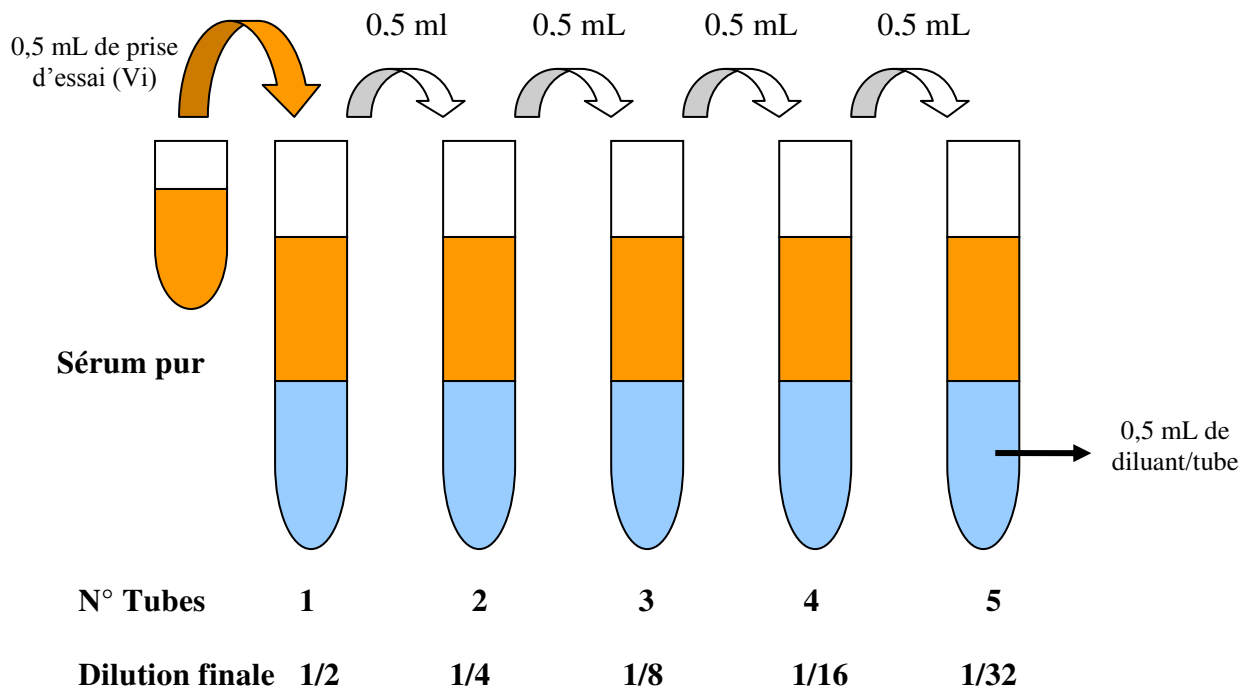


Figure 1 : Principe des dilutions successives pour le titrage des Ac spécifiques

Réaction d'agglutination active : titrage d'un sérum agglutinant de lapin anti-globules rouges de mouton

I Principe

Cette technique est basée sur le principe d'une agglutination directe entre un **Ag particulaire** (Ag : globule rouge de mouton, GRM) et un sérum immun provenant d'un animal immunisé (le lapin) et contenant des Ac spécifiques agglutinants (**IgM et certaines IgG**) vis-à-vis de cet Ag (figure 2). Ces Ac sont appelés des **agglutinines**.

Dans cette réaction, on effectue des dilutions successives du sérum à titrer dans un tampon de dilution. A chaque dilution, on ajoute une quantité fixe et connue d'antigène particulaire et on recherche la dernière dilution du sérum qui donne encore une agglutination visible à l'œil nu. L'inverse de cette dilution donne alors le titre du sérum en anticorps agglutinants spécifiques.

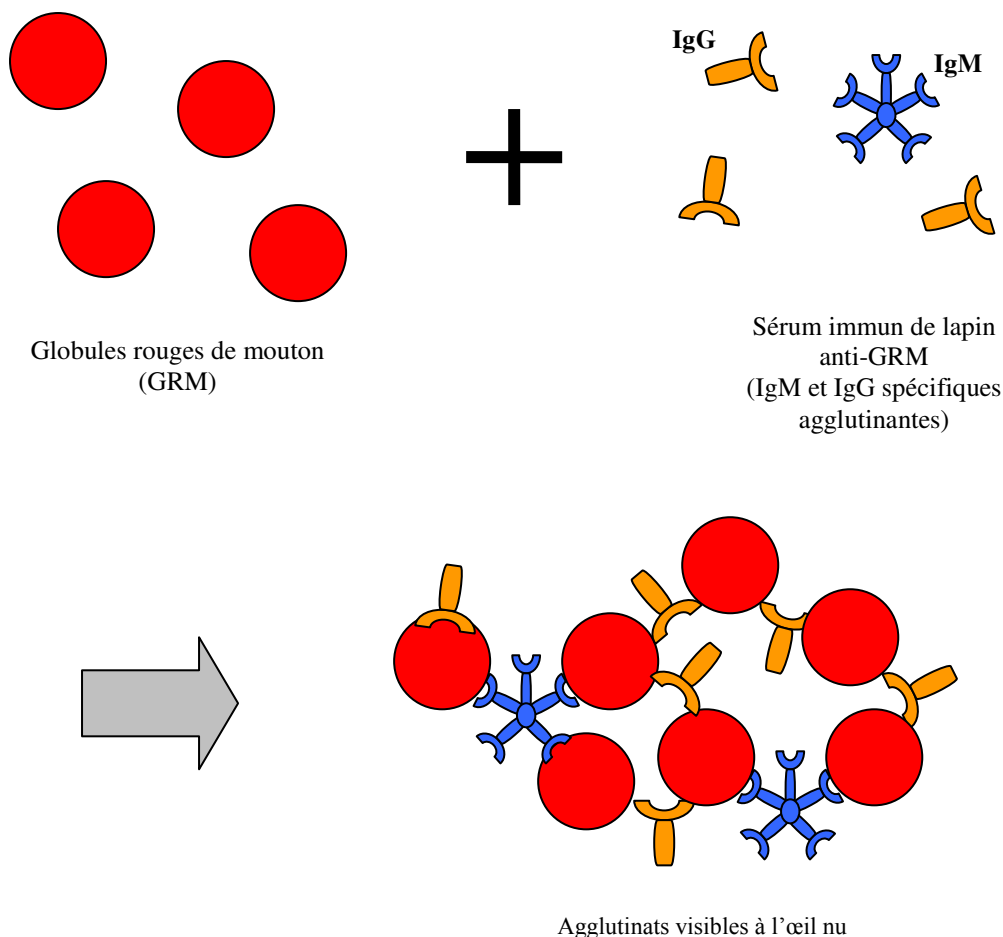


Figure 2 : Agglutination directe et active

II Manipulation

Au cours des TP, vous réaliserez le titrage d'un sérum de lapin contenant des anticorps spécifiques agglutinants (IgM et IgG) anti-globules rouges de mouton.

1) Réactifs

- **Sérum de lapin à titrer** (noter le numéro du sérum qui vous a été donné) ;
- **Soluté isotonique de chlorure de sodium** :
NaCl 9 g
Eau distillée qsp 1000 mL
- **Suspension de GRM à 50% (v/v)** : diluer cette suspension dans le soluté isotonique de NaCl de manière à obtenir une suspension de GRM à 0,2% (v/v).

2) Manipulation

- Numérotter les tubes à hémolyse de 1 à 5 et le tube témoin hématies (TGRM).
- Répartir les réactifs selon le tableau ci-dessous.
- A l'aide d'une pipette de 1 mL, répartir 0,8 mL de tampon (NaCl à 0,9%, p/v) dans le tube 1 et 0,5 mL dans tous les autres tubes.
- Distribuer 0,2 mL de sérum à titrer dans le tube 1 ; agiter puis prélever 0,5 mL du tube 1 que vous déposer dans le tube 2. Agiter puis diluer de 1/2 en 1/2 jusqu'au tube 5. Rejeter dans l'évier 0,5 mL du tube 5.
- Après avoir effectué toutes vos dilutions, changer de pipette de 1 mL et rajouter dans tous les tubes de 1 à 5 et le tube TGRM, 0,5 mL de suspension de GRM à 0,2% (v/v).
- Agiter délicatement tous les tubes et incuber au bain marie à 37°C pendant 45 minutes.
- Centrifuger tous les tubes et observer l'agglutination après avoir remis en suspension le culot globulaire.

Tubes	1	2	3	4	5	TGRM
Sérum	0,2 mL de sérum	0,5 mL tube 1	0,5 mL tube 2	0,5 mL tube 3	0,5 mL tube 4	0
NaCl à 0,9%	0,8 mL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
GRM à 0,2%	0,5 mL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Dilutions	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	-

3) Lecture et interprétation

L'Unité Hémagglutinante (Unité HA) correspond à la plus petite quantité de sérum pur capable d'agglutiner les hématies dans les conditions expérimentales définies. On recherche donc la plus grande dilution où l'on observe encore une hémagglutination : par définition, cette dilution est égale à 1 Unité HA (1 UHA) dans les conditions expérimentales.

-Après centrifugation, observer dans le tube témoin TGRM, l'absence d'hémagglutination. Ce tube ne doit pas être agglutiné car il ne contient pas d'Ac spécifiques.

-Rechercher ensuite dans les tubes 1 à 5, la présence éventuelle d'une hémagglutination. Noter le tube le plus dilué où l'on observe encore une hémagglutination : c'est à partir de ce tube que l'on calcule, selon la dilution, le titre du sérum de départ.

Exemple :

N° des tubes	1	2	3	4	5	TGRM
Dilution	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	--
Agglutination	+	+	+	-	-	-

Dans l'exemple ci-dessus, le témoin TGRM n'est pas agglutiné. On peut donc interpréter la manipulation. Le tube où l'on a 1 UHA est par définition, le tube 3. Le titre du sérum est donc de 20 UHA.

Le tableau ci-dessous représente différents résultats que l'on peut obtenir :

N° tubes	1	2	3	4	5	T	Résultats
Dilutions	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	-	
Sérum 1	+	-	-	-	-	-	5 UHA
Sérum 2	+	+	+	+	-	-	40 UHA
Sérum 3	+	+	+	+	+	-	≥ 80 UHA
Sérum 4	-	+	+	+	+	-	≥ 80 UHA
Sérum 5	-	-	-	-	-	-	< 5 UHA
Sérum 6	+	+	+	+	+	+	non interprétable (témoin agglutiné)

Résultat à rendre : numéro du sérum, dilutions ± agglutination, titre en UHA du sérum.

III Exemples d'applications en biologie clinique des techniques d'agglutination actives

1) Groupages sanguins

- Epreuve de Beth Vincent : recherche de l'Ag A ou B sur les hématies à typer.
- Epreuve de Simonin : recherche des Ac naturels anti-A ou anti-B des groupes sanguins dans le sérum.

2) Recherche d'Ac spécifiques

Réaction de Widal pour rechercher des Ac contre *Salmonella* (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes).

3) Recherche d'Ag

Identification de bactéries responsables d'infections et isolées de différents prélèvements biologiques à l'aide d'antisérums correspondants : *E. Coli*, *Salmonella*,...

Réaction d'agglutination passive : recherche de facteurs rhumatoïdes dans un sérum humain

I Principe de l'agglutination passive

L'agglutination est une réaction entre un **Ag particulaire** invisible à l'œil nu (bactéries, cellules, etc...) et un **Ac agglutinant (IgM et certaines IgG)** spécifiques de cet Ag. Elle se manifeste sous forme d'**agglutinats** visibles à l'œil nu.

L'agglutination est dite **active**, lorsque l'**Ag** utilisé est **particulaire**.

Elle est dite **passive** lorsque l'**Ag** utilisé est **soluble** : on le fixe artificiellement sur une particule inerte par des moyens physico-chimiques. Les particules utilisées sont le plus souvent des billes de latex (ou de polystyrène), des hématies humaines du groupe O ou des hématies animales. Dans ce cas, on recherche des Ac spécifiques dans le sérum (figure 3).

L'agglutination est dite **passive réverse** lorsqu'un Ac (polyclonal ou monoclonal) est fixé sur une bille de latex. Dans ce cas, on recherche dans un liquide biologique ou un prélèvement, un Ag soluble spécifique de cet Ac (figure 4).

On dit que l'agglutination est **directe** lorsque les **Ac** spécifiques sont **agglutinants**. Les **IgM** sont toujours agglutinantes ; pour les **IgG**, certaines sont agglutinantes alors que d'autres ne le sont pas.

On dit que l'agglutination est **indirecte** lorsque l'Ac spécifique est **une IgG non agglutinante** ; dans ce cas, on rajoute un deuxième Ac anti-IgG (appelé **antiglobuline** : sérum animal anti-IgG) qui va provoquer l'agglutination des particules recouvertes par les IgG non agglutinantes.

Au cours de ces TP, vous allez voir en démonstration, 2 techniques d'agglutination passive appliquées à la recherche dans un sérum de facteur rhumatoïde (auto-Ac d'isotype IgM anti-IgG).

II Recherche des facteurs rhumatoïdes de classe IgM dans le sérum humain par un test rapide d'agglutination sur carte de particules de latex (Arthri-Slidex®)

1) Introduction

Les facteurs rhumatoïdes (FR) ont été décrits initialement par Waaler et Rose, comme des immunoglobulines présentes dans le sérum de sujets atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR, maladie auto-immune) et qui agglutinent les globules rouges de mouton recouverts d'IgG de lapin. Ces FR sont des auto-Ac dirigés contre le fragment Fc des IgG humaines et animales. Ils appartiennent essentiellement à la classe des IgM.

La recherche de FR est importante pour le diagnostic de la PR. Cependant, les FR ne sont pas spécifiques de la PR. Ils ne sont pas détectés dans tous les cas de PR et peuvent être présents chez des sujets sains aussi bien que chez des patients atteints d'autres maladies.

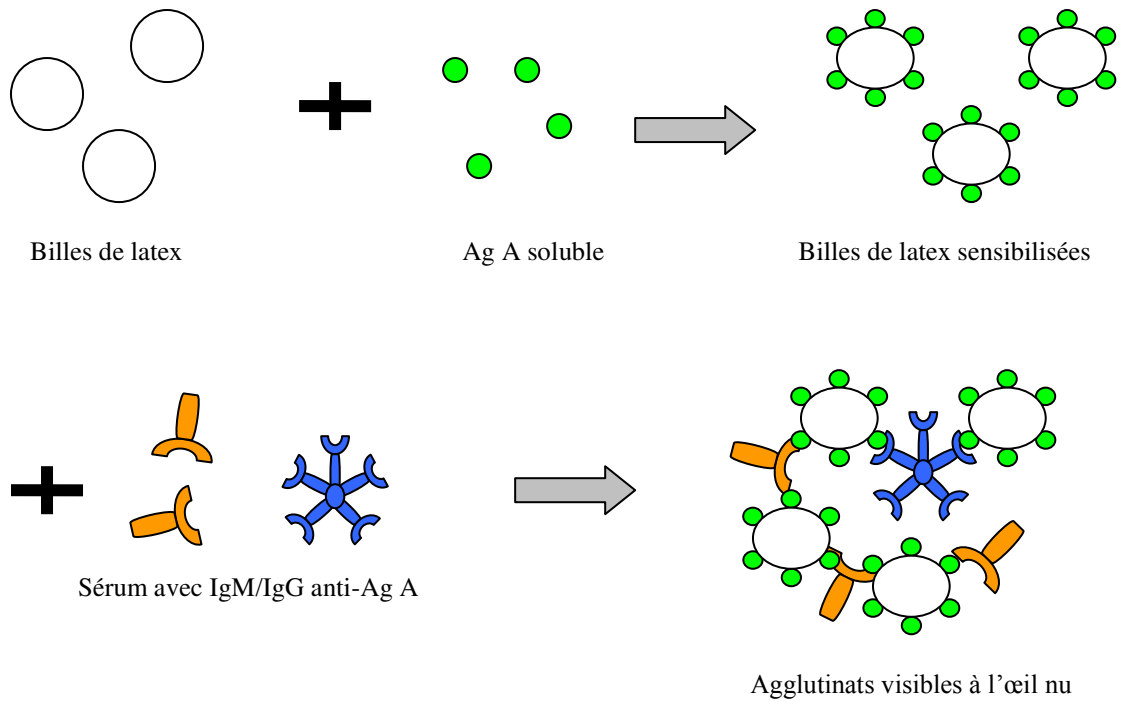


Figure 3 : Principe de l'agglutination passive

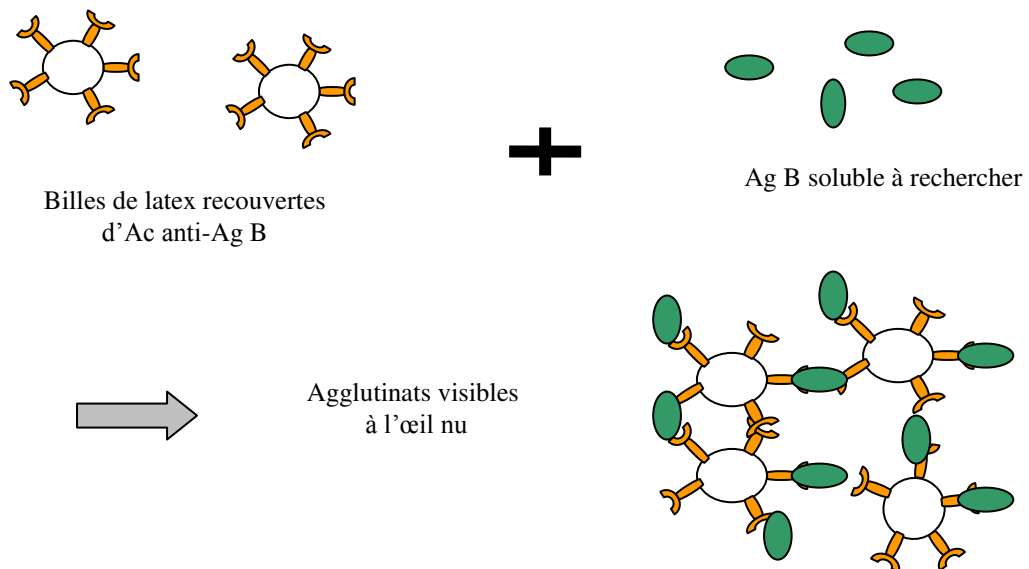


Figure 4 : Principe de l'agglutination passive inverse

Les différentes techniques utilisées peuvent être divisées en 2 groupes selon l'origine des IgG : soit des IgG animales (réaction de Waaler Rose), soit des IgG humaines (réaction dite au latex). Les réactions de Waaler rose sont plus spécifiques alors que les réactions au latex sont plus sensibles. L'ensemble de ces techniques ne met en évidence que les FR de classe IgM.

2) Principe

Il s'agit d'une réaction **d'agglutination passive** sur carte, en présence de FR (auto-Ac IgM anti-IgG à rechercher dans le sérum) et de **particules de latex sensibilisées par des γ globulines humaines** (figure 5).

3) Composition du kit Arthri-Slindex®

- **Réactif latex FR** : suspension de particules de latex sensibilisées par des γ globulines humaines et contenant de l'azote de sodium (1g/L). Le seuil de sensibilité est indiqué en UI/mL sur l'étiquette du flacon (voir remarque 1).
- **Sérum positif** : Ac agglutinants de lapin anti-IgG humain et contenant de l'azote de sodium (1g/L)(voir remarque 2).
- **Sérum négatif** : sérum ne contenant pas d'Ac agglutinants anti-IgG humain et contenant de l'azote de sodium (1g/L)(voir remarque 2).
- Tampon glycoColle 0,1 mol/L pH 8,2, NaCl 0,15 mol/L et contenant de l'azote de sodium (1g/L). Ce tampon sert à diluer les sérums à tester au 1/20.
- Cartes jetables à emplacements réactionnels.
- Agitateurs à usage unique.

Les réactifs sont stockés à 2-8°C.

Remarque 1 : l'absence d'Ag HBs, d'Ac anti-VIH1, anti-VIH2 et d'Ac anti-VHC a été vérifiée. Cependant, aucun test ne pouvant apporter une garantie absolue, ce produit doit être manipulé avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux.

Remarque 2 : ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise et/ou l'état sanitaire ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler).

Les réactifs contiennent un agent conservateur (azote de sodium) susceptible de réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre et de former des azotures métalliques explosifs. Il est recommandé de rincer à l'eau tout rejet.

4) Mode opératoire

- Attendre que les réactifs et les sérums à tester soient à température ambiante (18-25°C).
- Diluer les sérums à tester au 1/20^{ème} dans le tampon glycoColle.
- Déposer sur les emplacements successifs de la carte, 1 goutte de sérum positif, 1 goutte de sérum négatif et 50 μ L de la dilution à tester.
- Remettre en suspension, le réactif latex FR.
- A coté de chaque dépôt, ajouter une goutte de réactif latex FR.
- Mélanger en étalant bien, chaque emplacement à l'aide d'un agitateur différent.
- Imprimer à la carte un lent mouvement de rotation. Observer l'apparition éventuelle d'une agglutination en 2 minutes.

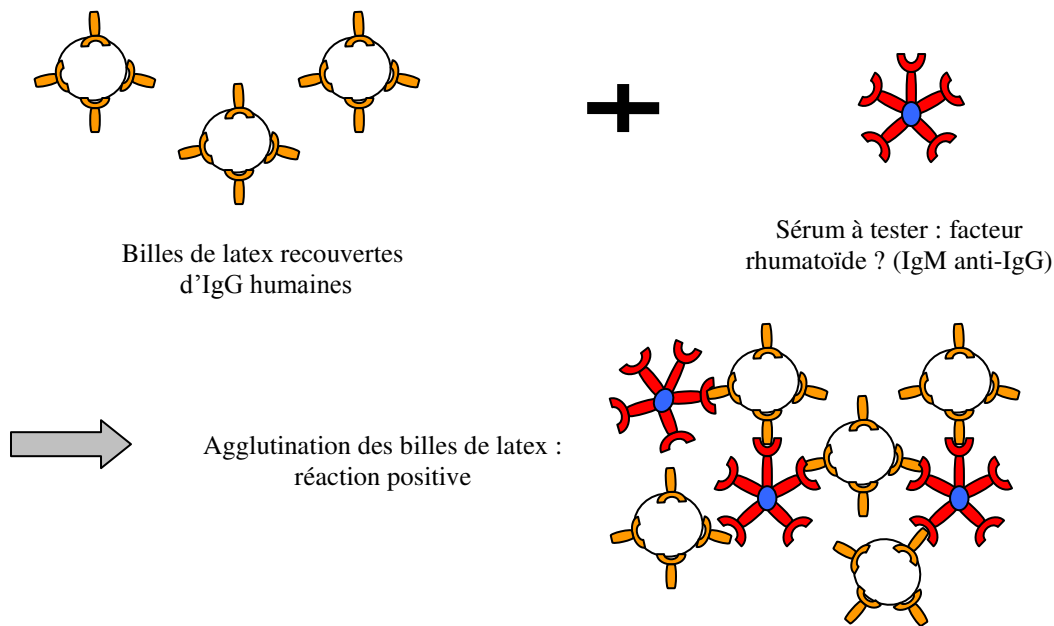


Figure 5 : Recherche du facteur rhumatoïde par un test d'agglutination passive au latex

Technique semi-quantitative : en cas de réaction positive, poursuivre à partir de la dilution au $1/20^{\text{ème}}$, une série de 5 dilutions de raison 2 en tampon glycolle.

5) Lecture-Résultats-Interprétation

Réaction négative (suspension homogène) : absence de FR ou présence à un taux inférieur au seuil de sensibilité.

Réaction positive (agglutination) : présence de FR dont la concentration peut être estimée grâce à la technique semi-quantitative.

Technique semi-quantitative : le titre du sérum en FR, exprimé en UI/mL, est obtenu en multipliant l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive, par le seuil de sensibilité. En cas de réaction pour la dernière dilution, poursuivre les dilutions. En cas de positivité du test, il est possible de confirmer le résultat par une réaction de type Waaler Rose.

L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique et éventuellement des résultats d'autres tests.

6) Contrôle de qualité

Un contrôle de qualité doit être effectué à l'ouverture d'un nouveau coffret et sur chaque série de tests. Le sérum positif doit agglutiner dans les 2 minutes ; le sérum négatif ne doit pas présenter d'agglutination. Si les résultats de ces sérums ne sont pas conformes, la série n'est pas validée.

7) Valeurs attendues

Dans le cas de PR suspectée cliniquement, les FR sont détectés dans 80% des sérums de patients. Les formes séropositives sont généralement plus graves que les formes séronégatives.

8) Limites du test

En dehors de la PR, des FR peuvent être retrouvés chez 1 à 3 % des sujets sains et chez certains sujets atteints de LED, d'hépatite, de cirrhose du foie, de syphilis.....

III Exemples d'applications en biologie clinique des techniques d'agglutination passive

1) Agglutination passive

- recherche d'Ac anti-rubéoleux (rubéole) dans un sérum ;
- recherche d'auto-Ac anti-thyroglobuline (thyroïdite de Hashimoto) dans un sérum.

2) Agglutination passive inverse

- recherche de rotavirus dans les selles (gastroentérites infantiles).

Réaction d'immunoprécipitation

Application : dosage de la protéine C3 du complément dans le sérum par la technique d'immunodiffusion radiale (Technique de Mancini)

I Principe de l'immunoprécipitation

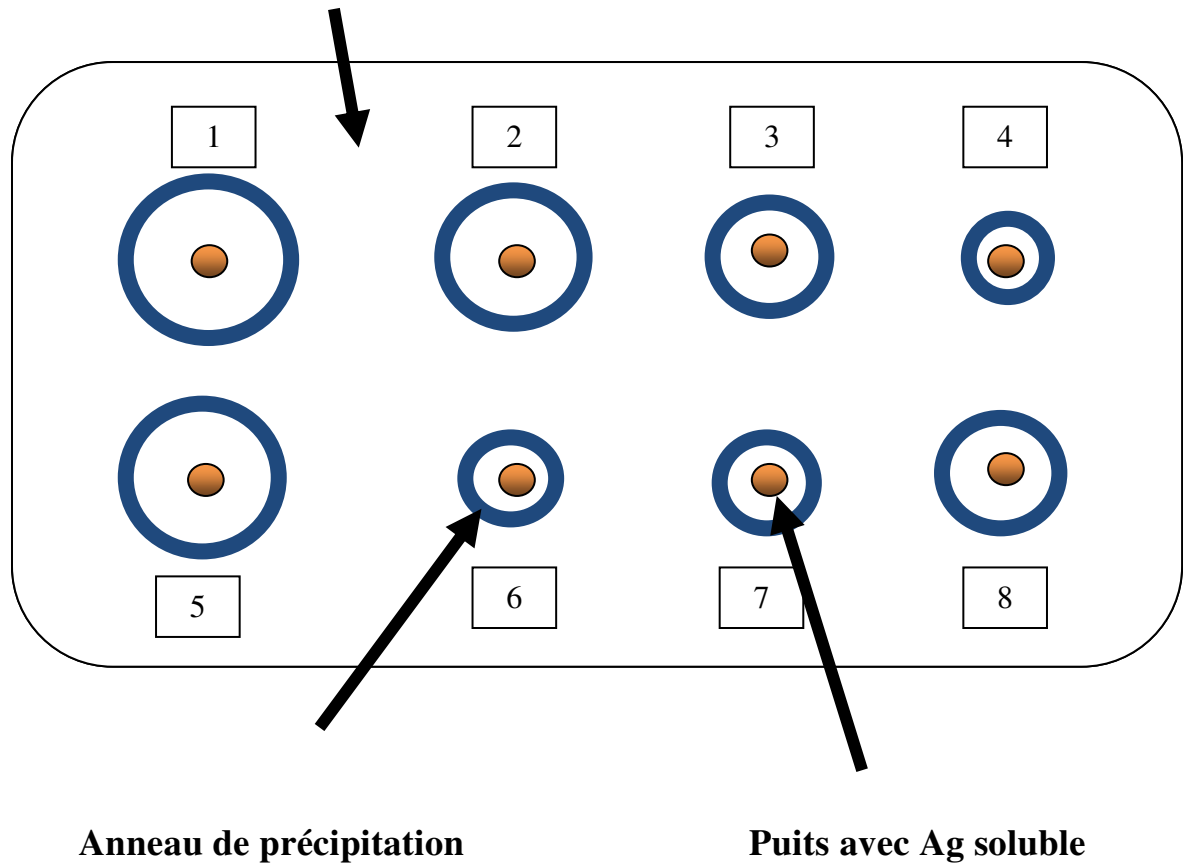
La réaction de précipitation apparaît en milieu liquide (immunonéphélométrie laser, turbidimétrie) ou gélifié (Mancini) lors de l'interaction entre un **Ag soluble** présent dans un liquide biologique et un sérum contenant des **Ac précipitants appelés précipitines (IgM et IgG)** spécifiques de cet Ag. Cette précipitation de nature immunologique, est due à la formation d'un édifice macromoléculaire tridimensionnel appelé réseau, entre les Ag et les Ac spécifiques (théorie du réseau de Marrack, 1934). La formation du précipité dépend de plusieurs facteurs :

- l'**Ac** doit être au moins **bivalent**. Un Fab ne donne pas de précipité. Seuls les sérums polyclonaux contenant un mélange d'Ac spécifiques, donnent des réactions de précipitation. Les Ac monoclonaux ne peuvent pas précipiter. Les IgG sont plus efficaces que les IgM. Les IgA, IgE et IgD ne précipitent pas en présence de leur Ag spécifique;
- l'**Ag** doit être **soluble** et au moins **bivalent**. Il doit posséder 2 épitopes capables d'être reconnus par les différents Ac du sérum polyclonal. Un haptène seul ne peut pas donner des réactions de précipitation ;
- les **conditions physico-chimiques** du milieu réactionnel sont le pH, la force ionique, la température et le volume réactionnel ; ces différents paramètres peuvent modifier la stabilité du complexe Ag-Ac ou la solubilité du précipité.

II Principe de l'immunodiffusion radiale ou technique de Mancini

Cette **technique quantitative** repose sur la **diffusion radiale d'un Ag** selon un gradient de concentration décroissant, à partir d'un puits cylindrique creusé dans un **gel d'agarose contenant un Ac** mono spécifique **vis-à-vis de cet Ag**. La formation de complexes Ag-Ac donnera lieu à un cercle de diffusion autour du puits. La taille du cercle augmentera jusqu'à la zone d'équilibre entre la concentration en Ac et la concentration en Ag (figure 8). Au point final de diffusion, il existe une relation linéaire entre le carré du diamètre de l'anneau de diffusion et la concentration en Ag dans le puits. On établit une courbe de calibration en mesurant les diamètres des anneaux obtenus à partir d'échantillons de concentrations connues. La concentration en Ag d'un échantillon inconnu sera lue directement à partir de la courbe de calibration (figure 9).

Gélose d'agarose avec Ac mono spécifique



→ Puits 1, 2, 3 et 4 : gamme étalon avec solutions d'Ag solubles (concentrations décroissantes).

→ Puits 5, 6, 7 et 8 : solutions inconnues d'Ag solubles.

Figure 6 : technique d'immunodiffusion simple de Mancini

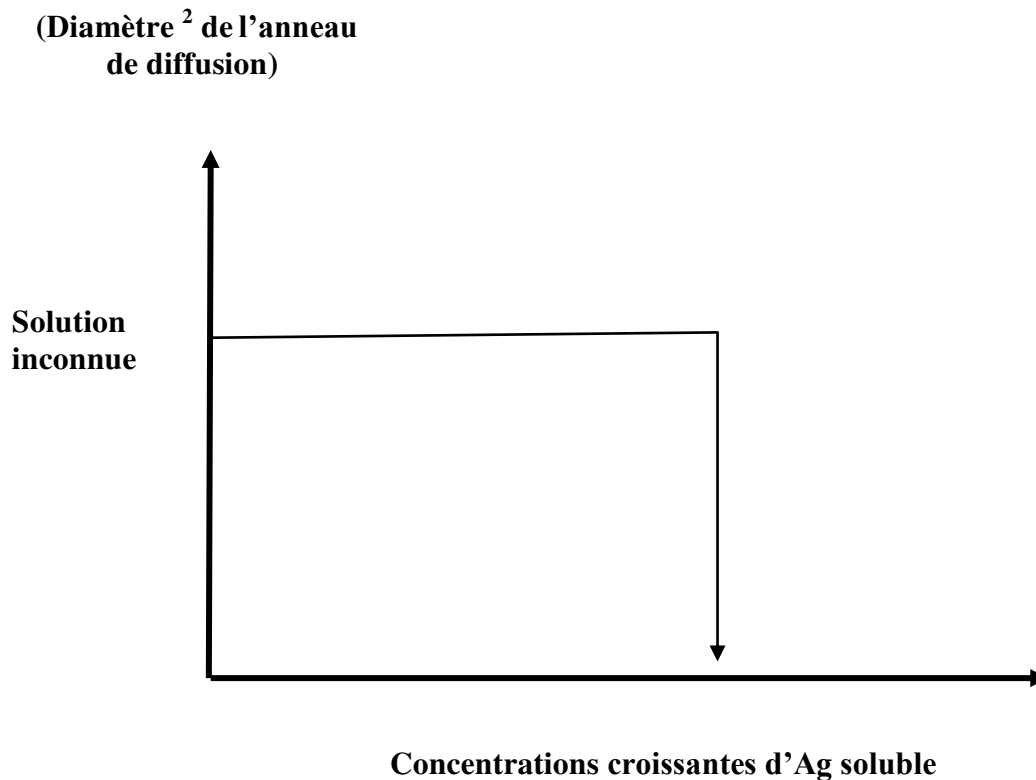


Figure 7 : courbe de calibration

III TP : dosage du C3 dans le sérum humain par la technique de Mancini

- Les étudiants n'auront pas la manipulation à faire. Seule l'interprétation est effectuée par les étudiants. Le dosage du C3 à l'aide d'un kit Binding Site (BindaridTM), a été réalisé selon la procédure n° 2 (voir document joint).

1) A l'aide de la loupe avec règle millimétrée, mesurer le diamètre des anneaux de diffusion. Chaque échantillon est réalisé en double.

Gamme étalon :	puits 1 et 2 :	C3 = 155 mg/L
	puits 3 et 4 :	C3 = 930 mg/L
	puits 5 et 6 :	C3 = 1550 mg/L
Contrôle C3 :	puits 7 et 8 :	= 1008 mg/L
Echantillon inconnu 1 :	puits 9 et 10 :	à déterminer
Echantillon inconnu 2 :	puits 11 et 12 :	à déterminer
Echantillon inconnu 3 :	puits 13 et 14 :	à déterminer.

2) Sur une feuille de papier millimétrée, tracer la courbe de calibration en portant en ordonnée le diamètre² en mm des anneaux de diffusion que vous avez lu, et en abscisse, les concentrations connues de C3 (gamme étalon, puits 1 à 6, moyenne des 2 valeurs lues).

Vérifier la concentration de votre contrôle C3 (puits 7 et 8).

Déterminer à partir de votre courbe de calibration, les concentrations en C3 des 3 échantillons inconnus.

IV Exemples d'applications en biologie clinique des techniques d'immunoprécipitation

1) En milieu liquide (immunonéphélométrie laser, Immunoturbidimétrie)

Ces techniques **quantitatives** sont largement utilisées pour doser soit un isotype d'Ac, soit des protéines sériques :

- protéine C réactive (CRP, protéine inflammatoire) ;
- protéines du complément : C3, C4 ;
- dosage des IgG, des IgA ou des IgM totales ;
- dosage du facteur rhumatoïde, etc.....

2) Technique de Mancini

Cette technique **quantitative** peut être utilisée pour doser dans les liquides biologiques, les protéines du complément (C1q, C2, C4....) ou les protéines de la coagulation (fibrinogène, antithrombine III,...).