

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et de la Recherche Scientifique

Université Akli Mohand Oulhadj - Bouira -

Tasdawit Akli Muḥend Ulḥağ - Tubirett -

Faculté des Sciences de la Nature  
et de la Vie et des Sciences de la Terre



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة أكلي محمد أولحاج

- البويرة -

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأمراض

# Polycopié pédagogique

## Techniques Immunologiques et de Marquage

**CHERGUI Achour**

**Département de BIOLOGIE**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Sciences de la Terre**

**Cours destiné aux étudiants de**

**Master 1 Biochimie Appliquée**

2022 / 2023

## **Avant-propos**

Les propriétés de la réaction immunologique à travers la spécificité des interactions imposée par les structures conformationnelles des protéines, a incité les chercheurs à les explorer comme outils analytique très performant. A partir de la découverte de la formation de précipités visibles à travers l'interaction entre un anticorps et son antigène spécifique sur milieu liquide, les immunologistes se sont motivés pour rendre cet évènement comme précurseur de techniques mises au point ultérieurement. Effectivement, la réaction antigène/anticorps sur laquelle sont basées les réactions de défense de l'organisme ont été étudiées par la suite sur milieu solide gélifié puis sur support solide (papier, microplaque, lame de verre,...), dans une direction d'études motivées par l'amélioration de la sensibilité et de la détection des molécules d'intérêt. D'un milieu réactionnel liquide puis solide gélifié puis sur support, c'est la nature du complexe formé qui est révélé à chaque fois par un mécanisme différent. Plus tard, des techniques de haute sensibilité utilisant des moyens chimiques plus complexes ont été mises au point, notamment à travers l'emploi d'isotopes radioactifs (radio-immunologie), de marqueurs enzymatiques (immuno-enzymologie) voir même de fluorochromes (immuno- fluorescence), permettant de quantifier à un haut degré, les antigènes ou les anticorps, selon les cas. D'autre part, la combinaison entre les techniques immunologiques et d'autres moyens, tels que outils technologiques, ceux de la biologie moléculaire ainsi que ceux de la biochimie analytique, a donné naissance à des méthodes modernisées tel que la cytométrie en flux, la PCR-ELISA et le western blot, respectivement. Cependant le pas le plus important a été celui de la production des anticorps monoclonaux qui a mis au service de l'immunologie, des outils ultra-spécifiques augmentant la fiabilité des immuno-dosages.

Ce support de cours englobe ainsi l'ensemble des techniques immunologiques et de marquage, des plus simples aux plus complexes et plus performantes, utilisées actuellement dans plusieurs domaines de la recherche scientifique ainsi que dans les analyses de routine pour le diagnostic et le dosage immuno-chimique.

M. CHERGUI Achour

## Table des matières

Avant-propos

Introduction .....	1
1-Rappels et notions d'immunologie fondamentale.....	2
1-1-Rappels sur les antigènes .....	2
1-2-Rappels sur les anticorps.....	3
1-3-la réaction antigène – anticorps (Ag-Ac) .....	5
2-La production des anticorps monoclonaux (de première génération) .....	8
3-Techniques immunologiques utilisant les réactions visibles.....	10
3-1-La précipitation .....	10
3-1-1-Techniques de précipitation en milieu liquide .....	10
3-1-1-1-Technique de Heidelberg .....	11
3-1-1-2-La réaction en anneau (Ring test).....	12
3-1-2-Techniques de précipitation en milieu gélifié .....	13
3-1-2-1-L'immunodiffusion simple (Technique d'Oudin).....	13
3-1-2-2-L'immunodiffusion radiale (Technique de Mancini).....	14
3-1-2-3-L'électroimmunodiffusion simple (Méthode de Laurell) .....	15
3-1-2-4-L'immunodiffusion double.....	15
3-1-2-5-Immunoélectrophorèse (Technique de Grabar et Williams).....	17
3-1-2-6-Immunoélectrophorèse bidimensionnelle (croisée).....	18
3-2- Les techniques utilisant le complément .....	19
3-2-1-Réaction de déviation du complément .....	19
3-2-2-Mise en évidence d'Ag membranaire.....	20
3-2-3-Recherche d'Ac cytotoxiques.....	20
3-3-Les techniques d'agglutination .....	21
3-3-1-Test de Coombs direct .....	22
3-3-2-Test de Coombs indirect .....	23
4-Techniques de marquage .....	23
4-1-Techniques radio-immunologiques .....	24
4-1-1 La RIA (Radio Immunology Assay).....	24
4-1-2-La Radio-Immuno-Sorbent-test (RIST).....	26
4.2 Les techniques d'immunofluorescence .....	26
4-3-La cytométrie de flux.....	28
4-4-Technique du tri cellulaire immuno-magnétique.....	30

4-5- Les techniques immuno-enzymatiques.....	30
4-5-1-Les marqueurs employé.....	30
4-5-2-Technique d'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	31
4-5-2-1-Technique ELISA compétitive.....	32
4-5-2-2-Le test ELISA en Sandwich.....	32
4-5-2-3-Identification et dosage d'un Ac par la technique ELISA.....	33
4-5-2-4-La technique de l'Enzyme Linked Immuno spot (ELISPOT).....	34
4-5-3-L'immuno-empreinte ou Western Blot.....	35
4-5-4-La PCR-ELISA.....	36
Partie exercices corrigés.....	37

Références bibliographiques

## Introduction

L'utilisation des bases de l'immunologie comme outil analytique s'avère pertinent. Aujourd'hui, la réaction antigène – anticorps est exploitée dans le but de mettre en évidence, dans un mélange, des substances de nature et de fonctions variées.

Dans le domaine du diagnostic médical, c'est soit la recherche d'un antigène responsable d'une pathologie (microbienne ou tumorale), par un anticorps dirigé contre ce dernier, soit encore, la détection d'anticorps, parfois dirigés contre le soi et induisant des pathologies auto-immunes. Dans ce cas, on utilise l'antigène purifié spécifique de l'anticorps, comme réactif de laboratoire.

L'efficacité d'une technique immunologique dépend de plusieurs facteurs :

Avoir un anticorps spécifique d'un antigène recherché pose parfois des problèmes d'interférence, néanmoins, aujourd'hui, le problème est résolu par la mise en place d'anticorps monoclonaux, c'est-à-dire un Ac dirigé spécifiquement contre un déterminant antigénique ciblé, communément appelé épitope.

D'autre part, c'est la stabilité de la réaction Ag-Ac qui affecte la technique mise en place. Cette stabilité de nature physico-chimique dépend des conditions réactionnelles, à savoir, la concentration des réactants, le pH, la température et l'agitation.

En plus de l'affinité Ag – Ac, la visibilité est un autre critère influençant le choix d'une technique immunologique, faisant ainsi sortir deux catégories de méthodes :

Les méthodes dites visibles ou utilisant les réactions visibles, c'est-à-dire, le résultat de la réaction est observé à l'œil nu. On distingue les techniques d'agglutination et les techniques de précipitation.

Les méthodes de marquage ou utilisant un marquage, dont l'observation du résultat nécessite l'ajout d'un réactif rendant visible, la réaction Ag-Ac. Là aussi on distingue en fonction du type de marquage, les méthodes immuno-enzymatiques, les méthodes d'immunofluorescence et les méthodes radio-immunologiques.

Grace à l'utilisation de supports solides pour fixer l'Ac ou l'Ag, de gels de séparation électrophorétique ou même des techniques de biologie moléculaires associées, d'autres variantes de techniques sont actuellement apparues et très utilisées dans différents secteurs, il s'agit notamment du Western Blot ; l'immunochromatographie ; l'immunoélectrophorèse ; la PCR-ELISA ; ...etc.

Enfin selon l'objectif de l'analyse, les techniques immunologiques peuvent être qualitatives ou semi-quantitatives.

# 1-Rappels et notions d'immunologie fondamentale

## 1-1-Rappels sur les antigènes

Ce sont des substances ou des particules étrangères au soi stimulant par leur contact, l'activation des systèmes de défense/rejet de la part de l'organisme. Ainsi on distingue les *haptènes* (antigènes non immunogènes), les *xéno-antigènes* (antigènes issus d'une espèce différente), les *allo-antigènes* (propres à des individus différents dans la même espèce), les *auto-antigènes* (propres à un individu donné) et les *néo-antigènes* (formés *de novo* par transformation de l'antigène originel ou issus de la combinaison de plusieurs molécules). Les auto-antigènes peuvent être à l'origine de maladies auto-immunes lorsqu'ils sont associés à un signal de danger. D'autres part, les *allergènes* sont des antigènes de l'environnement qui sont responsable de l'apparition de réaction immunologique intense chez les sujets dits hypersensibles [1].

Les antigènes peuvent être de nature chimique diversifiée ; à savoir les protéines étrangères, les acides nucléiques, certains lipides et de nombreux polysaccharides surtout d'origine microbienne (polysaccharides capsulaires des pneumocoques). Parmi toutes ces substances, ce sont les protéines qui constituent les antigènes les plus puissants. D'ailleurs les microorganismes (bactéries, virus, mycètes, protozoaires) sont les plus fréquentes sources d'antigènes fortement immunogènes, à cause de la composition de leurs paroi, membrane ou capsule (pour les bactéries et les mycètes) ou capsid (pour les virus).

Le pouvoir antigénique d'une molécule repose à la fois sur sa taille (poids moléculaire, PM) et sur la complexité de sa structure. Seules certaines parties d'un antigène complet, appelées **déterminants antigéniques, ou épitopes**, sont antigéniques. Les anticorps libres ou bien les lymphocytes T activés via leurs récepteurs (TCR) peuvent fixer les épitopes selon une reconnaissance moléculaire proche de celle des réactions enzymatiques (liaison d'une enzyme à son substrat spécifique) par complémentarité de la structure tridimensionnelle sans pour autant qu'il ait formation de liaisons covalentes.

Il existe chez la plupart des antigènes naturels, plusieurs épitopes différents dont certains sont plus aptes que d'autres à provoquer une réaction immunitaire. Vu la capacité de reconnaissance de chaque épitope par un lymphocyte différent, un seul antigène polyépitopique peut mobiliser contre lui plusieurs clones de lymphocytes et stimuler la formation d'une grande variété d'anticorps.

L'ensemble des propriétés des antigènes peut avoir un impact dans différents domaines de leur utilisation pratique, que ce soit dans le cadre de la biologie médicale (dosages de protéines,

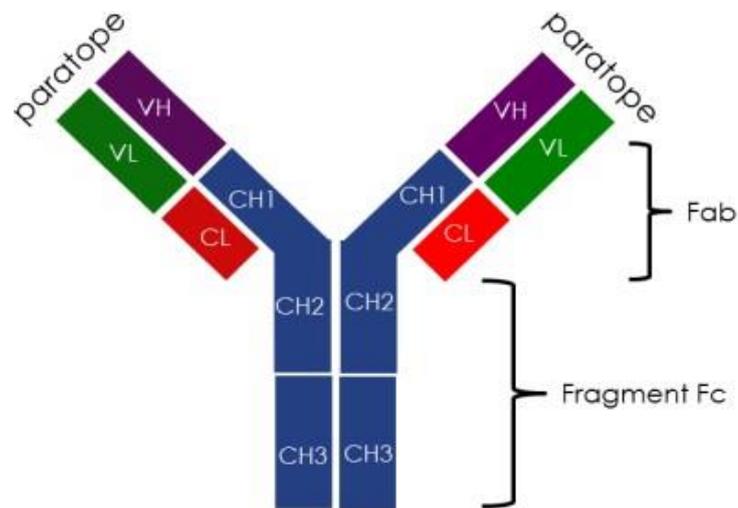
d'anticorps), de la recherche scientifique (modèles expérimentaux), de la vaccination ou de l'utilisation de molécules biologiquement actives (immunothérapies). Différentes méthodes de dosage des anticorps sont décrites, en phase liquide ou en phase solide (sur un support). En phase solide, il faut s'assurer que l'épitope n'est pas masqué ou altéré par perte des structures conformationnelles.

### 1-2-Rappels sur les anticorps

Aussi appelés **immunoglobulines (Ig)** par rapport à leur nature chimique et leur structure spatiale (protéines globulaires) ainsi que selon leur fonction biologique (défense immunitaire), les anticorps constituent la fraction des gammaglobulines ( $\gamma$ -globulines) apparue sur l'électrophorégramme des protéines sériques du sang. Les anticorps sont des protéines sécrétées par les lymphocytes B activés ou par des plasmocytes (lymphocytes B matures) en réponse à la présence d'un antigène et à sa reconnaissance par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les Ig sont capables de se combiner de façon spécifique avec l'Ag.

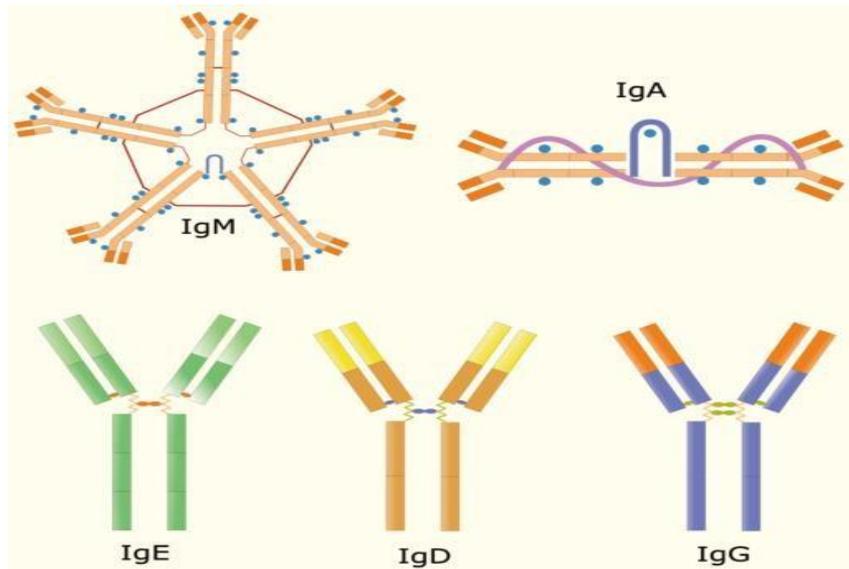
Malgré leur variété, tous les anticorps appartiennent à l'une des cinq classes d'Ig établies selon leur structure et leur fonction.

La figure ci-dessous montre la structure générale d'une immunoglobuline.



**Figure 1-1** : Structure générale d'une immunoglobuline [2]

La figure ci-après représente les structures schématisées des différentes classes d'anticorps.



**Figure 1-2:** Structures schématisées des différentes classes d'immunoglobulines (Source : [Antibody Sequencing Service | Hybridoma Sequencing - Ushelf](#)).

Parmi les différentes classes d'Ac, les IgG sont les molécules modèles les plus utilisées comme des outils analytiques ou thérapeutiques. Il s'agit de protéines stables dans la circulation sanguine ayant dotées d'une demi-vie moyenne de 20 jours. Cette biodisponibilité importante est assurée par le recyclage cellulaire des IgG circulantes grâce à l'existence du récepteur FcRn (*n* pour néonatal) porté par l'endothélium vasculaire. Il s'agit d'un récepteur qui se combine aux molécules d'IgG entre les domaines CH2 et CH3 du fragment constant (*Fc*). La liaison de l'anticorps à son récepteur se fait pendant la pinocytose à l'intérieur des endosomes dans des conditions de  $pH < 6,5$ . Le complexe formé (IgG-FcRn) est ensuite relargué hors de la cellule et dans la circulation du sang, suite à la jonction de l'endosome avec la membrane cellulaire de l'endothélium. Les IgG se détachent ainsi du récepteur FcRn à pH physiologique. Des petites quantités d'IgG sont libérées par transcytose, dans les cellules des tissus avoisinant les vaisseaux sanguins, garantissant une distribution des IgG tissulaires.

Le FcRn est également exprimé dans d'autres organes : il intervient dans le passage transplacentaire des IgG, dans l'immunité mucoale intestinale (passage des IgG dans la lumière intestinale) et dans l'exclusion des IgG du système nerveux central et des urines. La figure suivante illustre le mécanisme du recyclage des IgG.



hydrophobes (AA aromatiques, chaînes latérales des AA neutres ayant tendance à se rapprocher dans l'espace, les unes des autres, c'est le cas des acides aminés : alanine, isoleucine, leucine, méthionine, phénylalanine, proline, tryptophane et valine) ; les *liaisons de Van Der Waals* : Interactions résultant des mouvements d'électrons de deux molécules (forces créées par interaction entre différents nuages électroniques).

La réversibilité de la réaction de fixation entre l'Ag et l'Ac sur un déterminant bien précis est exprimée comme suit :  $Ag + Ac \rightleftharpoons Ag-Ac$ . De ce fait, assimilée à un équilibre réactionnel, la réaction immunologique est orientée vers un sens ou un autre, en fonction de la force de liaison entre l'Ag et son Ac qui dépend de la concentration de l'Ag et de celle de l'Ac. Cette force de liaison est quantifiée par la constante d'association (ou d'affinité) :  $K_a$ .

La constante d'affinité est définie comme suit :

$$K_a = [AgAc] / [Ac] [Ag]$$

La somme des liaisons chimiques entre l'Ag et l'Ac définit la force d'interaction entre l'antigène et l'anticorps. L'affinité de l'anticorps est évaluée par la  $K_a$  qui s'exprime en  $L/mol(L \cdot mol^{-1})$ . Ainsi, un anticorps de faible affinité possède une  $K_a$  proche de  $10^{-4} L \cdot mol^{-1}$  et un anticorps de haute affinité, une  $K_a$  proche de  $10^{12} L \cdot mol^{-1}$  [4].

Les immunoglobulines portent au minimum deux paratopes semblables, capables de reconnaître les mêmes épitopes, si ceux-ci sont répétés au sein du même antigène ou présents sur deux antigènes proches. La valence antigénique correspond au nombre de molécules d'un épitope donné pouvant être reconnues simultanément par des anticorps qui lui sont spécifiques. L'accès des paratopes aux épitopes est par ailleurs contraint par la notion d'encombrement stérique. La valence antigénique est ainsi toujours inférieure ou égale au nombre d'épitopes. L'avidité représente la résultante des différentes forces d'interaction engagées entre les anticorps et les épitopes. La force d'interaction globale d'un anticorps avec sa cible dépend alors du nombre de paratopes qu'il peut engager. Ainsi, une IgM, de conformation pentamérique, qui peut engager ses dix paratopes lors de l'interaction avec un antigène, a une force d'interaction (avidité) plus importante que celle d'une IgG qui ne peut engager que deux paratopes identiques.

Quand la moitié des sites sont occupés :  $[AgAc] = [Ac]$ , la  $K_a = 1/[Ag]$ .

La force de l'interaction antigène / anticorps se mesure par un paramètre appelé affinité. L'affinité d'un anticorps peut se définir comme la somme des forces de liaison et de répulsion entre un épitope et un paratope. Elle correspond en fait au ratio entre la vitesse de dissociation ( $k_{off}$ ) et la vitesse d'association ( $k_{on}$ ) d'un paratope pour un épitope, lorsque l'interaction antigène / anticorps atteint un équilibre.

La valeur du ratio à l'équilibre, appelée affinité ou constante de dissociation ( $KD=k_{off}/k_{on}$ ), représente la concentration molaire d'antigène nécessaire pour occuper 50% des paratopes. Dans des conditions physiologiques, les anticorps sont au minimum bivalents et les antigènes sont eux aussi souvent multivalents (bactéries, virus, cellules tumorales, ...). Cette multivalence influence fortement les interactions antigènes / anticorps. Ainsi, le paramètre d'affinité n'est souvent pas représentatif de la réalité physiologique et son calcul tient compte uniquement d'une interaction monovalente.

Par conséquent, dans un contexte physiologique, on préfère parler d'avidité (ou affinité fonctionnelle) de l'anticorps pour sa cible antigénique, ce qui représente la combinaison des affinités de chaque liaison paratope / épitope sur un antigène. La relation affinité-avidité n'est pas linéaire en fonction de la valence (une IgG n'est pas deux fois plus avide qu'un Fab), la multivalence a en fait une influence beaucoup plus importante sur l'avidité. A titre d'exemple, on estime que l'avidité est augmentée d'un facteur 1000 pour un anticorps bivalent et d'un facteur  $10^7$  pour une IgM. Par contre les IgM sont souvent moins spécifiques que les IgG, et ce à cause de l'affinité faible de chacun des paratopes pour l'épitope, ce qui entraîne la reconnaissance potentielle de plusieurs antigènes différents possédant des épitopes de séquence ou de structure proches (phénomène de « réaction croisée »).

On note ainsi : Pour  $n$  sites de liaison :  $Avidité = n \times affinité$ .

Parmi les facteurs physico-chimiques exogènes qui influencent la stabilité de la réaction Ag-Ac, on peut noter essentiellement : la force ionique du milieu réactionnel (*Concentration saline* ayant un effet tampon assurant la solubilité des protéines dont les Ac, ce qui garantit une réaction stable) ; le *pH* (où des grandes variations par rapport à une valeur optimale allant de 7,3 à 7,5, altèrent les structures tridimensionnelles des protéines des anticorps et des antigènes, pouvant déséquilibrer ou stopper la formation des complexes Ag-Ac) ; la *température* (des températures élevées dépassant les 40°C dénaturent les protéines et inhibent la réaction) ; l'*agitation mécanique* (à vitesse modérée augmente les chances de rencontre entre l'Ag et l'Ac favorisant le déroulement de la réaction immunologique).

Deux catégories d'anticorps sont utilisées dans les techniques immunologiques :

-Ac polyclonaux, issus d'un sérum renfermant un mélange d'Ac de différentes spécificités épitopiques dirigés contre un ou plusieurs antigènes. Les Ac polyclonaux sont souvent appelés sérum polyclonal ou anti sérum. La production d'un sérum polyclonal est le résultat de l'activation de plusieurs clones de lymphocytes B par un antigène polyépitopique voir par plus d'un antigène.

-Ac monoclonaux (Acm) qui sont produits par un même clone de lymphocytes B. La biotechnologie des Acm permet de disposer d'Ac homogènes et de haute spécificité. Il existe aussi des Acm de deuxième génération appliqués comme outil thérapeutique pointu pour stopper l'évolution de pathologies infectieuses (bactériennes, virales ou parasitaires) ou tumorales. Il s'agit de plusieurs variantes produites par modification chimique ou par recours aux techniques de la biologie moléculaire, des structures de base des Acm de première génération, voire de leurs gènes. Les Acm de seconde génération sont produits dans le but d'augmenter la tolérance, par l'organisme, des anticorps thérapeutiques souvent administrés par voie injectable, et cela en remplaçant certaines, voire la totalité de leurs séquences moléculaires, essentiellement d'origine murine, par des séquences partiellement ou totalement d'origine humaine. Il est à préciser que ce volet sort du contexte du présent cours, c'est la raison pour laquelle on s'est contenté juste de le citer, à titre d'information.

## **2-La production des anticorps monoclonaux (de première génération)**

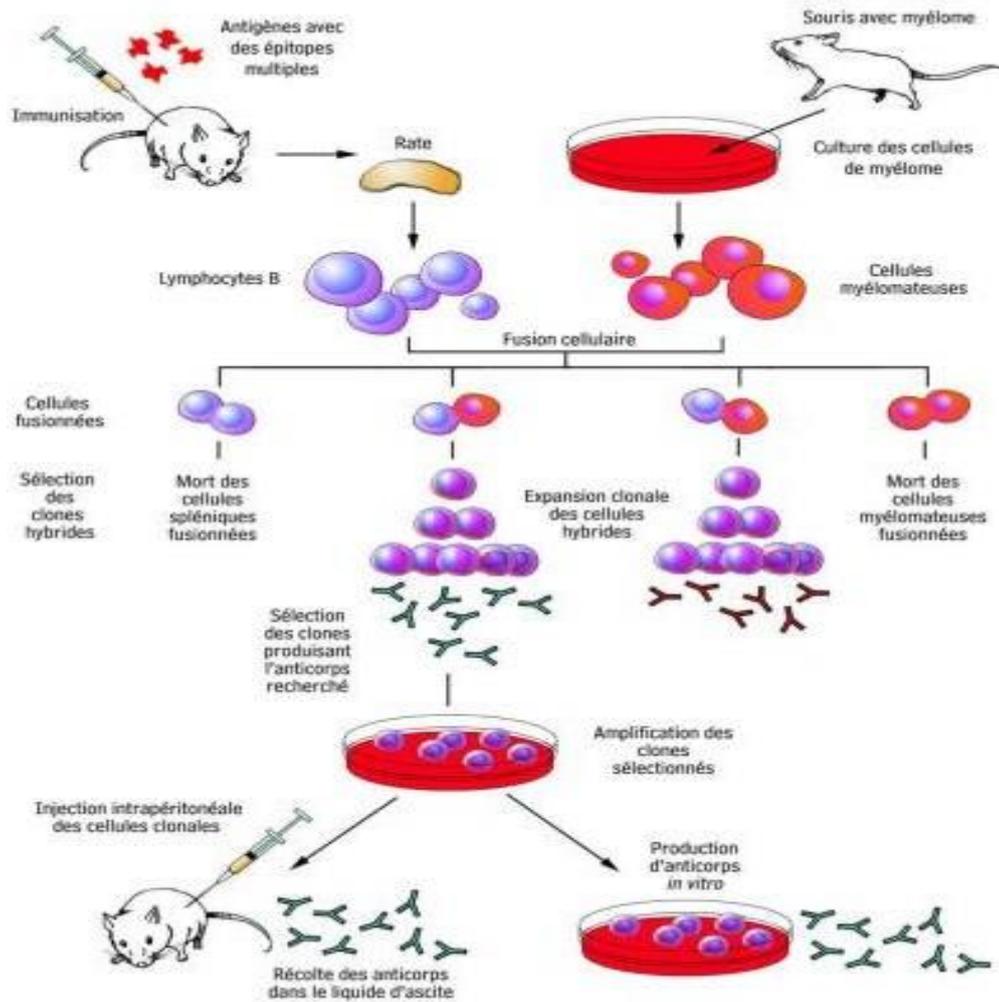
En 1975, César Milstein et Georges Köhler développèrent une technique permettant de produire des anticorps *in vitro*, à partir de cellules hybrides résultant de la fusion entre des lymphocytes B murins et les cellules d'un myélome de la même espèce. Chaque clone cellulaire hybride, une fois isolé et mis en contact avec un épitope porté par un antigène, produit des quantités du même anticorps qualifié de monoclonal. La mise au point de ce procédé résulte, à la base, de la combinaison des travaux de Georges Barski portant sur la production de cellules hybrides (hybridomes), de ceux de Michael Potter sur l'obtention de lignées myélomateuses murines *in vitro*, de ceux de Yoshio Okada sur la fusion cellulaire par le virus de Sendaï et de ceux de John Littlefield sur des cellules comportant des déficiences enzymatiques. C'est sur la base de ces avancées scientifiques que Köhler et Milstein ont abouti à la fusion des splénocytes provenant de souris immunisées avec les cellules d'un myélome murin déficient pour une enzyme nécessaire à la biosynthèse des nucléotides par la voie de sauvetage (appelée aussi voie de récupération, par opposition à la voie *de novo*), l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). Cette déficience enzymatique permet une sélection facile des hybridomes grâce à un agent de sélection ajouté au milieu de culture, l'aminoptérine. Celle-ci bloqua la voie *de novo* de synthèse des nucléotides, seule voie restant aux cellules myélomateuses non fusionnées pour la survie et la croissance, permettant d'une part, d'induire la mort de ces cellules, et

d'autre part de sélectionner les hybridomes issus de la fusion cellulaire et ayant ainsi acquis la capacité de survie et celle de production d'anticorps.

Le milieu de culture sélectif contient également de l'hypoxanthine qui assure la synthèse des bases puriques, en attendant la réalisation de la complémentation génique (acquisition des gènes de l'HGPRT) et de la thymidine qui permet de compenser l'effet antagoniste inhibiteur de l'aminoptérine sur la thymidylate synthase [5].

Le milieu sélectif est ainsi appelé milieu « HAT » pour Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine. Les lymphocytes B non fusionnés disparaissent au bout de quelques jours vu leur incapacité de se multiplier sur le milieu HAT. L'obtention de clones uniques sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques pour la cible requiert une phase d'immunisation *In Vitro* par la réalisation de cultures cellulaires en présence de l'Ag, ainsi que des étapes qui succèdent à l'isolement des hybridomes, à savoir le screening (criblage) des hybridomes au vue de séparer les différents clones par leur détection spécifique en utilisant l'Ag comme ligand (réalisé par ELISA : à voir plus loin dans le cours) et leur clonage par dilutions limites permettant d'atteindre un stade clonal sur microplaques.

En 1986, le premier anticorps monoclonal thérapeutique murin est accepté par la FDA (Food and Drug Administration). Il s'agit du muromonab (Orthoclone OKT3™) dirigé contre le récepteur CD3 des lymphocytes T, efficace pour limiter les réactions inflammatoires à l'origine des rejets lors des transplantations d'organes. Le schéma qui suit résume les différentes étapes de production d'Acm par la technique de l'hybridome :



**Figure 2-1 :** Schéma de production des anticorps monoclonaux d'après Köhler et Milstein.

Actuellement le polyéthylène glycol remplace le virus de Sendai dans l'étape de fusion cellulaire [2]

### 3-Techniques immunologiques utilisant les réactions visibles

#### 3-1-La précipitation

##### 3-1-1-Techniques de précipitation en milieu liquide

Un complexe Ag-Ac est formé quand un Ag soluble (ex. toxine bactérienne) rencontre, dans le milieu réactionnel, un mélange d'Ac d'un immun sérum. Le complexe formé est visible sous forme d'un précipité en milieu liquide. La précipitation est justement observée à l'équilibre réactionnel entre les

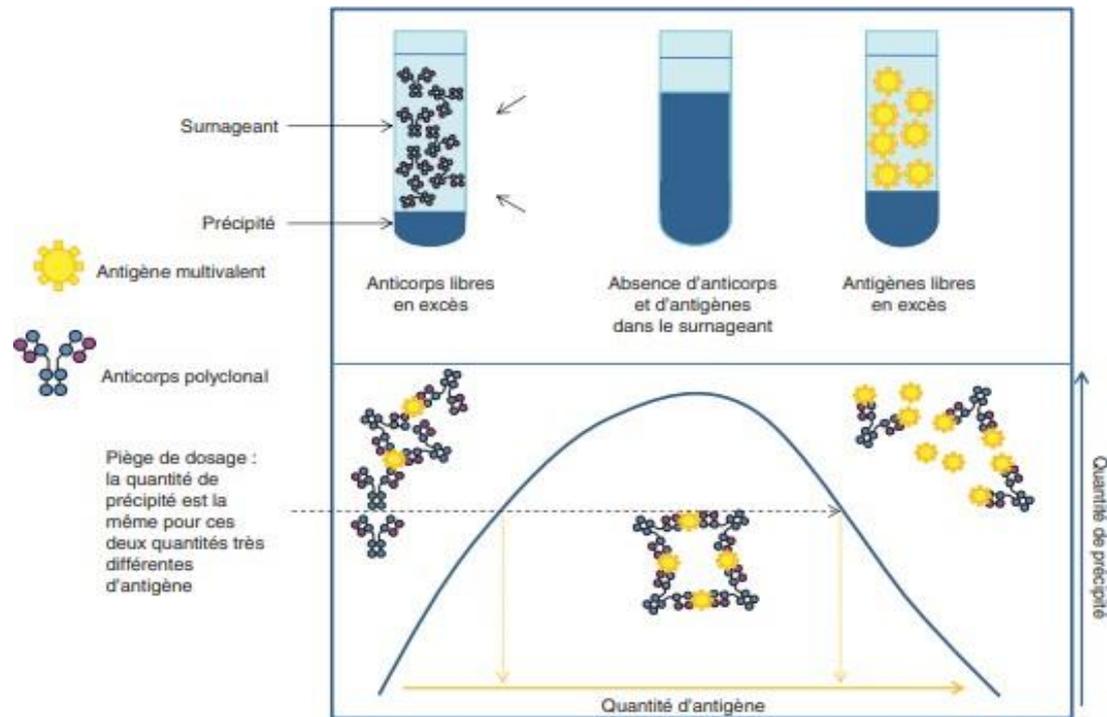
deux réactants (Ag et Ac) où les taux d'Ag sont proportionnels à ceux de l'Ac. Ce phénomène observé *in vivo*, se manifeste également dans les mélanges expérimentaux au vue de la mise en évidence et/ou du dosage de l'Ag ou de l'Ac.

Les réactions peuvent être inhibées soit par un excès d'Ac soit par un excès d'Ag. C'est ce qu'on constate dans une réaction classique de précipitation en milieu liquide, en mettant en présence l'Ag et l'Ac. Ainsi une courbe de titration typique est obtenue en ajoutant une quantité croissante d'Ag à une quantité fixe d'Ac ou d'immun sérum [5]

### 3-1-1-1-Technique de Heidelberg

Cette méthode est basée sur l'expérience menée par Heidelberg où les Ag polysaccharidiques de la capsule de pneumocoques (cocci bactériennes virulentes) ont été mis en contact avec des immuns sérums provenant de lapins préalablement immunisés contre ces Ag. A travers cette technique, des quantités croissantes d'Ag sont mélangées à une quantité fixe d'immun sérum. De cette façon, il apparait un précipité formant le complexe Ag-Ac dans certains tubes. Il est alors possible de quantifier le précipité et la concentration en protéine dans le complexe formé et d'étudier la présence d'Ag ou d'Ac dans le surnageant. Ainsi fut décrite la courbe de précipitation en milieu liquide de type Lapin. Après récupération du précipité par centrifugation suivi de lavages, ce dernier est solubilisé dans l'eau physiologique et quantifié, soit par dosage de l'azote, ou par des méthodes colorimétriques ou spectrophotométriques de dosage des protéines. Connaissant la quantité d'Ag introduit pour chaque mélange, on déduit la quantité d'Ac par différence. Parmi les techniques les plus utilisées pour la quantification des complexes Ag-Ac précipités.

La figure suivante explique les étapes de formation des complexes précipités Ag-Ac.



**Figure 3-1** : courbe de précipitation d'Heidelberg [6]

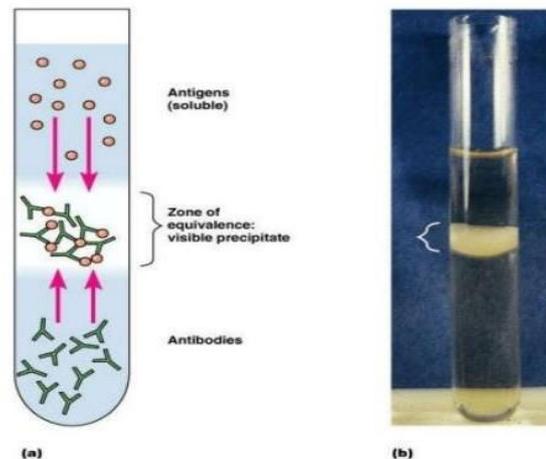
**La turbidimétrie** : Mesure du degré de turbidité d'une suspension. Elle fait partie de la photométrie des milieux troubles. Elle est déterminée grâce à un système optique, en général un spectrophotomètre classique, qui mesure la diminution, due à l'absorbance, de l'intensité d'un rayon lumineux de longueur d'onde connue traversant la suspension. La turbidimétrie est utilisée en complément à la néphélométrie qui se base plutôt sur la diminution de l'intensité par diffusion de la lumière.

**La néphélométrie** : Techniques de mesure de la teneur de particules en suspension ou de la turbidité d'un milieu (respectivement gazeux ou liquide). Elle fait partie de la photométrie des milieux troubles. Elle consiste à mesurer la lumière diffusée à 90° d'angle par rapport à la lumière incidente. L'instrument utilisé pour faire les mesures est le néphélomètre. Il est généralement constitué d'une source de lumière blanche ou de lumière infrarouge [5].

### 3-1-1-2-La réaction en anneau (Ring test)

Basée sur le principe de la courbe d'Heidelberg, c'est une procédure de recherche de la présence des Ac par précipitation des complexes Ag-Ac, se traduisant par l'apparition d'un anneau positionné entre les deux solutions Ag et Ac (interfacial) appelé Ring. C'est une technique qualitative de mise en évidence de la présence d'un Ag dans une solution.

La figure ci-après montre l'apparition de l'anneau au point d'équivalence de la réaction Ag-Ac en fonction de la concentration de l'Ag et de celle de l'Ac dans le milieu réactionnel. Là encore des excès des concentrations en Ag ou en Ac change la balance de l'équilibre et dissout l'anneau formé.

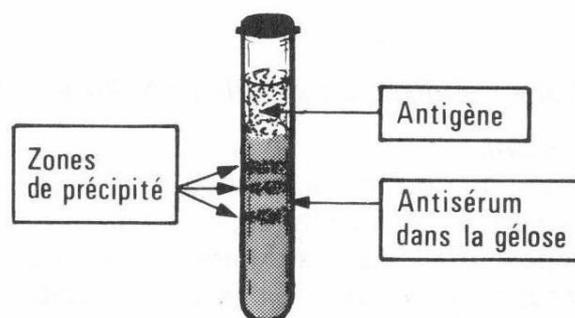


**Figure 3-2 :** résultat du ring test montré sur schéma expliquant la formation du complexe Ag-Ac (a) et sur photo réel dans un tube (b) [6].

### 3-1-2-Techniques de précipitation en milieu gélifié

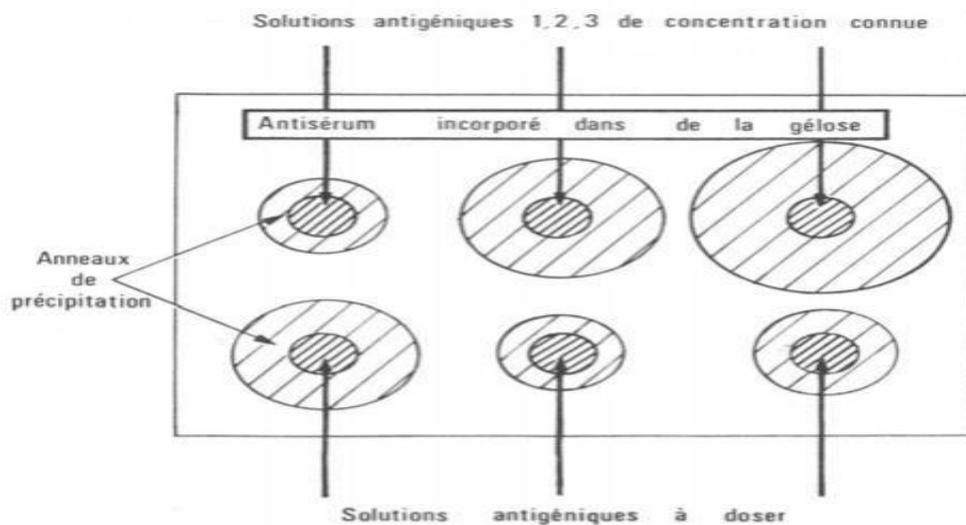
#### 3-1-2-1-L'immunodiffusion simple (Technique d'Oudin)

Méthode basée sur l'introduction d'un réactif dans un milieu gélifié (ou une gélose), en général l'immun sérum (ou un Acm) d'une concentration constante qui sera mis en contact, dans un tube, avec une solution renfermant, probablement l'Ag recherché. Après la diffusion de l'Ag du milieu liquide (généralement placé en haut du tube), vers le milieu gélosé, il se forme un cercle de précipitation, là où la zone d'équivalence est obtenue. Pour réaliser le test, des tubes à essai sont préparés avec une gélose renfermant l'anticorps (ou l'antisérum) sur laquelle est versé l'antigène en solution. La mise en évidence de l'antigène dans la solution utilisée se manifeste par l'apparition de zones de précipitation dans la gélose (figure 3-3).



**Figure 3-3 :** Technique de précipitation unidimensionnelle sur milieu gélosé (Méthode d'Oudin) [9].

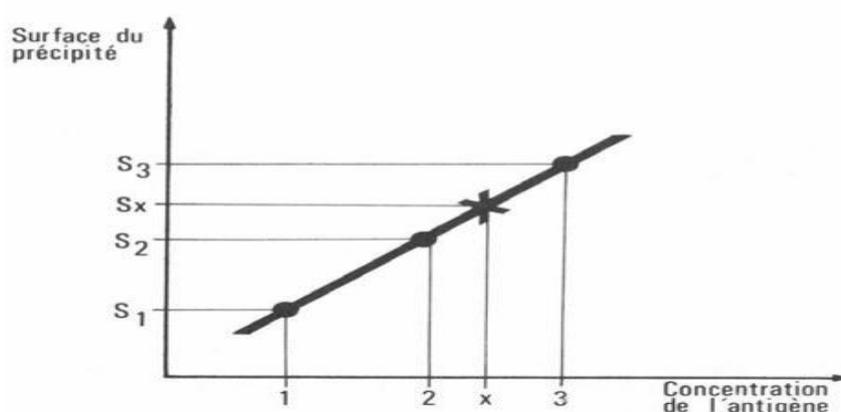
### 3-1-2-2-L'immunodiffusion radiale (Technique de Mancini)



**Figure 3-4 :** schéma montrant l'immunodiffusion radiale [9].

Le test se réalise sur support solide plat, soit une lame de verre ou une boîte de Pétri. Des puits sont creusés sur une gélose contenant l'antisérum. Les solutions antigéniques sont versées dans les puits. La méthode est étalonnée par la réalisation de plusieurs puits recevant chacun une solution d'antigène de concentration connue ; une gamme de concentrations est réalisée et, le traçage d'une courbe mettant en relation la concentration en antigène connu avec les surfaces (diamètres au carré :  $d^2$ ) des zones témoins, permet de quantifier la concentration en antigène dans la solution analysée (x) par extrapolation de la surface  $S_x$  [10].

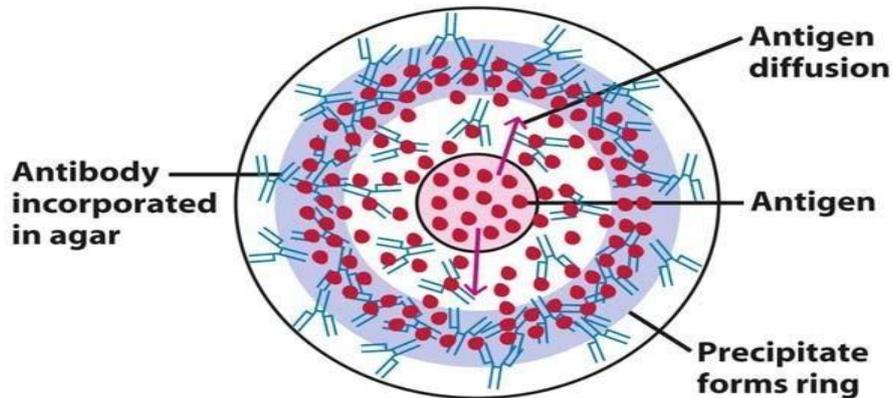
Le graphe suivant illustre la courbe d'étalonnage tracée à cette fin et montrant la corrélation entre la surface du précipité formé avec la concentration en Ag dans les solutions standards :



**Figure 3-5 :** courbe d'étalonnage équivalente à la variation de la surface du précipité formé en fonction de la concentration de l'Ag [11].

La figure ci-après explique la formation des complexes immuns, après diffusion dans la gélose.

### RADIAL IMMUNODIFFUSION

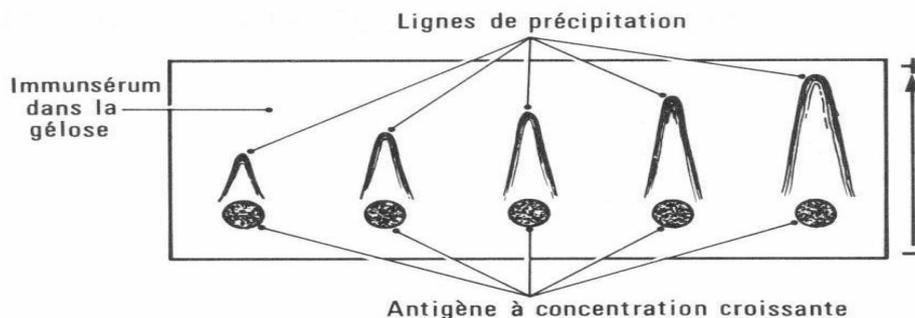


**Figure 3-6 :** Représentation schématique de la formation du précipité dans l'immunodiffusion radiale [10].

#### 3-1-2-3-L'électroimmuno-diffusion simple (Méthode de Laurell)

Il s'agit d'une variante de la technique de Mancini. Dans ce cas, la solution antigénique est soumise à un champ électrique où les Ag migrent dans le gel renfermant l'Ac (ou l'immunsérum). Ce qui fait que le trait de précipitation a une forme de fusée dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'Ag.

De la même manière, une courbe d'étalonnage est tracée sur la base d'une corrélation entre la hauteur des fusées de précipitation et la concentration en Ag dans les solutions standards (Figure 3-7).



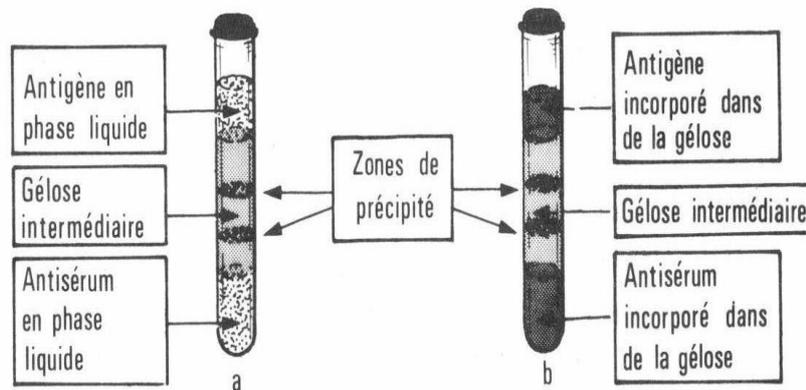
**Figure 3-7 :** représentation schématique de la formation des lignes de précipitation (fusées) [9].

#### 3-1-2-4-L'immunodiffusion double

Cette méthode comporte plusieurs variantes selon le support utilisé : tubes, boîtes de Pétri ou plaques.

En tube, la méthode est basée sur le même principe que la méthode d'Oudin avec addition d'une fine couche de gel vierge à 0,6% d'agarose, positionné entre le milieu gélosé renfermant l'Ac et la solution antigénique.

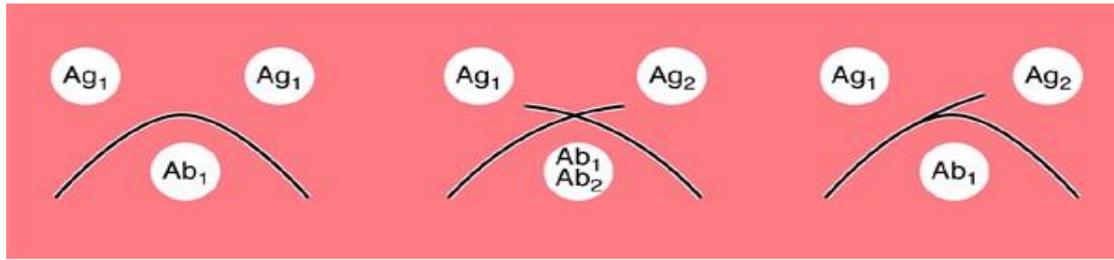
La technique est illustrée sur la figure ci-après :



**Figure 3-8** : l'immunodiffusion double [6].

Sur un support plat (boîte de Pétri ou lame de verre), les solutions d'Ag et d'Ac respectives sont versées dans deux puits réalisés sur milieu gélosé vierge préalablement préparé sur boîte de Pétri ou lame. Les deux réactifs Ag et Ac migrent à des vitesses influencées par leurs capacités de diffusion ainsi que leur concentration en solution. Au point de l'équivalence, il se forme des arcs de précipitation au site de rencontre et de formation des complexes immuns. Cette méthode est décrite par Ouchterlony.

Généralement, la solution d'antisérums renfermant le mélange d'Ac est déposée au centre du milieu gélosé et les différentes solutions antigéniques à révéler sont déposées dans les puits creusés autour. Dans le cas où deux Ag identiques (ou contenant les mêmes épitopes) sont déposés dans deux puits adjacents, il y a formation d'un arc continu, on parle alors de réaction d'identité. A l'inverse, si les deux Ag déposés sont différents (ne contenant aucun épitope en commun) et sont reconnus par deux Ac différents de l'antisérums, il y a formation de deux arcs de précipitation qui se coupent, dans ce cas on parle de réaction de non identité. Si enfin les deux Ag présentent des déterminants antigéniques communs, dans ce cas il y a formation d'un éperon, traduisant une identité partielle. Les trois situations décrites sont illustrées dans la figure suivante :



**Figure 3-9 :** les différents types d'arcs de précipitation formés par la méthode d'Ouchterlony [9].

Dans une variante semi-quantitative de la même technique ayant pour but de mettre en évidence et de quantifier un Ag, la solution d'Ac est tout de même placée dans le puits du milieu, creusé dans la couche de gélose déposée sur un support (souvent une boîte de Pétri). La solution d'Ag à étudier est diluée en utilisant un facteur de  $\frac{1}{2}$ . Une fois la réaction est terminée, elle est lue en considérant la concentration en Ag comme étant la dilution maximale donnant encore une ligne de précipitation. Cette méthode peut également être employée pour tester une concentration en Ac en la diluant et en la faisant réagir contre une solution d'Ag, déposée au milieu du gel.

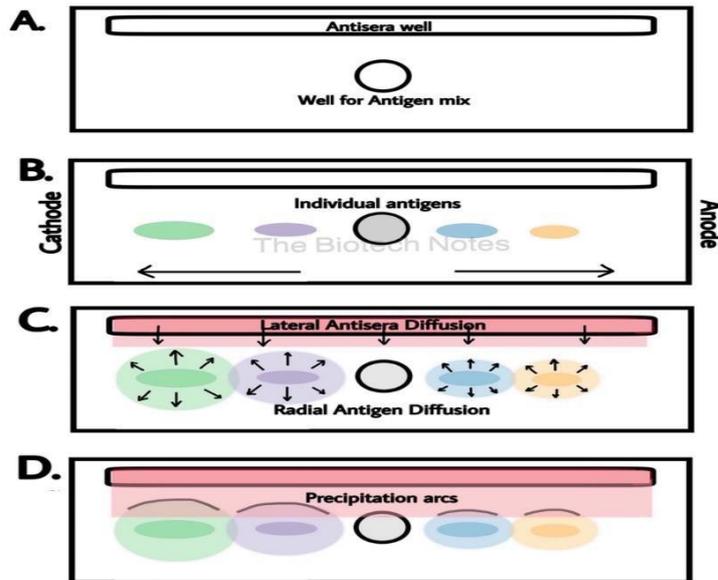
### 3-1-2-5-Immunoélectrophorèse (Technique de Grabar et Williams)

En employant la méthode d'Ouchterlony pour l'analyse d'un mélange complexe d'Ag, il est difficile d'identifier les composants (la composition du mélange antigénique). L'analyse immunoélectrophorétique de Grabar et Williams permet de séparer les constituants grâce à leur mobilité électrophorétique avant de les caractériser. Deux étapes sont nécessaires pour la réalisation de cette méthode :

1-Séparation des Ag en fonction de leur mobilité électrophorétique en les faisant migrer dans un gel d'agarose sous l'effet d'un champ électrique continu.

2-Identification des antigènes séparés par des anticorps diffusés dans le gel après leur dépôt dans une gouttière creusée dans le gel. La rencontre entre l'Ag et l'Ac à concentration optimale (au point d'équivalence) aboutira à la formation d'arcs de précipitation.

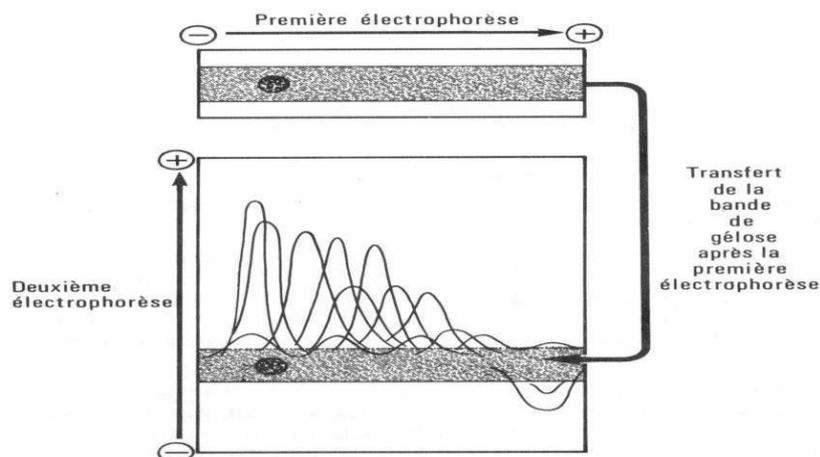
Cette technique qualitative est très utilisée pour l'analyse des protéines du sérum.



**Figure 3-10** : schéma montrant la réalisation de l'immunoélectrophorèse [12].

### 3-1-2-6-Immunoélectrophorèse bidimensionnelle (croisée)

Il s'agit réellement d'une variante de la méthode de Laurell. Elle se base sur la séparation préliminaire du mélange d'Ag par une migration électrophorétique. Ensuite une bande longitudinale du gel qui renferme les Ag séparés est découpée et déposée sur un autre gel préalablement imprégné de la solution d'antisérum. Une deuxième électrophorèse est alors réalisée dans un plan perpendiculaire à la première migration pour amener les Ag en contact des Ac contenu dans le gel et former des pics de précipitation. La surface de ces derniers est proportionnelle à la concentration en Ag contenus dans la solution analysée (figure 3-11).



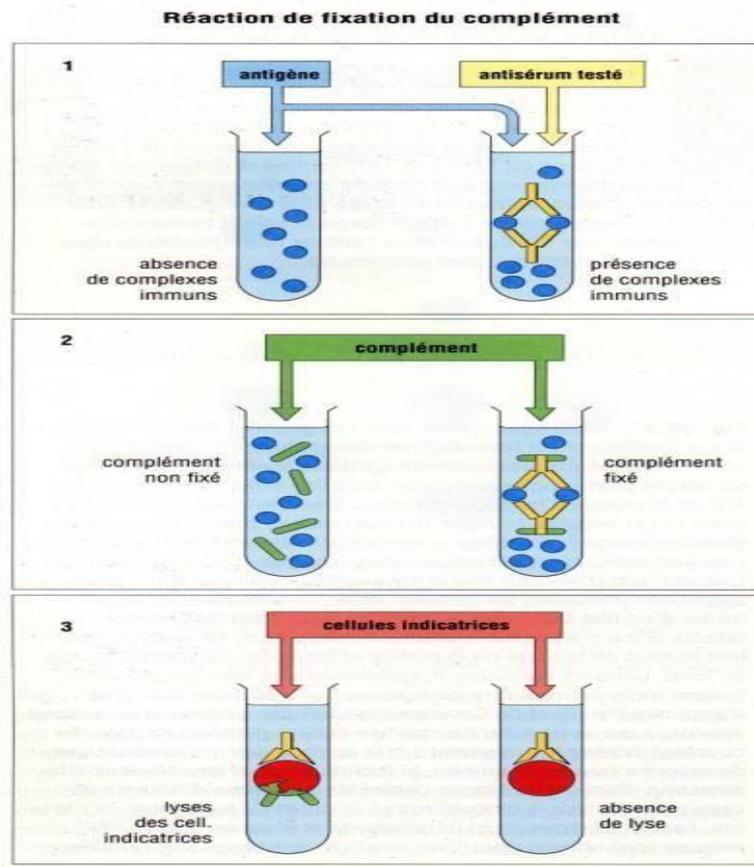
**Figure 3-11** : Schéma montrant la mise en place de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle  
(Source : <https://docplayer.fr/19298126-Methodes-immunochimiques.html>).

### ***3-2- Les techniques utilisant le complément***

Ensemble de protéines plasmatiques qui s'activent selon des réactions en cascades suite à la formation d'un complexe Ag-Ac, le complément est exploité dans le domaine analytique afin de mettre en évidence des Ag solubles ou particulaires (voir membranaires) dans un échantillon analysé. Souvent la protéine C<sub>3</sub> du complément est responsable de la neutralisation de complexes immuns, sa fixation s'accompagne de l'activation des autres protéines, menant à la dégradation de l'Ag préalablement fixé par l'Ac spécifique.

#### ***3-2-1-Réaction de déviation du complément***

C'est une réaction qui utilise des Ac fixés d'abord, à une particule, généralement un globule rouge (servant de système révélateur). On fait réagir, dans un premier temps, l'Ag et les Ac recherchés contenus (éventuellement) dans un liquide biologique (analysé) et en présence du complément. Dans un deuxième temps, le système révélateur (déjà préparé) est ajouté au milieu réactionnel. Deux situations peuvent s'observer : 1- Le liquide biologique renferme des Ac cytotoxiques spécifiques de l'Ag : Il se forme dans ce cas, des complexes Ag-Ac qui fixent et activent les protéines du complément, ce dernier est donc non disponible pour la réaction d'hémolyse du système révélateur. 2- Le liquide biologique analysé ne renferme pas d'Ac cytotoxiques : l'absence de formation de complexes immuns (Ag-Ac) n'induit pas la consommation du complément, qui reste alors disponible pour le système révélateur, il y a hémolyse dans cette situation, qui traduit l'absence d'Ac cytotoxiques dans le liquide biologique analysé.



**Figure 3-12 :** Schéma montrant la mise en évidence d'un complexe immunitaire dans un échantillon analysé, par la technique de déviation du complément [6].

### 3-2-2-Mise en évidence d'Ag membranaire

En présence d'Ac spécifiques possédant la propriété de fixer le complément, il est possible en présence du complément de mettre en évidence la présence d'une molécule antigénique particulière à la surface d'une cellule. Les Ac spécifiques qui se sont fixés à l'Ag membranaires activent le complément qui induit la formation de lésions au niveau membranaire, ce qui modifie la perméabilité de la cellule cible. Cela induit la décoloration de la cellule indicatrice et le changement de la couleur du milieu réactionnel est indicateur de l'existence d'un antigène membranaire recherché.

### 3-2-3-Recherche d'Ac cytotoxiques

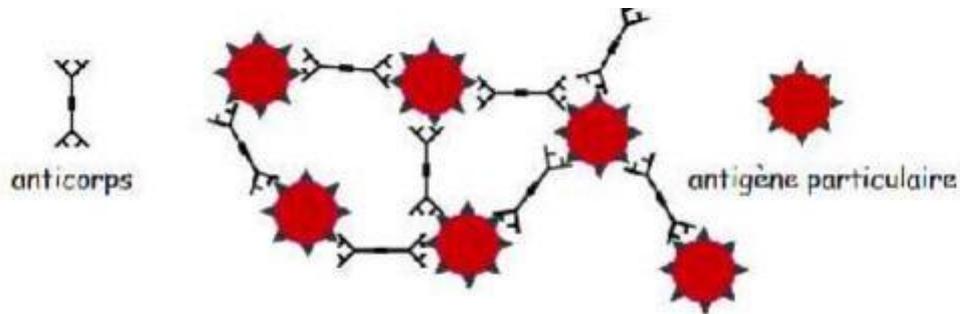
La recherche d'Ac cytotoxiques capables de fixer le complément dans un liquide biologique est une autre application des techniques utilisant le complément. Soit l'Ag cible est exprimé à la surface d'une cellule, dans ce cas seront mis en présence la cellule cible, le complément et le liquide biologique. La lyse de la cellule cible est appréciée avec un colorant vital. Soit l'Ag est sous forme soluble, dans ce cas on le fixe préalablement sur un support inerte du moins n'intervenant pas dans la réaction Ag-Ac comme les hématies de mouton (*hémagglutination*). En présence d'Ac spécifiques cytotoxiques,

l'addition de complément va conduire à la lyse des globules rouges avec libération de l'hémoglobine. Une réaction d'hémolyse traduit la présence d'Ac cytotoxique dans le liquide biologique étudié.

### **3-3-Les techniques d'agglutination**

La mesure directe de la fixation d'un anticorps sur un antigène est utilisée dans la plupart des tests sérologiques. Cependant, la visibilité de la réaction est nettement améliorée si les particules d'antigènes et celles d'anticorps sont de taille plus grande. De ce fait l'utilisation d'antigènes particulaires (membranaires ou fixés sur d'autres particules synthétiques) au lieu des antigènes solubles d'une part, et l'utilisation d'anticorps agglutinants (IgM) au lieu des IgG, rend la réaction immunologique instantanée.

Les tests d'agglutination figurent parmi les tests les plus anciens appliqués dans le diagnostic rapide, ils sont basés sur la propriété de certains Ac, notamment les IgM, de former des complexes avec les Ag comme les bactéries donnant lieu à des amas bactériens ou agglutinats visibles à l'œil nu. La présence d'Ac spécifiques peut être révélée en quelques minutes, par simple mélange d'un faible volume de sérum ou de sang à tester et d'un volume équivalent d'une suspension de bactéries, (colorés dans certains cas, pour optimiser l'apparition des agglutinats formés). Ces réactions sont basées sur le même principe de dosage que celui des réactions de précipitation, avec une sensibilité multipliée par un facteur de 1000.



**Figure 3-13 :** principe du test d'agglutination [7]

Lorsque l'antigène est présent à la surface d'une grosse particule, les anticorps peuvent induire son agglutination. Le test d'agglutination est facilement réalisé en employant des bactéries ou des hématies comme support particulaire de l'Ag. Les hématies pouvant être utilisés directement ou comme support d'antigènes solubles fixés à leur surface (hémagglutination passive). Ce principe est couramment utilisé pour la détermination des groupes sanguins et est appelé réaction d'hémagglutination directe. Dans ce cas, l'agglutination est induite en incubant des anticorps anti-A ou anti-B avec des hématies du sujet à grouper. Si le sujet possède à la surface de ses globules rouges l'antigène A (patient du groupe A), on observera une agglutination avec les anticorps anti-A mais

pas avec les anticorps anti-B.

La formation des agglutinats est influencée par la tension interfaciale qui tend à agréger les particules entre elles et la force de répulsion provenant des charges des particules. Les Ac doivent donc surmonter les forces de répulsion en engageant un nombre suffisant de liaisons, aussi l'avidité des Ac multivalents de la classe des IgM plus forte que celle des IgG fait que les IgM sont de bons agglutinants (appelés d'ailleurs agglutinines lors de leur découverte). La réaction Ag-Ac se traduit alors, par la formation d'un agglutinat visible à l'œil nu.

On parle d'**agglutination directe (Active)** dans le cas où l'Ag est naturellement présent à la surface d'une particule ou d'une cellule. Le mélange sur plaque de verre ou lame, en tube ou sur plaque de micro titration des particules en suspension avec l'Ac en solution permet la formation d'un agglutinat.

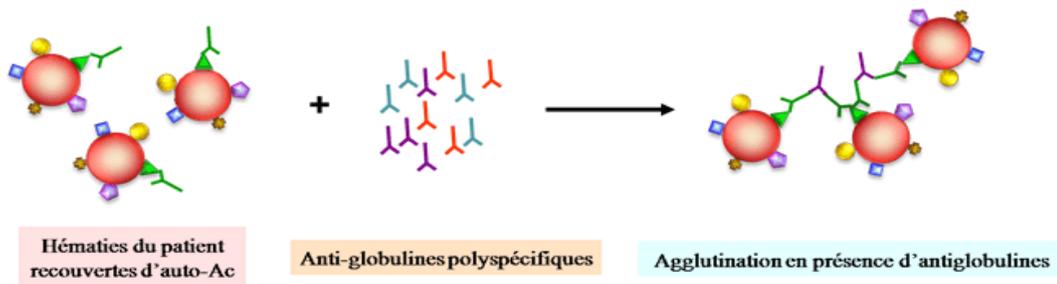
A l'inverse quand l'Ag est sous forme soluble (en solution), il doit être préalablement fixé sur un support inerte (hématies de mouton, billes de latex, cristaux de cholestérol) par une liaison mettant en jeu des structures n'intervenant pas dans la région de formation du complexe immun, en utilisant parfois, des agents couplant : le benzidine bisazoté, acide tannique, chlorure de chrome, glutéraldéhyde. C'est une **agglutination indirecte ou passive**.

Le test de Coombs est basé justement sur ce principe, où il est utilisé en biologie clinique pour la recherche d'Ac anti globule rouge.

Deux variantes existent :

### *3-3-1-Test de Coombs direct*

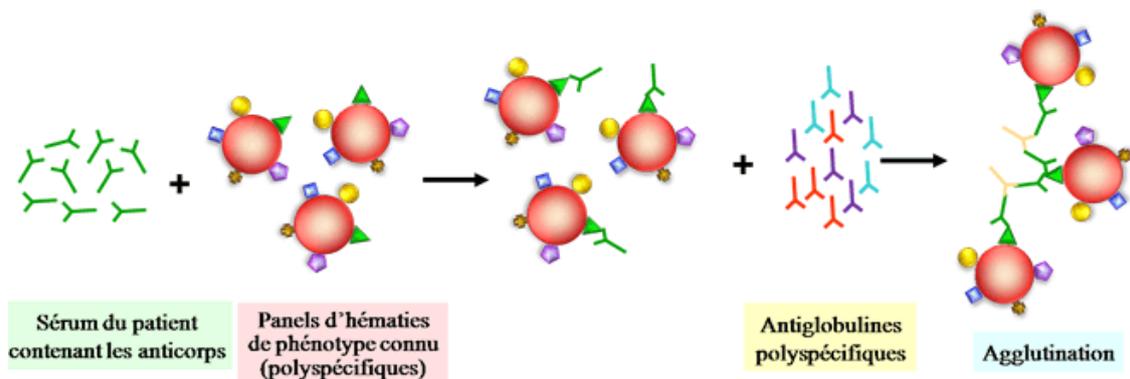
C'est une méthode ayant pour objectif la mise en évidence d'Ac fixés à la surface des hématies, et permettant ainsi de diagnostiquer l'existence de pathologies hémolytique auto-immune. Dans ce cas, l'agglutination des hématies de l'individu est réalisée par des anticorps dirigés contre les anticorps recherchés (Ac anti-Ig humaines spécifiques des caractéristiques isotypiques des Ac recherchés : obtenus par immunisation d'animaux de laboratoire). D'autre part, ce test est employé pour l'analyse du sang de nouveau-né Rh+ de mère Rh- probablement victime d'une maladie hémolytique.



**Figure 3-14** : schéma montrant la formation d'agglutinat dans le test de Coombs direct (memobio.fr)

### 3-3-1-Test de Coombs indirect

Très utilisé pour la recherche d'Ac anti globules rouges (anti GR) dans le sérum d'un individu et leur identification. La fixation des Ac du sérum non agglutinant sur des globules rouges de groupe sanguin connu est révélée par agglutination après addition d'Ac anti-Ig. Dans le cas d'un accouchement d'une femme Rh-, cette méthode est utilisée pour la mise en évidence d'anticorps anti GR dans le sérum de la mère, probablement dirigés contre les hématies du nouveau-né, si ce dernier est de Rh+.



**Figure 3-15** : principe de la formation d'agglutinat dans le test de Coombs indirect (memobio.fr)

## 4-Techniques de marquage

La révélation de la réaction Ag – Ac et la mise en évidence des complexes immuns peut faire appel à un artifice chimique comme le marquage d'un des deux réactifs, notamment les substances se trouvant à faible concentration et/ou qui ne présentent pas de caractéristiques particulières assurant leur détection directe à l'œil nu. Ce procédé est appelé un marquage. Le marquage des substances fait intervenir des Ac à forte affinité permettant d'amplifier le signal de reconnaissance entre les anticorps et les antigènes détectés. Différents types de marqueurs sont employés :

- des radioéléments ou isotopes radioactifs (cas des techniques radio-immunologiques).
- des substances fluorescentes (cas des techniques d'immunofluorescence).
- des enzymes (cas des techniques immuno-enzymatiques).

#### ***4-1-Techniques radio-immunologiques***

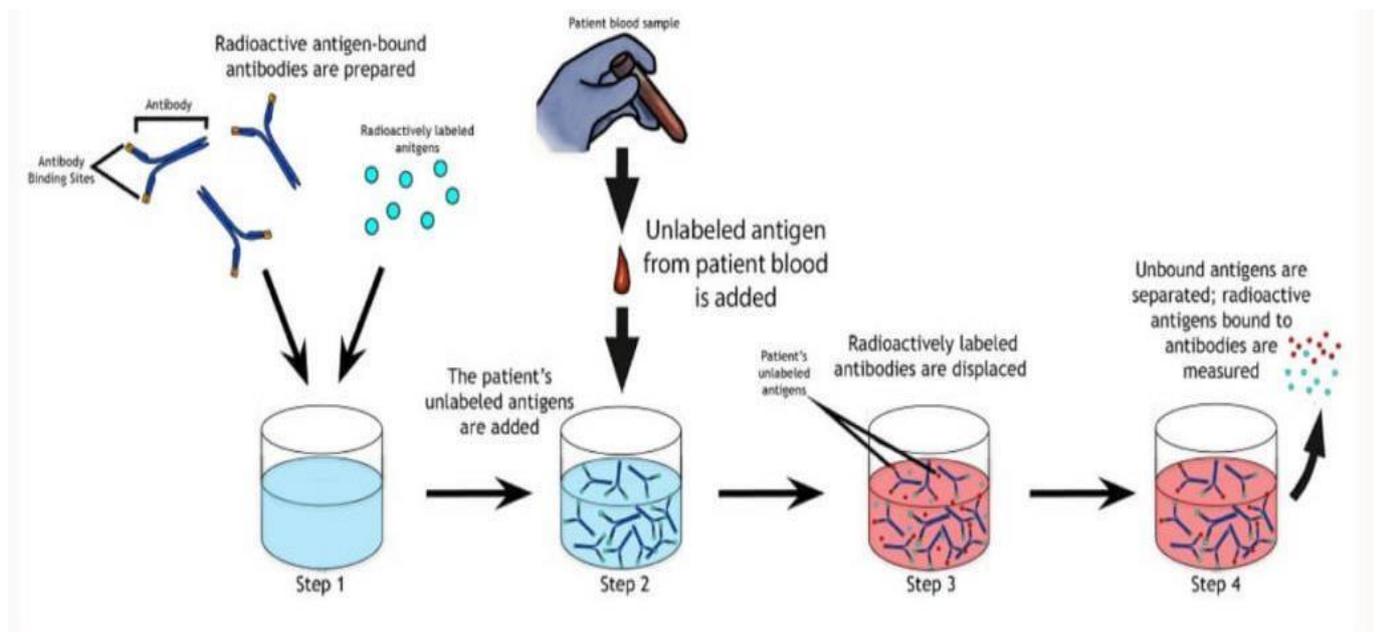
Les marqueurs les plus utilisés sont :  $C^{14}$ ,  $H^3$ ,  $I^{125}$  avec l'iode 125 est le radio-isotope le plus employé, car il émet des rayonnements  $\gamma$  assez peu ionisants et présentant un cout économique relativement bas. Cependant, il présente l'inconvénient d'une période d'élimination de 60 jours. Il existe deux méthodes pour l'incorporation de cet isotope dans les substances analysées (antigène ou anticorps) : 1-Fixation sur la protéine par substitution électrophile. 2-Fixation de l'iode 125 sur un réactif chimique avant son greffage sur la protéine.

Généralement, l'iode 125 se fixe sur des acides aminés spécifiques (tyrosine ou histidine), qui subissent une oxydation préalable, en utilisant un agent oxydant (Chloramine). Ainsi, l'iode est fixé en position Ortho du groupement phénol. Dans le cas où la protéine à doser ne contient pas de tyrosine (ou histidine) dans sa structure, on fait appel au réactif de Bolton et Hunter (succinyl ester de l'acide propionique permettant l'acylation des fonctions amines primaires de la protéine analysée), qui est également utilisé dans le cas où l'intégrité du résidu tyrosine est cruciale pour l'activité biologique de la protéine (partie de l'épitope).

##### *4-1-1 La RIA (Radio Immunology Assay)*

Dosage basé sur l'utilisation d'élément radioactif. Il se fait suivant la disponibilité des éléments : Une préparation d'antigène marqué généralement par  $I^{125}$  ou  $Ag^*$  ; un antisérum contenant des Ac spécifiques à l'Ag ; le liquide biologique ou sérum à analyser dans lequel on cherche à doser l'Ag froid (non radioactif). L'antisérum peut réagir de manière différente avec l'Ag marqué ou froid contenu dans le liquide biologique à analyser [14].

## Démarche expérimentale



**Figure 4-1** : schéma récapitulatif de la technique RIA [14]

- On détermine d'abord la quantité d'Ag marqué qui peut se lier à une quantité fixe de l'immunosérum ou d'Ac anti-Ig,
- on mesure ensuite le taux de captation de l'Ag\* lorsque l'antisérum est mis en présence d'un mélange d'Ag\* et d'Ag froid,
- lorsque la quantité d'Ag froid est rajoutée au fur et à mesure, moins la quantité d'Ag\* est liée à l'Ac,
- on définit une courbe d'étalonnage en présence de mélanges constitués par une quantité fixe d'Ag\* à laquelle on ajoute des concentrations connues et croissantes d'Ag froid.

La séparation entre l'Ag lié et l'Ag libre peut être réalisée par plusieurs techniques :

- Précipitation des complexes immuns par le sulfate d'ammonium ou par le PEG (Polyéthylène Glycol).
- Adsorption de l'Ag libre sur le charbon actif ou de la silice.
- Actuellement les Ac sont adsorbés ou fixés sur des puits directement, puis l'Ag libre est aspiré grâce à une pompe à vide.

D'autres part, des anticorps secondaires anti-isotypiques sont rajoutés afin de se fixer sur les complexes formés (figure 4-1).

#### *4-1-2-La Radio-Immuno-Sorbent-test (RIST)*

Il s'agit d'une technique utilisée en immunopathologie pour le dosage semi quantitatif, dans le sérum de patients, des immunoglobulines de classe E (IgE) spécifiques de différents allergènes de la nature ou des aliments, et ce afin d'affirmer ou de confirmer la présence d'une allergie chez ces derniers.

Après avoir fixé les Ac monoclonaux spécifiques des IgE recherchés, sur un support solide, le sérum du patient d'une part et la solution des IgE radiomarqués d'autre part, sont rajoutés dans le milieu réactionnel. De ce fait, une compétition entre les IgE radioactifs et les IgE du sérum (s'ils existent) provoquera la diminution du signal radioactif mesuré dans le milieu, en fonction de la concentration en IgE totale.

Une autre variante de la même technique existe, il s'agit de la **IRMA** (*Immunoradiometric assay*) qui utilise l'allergène spécifique du syndrome d'hypersensibilité recherché, comme molécule de fixation des IgE du sérum (échantillon), qui seront ensuite déplacés de leur site, par l'IgE radiomarqué rajouté secondairement. Ce qui fait diminuer le signal radioactif, quantifié tout de même, en fonction de la concentration en IgE spécifiques. La figure suivante montre le principe de la méthode.

#### **4.2 Les techniques d'immunofluorescence**

Ensemble de méthodes basées sur l'utilisation de substances ayant comme propriété principale, l'émission d'un faisceau lumineux, se manifestant par l'apparition d'une couleur à une longueur d'onde spécifique, due à l'excitation de cette substance, par un rayonnement initial. Les substances possédant cette propriété sont nommées **fluorochromes**.

Les fluorochromes émettent après excitation à une longueur d'onde spécifique qui doit correspondre à la raie du laser utilisée. La longueur d'onde permettant de détecter le faisceau lumineux émis, est supérieure à celle de l'excitation. La **fluorescéine isothiocyanate (FITC)** est le réactif le plus utilisé. Elle est excitée par la lumière d'une longueur d'onde comprise entre 450 et 500nm (domaine du bleu) et émet de la lumière fluorescente de plus faible énergie avec une longueur d'onde entre 500 et 550nm (jaune - vert). L'**isothiocyanate de Rhodamine** est également largement utilisé donnant une fluorescence orange.

Les techniques d'immunofluorescence sont appliquées pour révélation de motifs antigéniques présents sur des structures cellulaires ou tissulaires. L'utilisation d'un microscope spécial UV est requise pour la lecture du résultat. Il s'agit d'une technique de microscopie à fluorescence utilisant des filtres sélectifs qui ne laissent passer vers l'échantillon fluorescent que la lumière d'une longueur d'onde choisie, selon l'absorption de la substance fluorochrome et le domaine optique de détection, utilisé. Ces techniques sont appliquées pour la recherche d'Ag cellulaires pour le diagnostic de pathologies

tumorales, sur les biopsies ou les coupes tissulaires préparées à partir de fragments d'organes ou de parties de biopsies.

La figure qui suit représente le principe de base des techniques d'immunofluorescence.

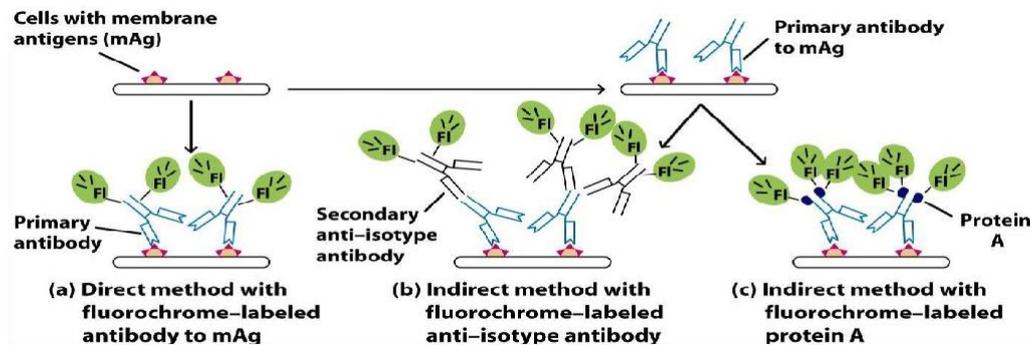


Figure 4-2 : l'immunofluorescence (Kuby Immunology, 2006).

Il y a deux variantes :

-L'immunofluorescence directe : méthode utilisant des Ac marqués par le réactif fluorescent. Ces derniers se fixe directement sur l'Ag cellulaire. De ce faite l'apparition de la couleur émise lors de la fluorescence sous microscopie de fluorescence, prouve l'existence de l'Ag recherché sur les cellules ou tissus analysés.

-L'immunofluorescence indirecte : méthode utilisant un Ac secondaire marqué par un fluorochrome pour révéler la fixation de l'Ac primaire spécifique d'un Ag cellulaire mis en évidence. Une troisième variante de la deuxième est mise en place, elle repose sur l'emploi d'une protéine A marquée, couplée à l'Ac révélateur de l'Ag cellulaire.

Ces méthodes sont largement appliquées en immunohistochimie pour la détection d'antigènes tissulaires, ce qui a un intérêt considérable dans l'étude des morphologies cellulaires et dans le diagnostic des cancers.

Il apparaît clairement que les techniques d'immunofluorescence possèdent un intérêt dans la séparation et le tri des cellules sur la base de certains antigènes cellulaires caractéristiques. Cependant des techniques modernes basées sur le même principe, méritent d'être citées dans ce cours, notamment la cytométrie de flux.

### ***4-3-La cytométrie de flux***

La cytométrie de flux (ou analyse FACS) remplace progressivement le microscope à fluorescence dans les laboratoires d'immunohématologie dans le but d'effectuer rapidement des analyses de routine sur un grand nombre de cellules en suspension. La cytométrie en flux est l'étude d'une suspension monocellulaire, colorée par un fluorochrome, circulant dans une veine liquide et passant devant un rayon lumineux (source laser le plus souvent) grâce à un système optique étudiant la lumière transmise et la lumière diffractée et/ou réémise par un fluorochrome (immunofluorescence).

Le cytomètre permet le passage physique de l'échantillon dans la *flow cell* ou chambre d'analyse et le recueil des signaux lumineux de diffraction et de fluorescence. Un logiciel informatique traite ainsi les signaux issus du cytomètre et les traduit en pics. L'alimentation pneumatique et électrique renferme les alimentations électriques du laser et du cytomètre ainsi que le compresseur nécessaire aux circuits pneumatiques.

#### Composition de l'équipement de cytométrie de flux

-Une source lumineuse monochromatique : Il s'agit d'un rayonnement Laser d'Argon qui constitue la source d'excitation à 488 nm (raie bleue).

-Une chambre d'analyse ou Flow cell, dans laquelle passe l'échantillon analysé et où les cellules sont illuminées par le faisceau laser émis. La figure 4-3 schématise l'appareil.

-Des détecteurs de taille et de structure qui mesurent la lumière déviée ou diffusée émise par les cellules lors du passage dans le faisceau laser.

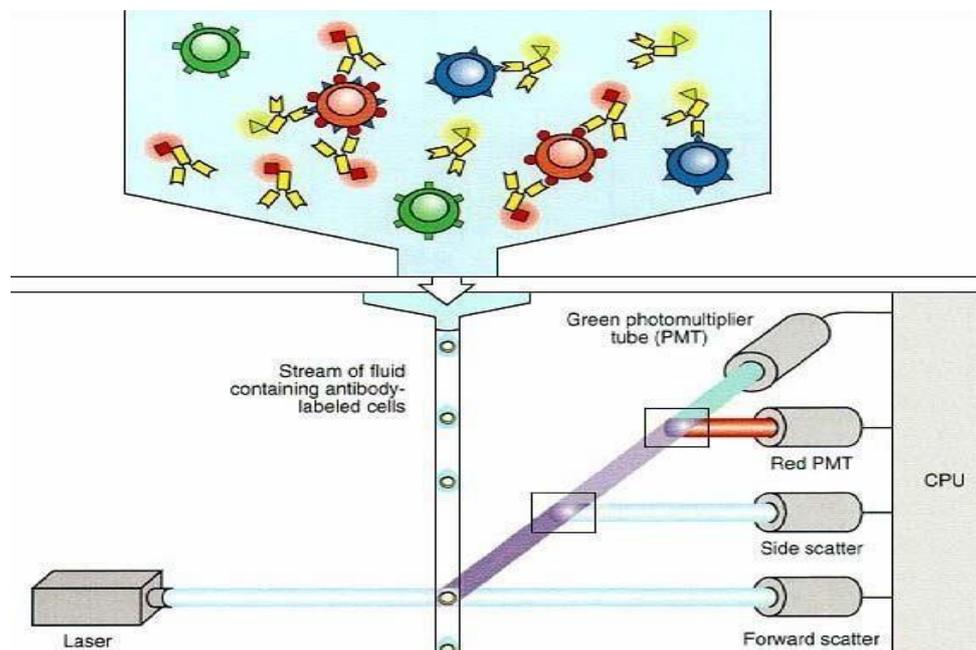
-Des détecteurs de fluorescence qui mesurent les fluorescences émises par les cellules lors du passage dans le faisceau laser.

-Une chambre de séparation des types cellulaires et d'analyse des signaux lumineux : La suspension de cellules préalablement marquées par des Ac spécifiques et fluorescents, est injectée dans le liquide de la veine (capillaire de l'appareil) par une aiguille très fine ayant un diamètre interne de 200  $\mu\text{m}$ . Le flux des cellules est entraîné par la veine dont le diamètre diminue graduellement jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  (c'est le phénomène d'**hydrofocalisation**). Ce qui impose aux éléments analysés (les cellules marquées) de s'aligner les uns derrière les autres en passant à un débit fixé par la vitesse du liquide passant dans la veine.

Sous l'effet de l'excitation par le rayon laser, chaque cellule diffuse une partie de la lumière reçue dans toutes les directions. La lumière diffractée vers l'avant, c'est à dire dans l'axe optique de

détection, est proportionnelle à la taille de la cellule. Il s'agit du signal FS (Forward Scatter), mesuré par un détecteur photodiode qui convertit l'énergie lumineuse en énergie électrique.

Enfin l'étape de l'analyse de la lumière diffusée à 90° ou aux grands angles (side Scatter : SS) : Elle représente la lumière du laser qui pénètre à l'intérieur de la cellule et qui est réfractée dans un milieu transparent comme le cytoplasme. Ce phénomène de réfraction dépend des propriétés intrinsèques de la cellule (volume du cytoplasme, présence et abondance des granulations intracellulaires, rapport nucléocytoplasmique, ...). Ce signal est aussi capté et mesuré par une photodiode. La figure 4-3 ci-après montre la composition d'un appareil de cytométrie de flux.



**Figure 4-3 :** Schéma montrant le cytomètre de flux (Garland Publishing).

### Analyse de la fluorescence

Le fluorochrome marquant la cellule absorbe l'énergie lumineuse fournie par le laser et émet une partie de la lumière sous forme de photons avec une longueur d'onde caractéristique du fluorochrome. Des photomultiplicateurs mesurent à 90° les signaux émis et les amplifient. Dans le cas où plusieurs marquages sont employés sur la ou les cellules (voir des tissus), il va falloir séparer les différents signaux puis les mesurer individuellement. Cette étape est réalisée par des filtres interférentiels, inclinés à 45°, appelés miroirs dichroïques, qui laissent passer par transmission chaque longueur d'onde vers son détecteur respectif.

#### ***4-4-Technique du tri cellulaire immuno-magnétique***

Basée sur le tri des cellules sur la base de leurs antigènes membranaires. Pour cela, une panoplie d'anticorps spécifiques d'antigènes de surfaces cellulaires, est utilisée pour le marquage sélectif des cellules [15]. De plus, le marquage peut se faire d'une manière directe où l'anticorps marqué est directement spécifique de l'Ag qu'il reconnaît (Ac primaire) ou d'une manière indirecte où l'anticorps marqué est un anti-isotype, reconnaissant le Fc de l'Ac primaire, déjà fixé sur son Ag de la surface cellulaire. En effet l'un des deux Ac (selon les cas) est couplé à une particule magnétique, servant de moyen de sélection de la cellule, quand le mélange des cellules étudiées est soumis à un champs magnétique. D'autres cas de figures peuvent s'observer dans la mise en place de cette technique :

-l'Ac primaire est greffé à la biotine (marquage) reconnu par la Streptavidine couplée à la particule magnétique.

-l'Ac primaire couplé avec une substance fluorochrome, cette dernière est reconnue par l'Ac secondaire anti-fluorochrome, lui-même greffé à une particule magnétique.

La séparation des cellules marquées du reste du mélange analysé se fait soit sur colonne fixée sur un aimant, soit par procédure automatisée avec un dispositif muni d'un aimant, permettant un tri cellulaire sophistiqué et reproductible.

Cette technique est appliquée aussi dans la détection et la quantification des cellules productrices de cytokines spécifiques. Pour cela, les cellules analysées sont préalablement incubées dans un milieu réactionnel renfermant deux anticorps couplés l'un avec l'autre par le fragment constant (Fc) : un Ac qui reconnaît spécifiquement un Ag de la surface des cellules et un autre Ac spécifique de la cytokine d'intérêt. Les cellules sécrètent la cytokine ciblée, qui est capturée par l'Ac spécifique. Un troisième Ac anti-cytokine, couplé à une particule magnétique, est ensuite rajouté pour purifier les cellules d'intérêt (productrices de la cytokine) par un tri magnétique. L'anticorps permettant le marquage magnétique de la cellule est souvent relié à une substance fluorochrome qui permet le passage direct des cellules sélectionnées dans le flux d'un cytomètre, se traduisant par un ensemble de données correspondantes au nombre de cellules productrices de cytokines.

#### ***4-5- Les techniques immuno-enzymatiques***

##### *4-5-1-Les marqueurs employés*

Dans ces techniques, les Ac servant de marquage sont généralement conjugués à des enzymes (ex. Peroxydase ; phosphatases alcalines et acides). Le résultat donne en présence d'un substrat chromogène, spécifique de l'enzyme ou après addition d'un indicateur de pH, une réaction colorée.

Les enzymes citées, une fois liées aux Ac spécifiques, sont largement utilisées en immunocytochimie ou en immunoenzymologie particulièrement dans le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

#### 4-5-2-Technique d'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

La technique ELISA, plus facile à mettre en place et moins onéreuse, remplace presque totalement la technique de RIA, basée aussi sur le principe d'une réaction immunologique sur support solide. Notamment que la phase de révélation du résultat n'utilise pas, comme pour la RIA, de radioéléments, mais plutôt une réaction enzymatique basée sur le clivage d'un substrat en un produit coloré. Pour détecter et/ou quantifier la présence dans un sérum d'un anticorps, son antigène spécifique est préalablement déposé dans un puits à fond plat d'une plaque en plastique. L'antigène est dilué dans un tampon bicarbonate à pH 9,6 ce qui favorise les interactions électrostatiques entre l'antigène et le plastique. Des dilutions limites (réalisée en série) du sérum contenant l'anticorps à doser sont alors déposées dans les mêmes puits. Après un temps de contact suffisant, les puits sont lavés avec une solution saline d'une manière à permettre la fixation sélective, des anticorps spécifiques sur l'antigène et donc du complexe Ag-Ac résultant, au plastique. On révèle ainsi la présence de l'anticorps en déposant, secondairement, un anticorps anti-Immunoglobuline marquée avec une enzyme (phosphatase alcaline ou peroxydase). Après lavage, il ne reste plus qu'à révéler la présence des anticorps spécifiques en ajoutant le substrat de l'enzyme ayant servi à marquer les anticorps anti-Immunoglobuline et à lire la réaction colorée [7].

Souvent cette méthode est réalisée dans une plaque de 96 puits appelée d'ailleurs *plaque ELISA* où au moins deux puits servent de contrôle (témoins négatif et témoins positif) :

- Témoins négatif : renfermant un échantillon de sérum ne contenant pas l'Ac recherché.
- Témoins positif : renfermant un échantillon de sérum qui contient l'Ac recherché.

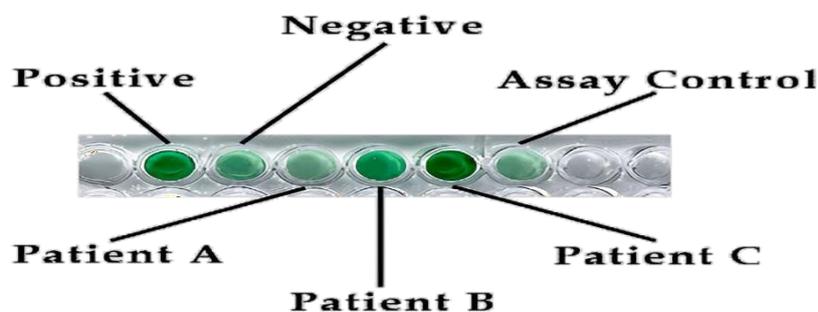
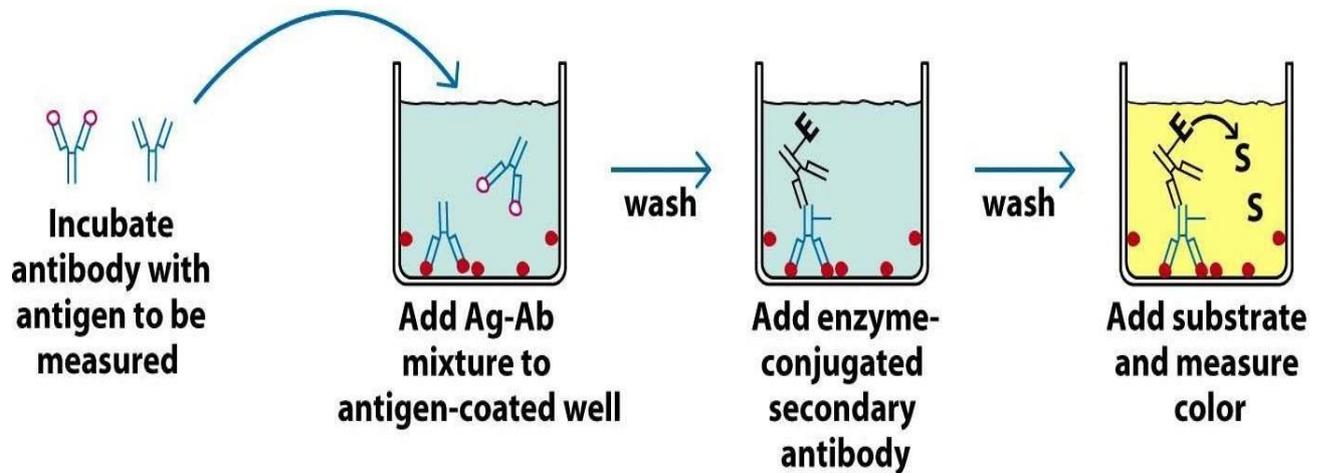


Figure 4-4 : principe de l'analyse sur plaque ELISA

Plusieurs variantes de la méthode ELISA existent.

#### 4-5-2-1-Technique ELISA compétitive

C'est une variante de la technique ELISA où après avoir incubé l'Ac de capture avec l'échantillon renfermant l'Ag recherché, le mélange est additionné dans les puits contenant initialement, le même antigène marqué. A partir de là, une compétition sur l'Ac primaire (de capture) se fera entre l'Ag marqué et celui contenu dans l'échantillon analysé. Enfin, l'Ac secondaire couplé à une enzyme est ajouté dans le milieu et après l'ajout du substrat de cette enzyme, la réaction colorée est mesurée en terme d'activité enzymatique qui reflète le taux en antigène (voir figure 4-5).



**Figure 4-5 :** Principe de la technique ELISA compétitive (Kuby Immunology, 2007).

#### 4-5-2-2-Le test ELISA en Sandwich

Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique basée sur la fixation des molécules à doser (Ag généralement) entre deux séries d'Ac, suivie d'une révélation par marquage enzymatique. On dit que l'Ag est pris en sandwich entre les deux anticorps (Ac de capture et Ac de révélation).

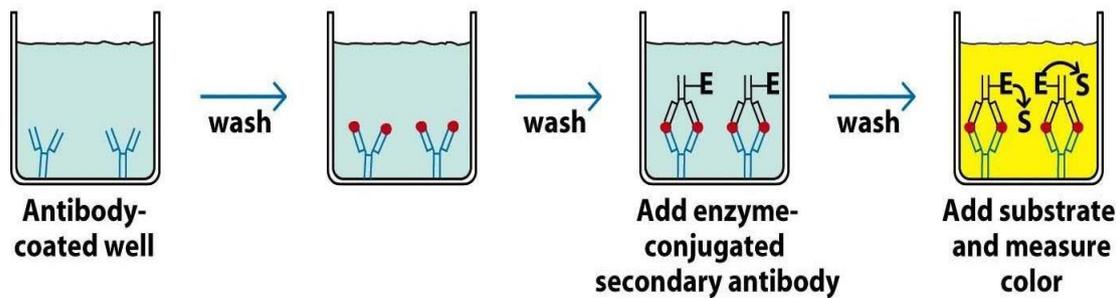
Cette technique est réalisée selon les étapes suivantes :

Etape 1 : Consiste à fixer le premier Ac ou Ac de capture sur un support solide en général une plaque de microtitration (Plaque ELISA), par son fragment Fc.

Etape 2 : Ajout de l'Ag à doser qui se fixera sur l'Ac de capture.

Etape 3 : Ajout d'un deuxième Ac reconnaissant l'Ag et couplé à une enzyme.

L'intensité de la coloration du milieu réactionnel quantifiée par la mesure de la densité optique (DO), après addition du substrat spécifique de l'enzyme, dans le cas d'une réaction positive est proportionnelle à la quantité d'Ag. La technique ELISA s'apprête au dosage de nombreuses molécules par référence à un étalon (solution d'Ag de concentration connue). Il s'agit d'une technique très utilisée vue sa grande sensibilité de l'ordre de pg/mL (voir figure 4-6).



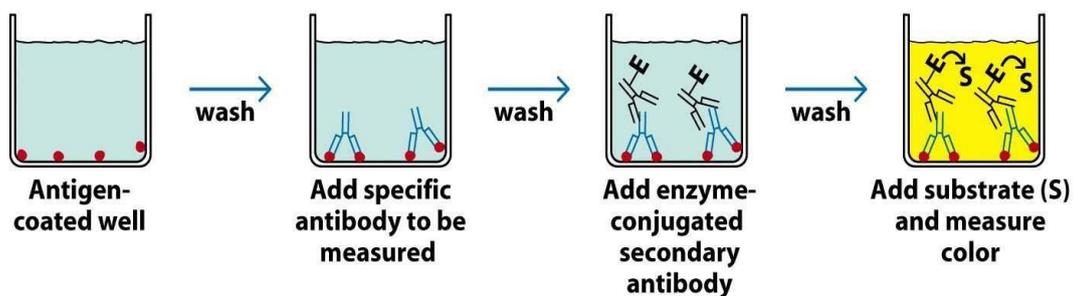
**Figure 4-6 :** Principe de la technique ELISA compétitive (Kuby Immunology, 2007).

#### 4-5-2-3-Identification et dosage d'un Ac par la technique ELISA

La technique ELISA permet également d'identifier et de doser un Ac dans un liquide biologique. Dans ce cas, la première étape consiste à fixer un Ag spécifique et connu sur le support [12].

Dans un deuxième temps, l'Ac à étudier est ajouté. La formation du complexe Ag-Ac est révélée dans une troisième étape par l'addition d'un anticorps secondaire couplé à une enzyme, cet Ac se fixe à la partie Fc de l'Ac à analyser : il s'agit d'un Ac anti-isotypique (anticorps anti-Ig).

Cette variante du test ELISA est utilisée en routine dans les laboratoires de diagnostic médical, surtout pour la détection des Ac anti-VIH et des marqueurs de l'Hépatite B.



**Figure 4-7 :** principe de la recherche d'un Ac spécifique par la technique ELISA (Kuby Immunology 7th Edition, 2013)

#### 4-5-2-4-La technique de l'Enzyme Linked Immuno-spot (ELISPOT)

Il s'agit d'un test immunologique développé en 1983 par l'immunologiste Cecil Czerkinsky et basé sur la technique ELISA, permettant de détecter et de dénombrer des cellules à partir de certaines molécules présentes dans leurs sécrétions (anticorps, cytokines,...).

La première étape consiste à une capture des molécules cellulaires ciblées, sur un support solide sensibilisé par des anticorps (ou antigènes dans le cas où la cible est un Ac). Ensuite après élimination des cellules dénaturées, le complexe immun formé est révélé par la démarche ELISA utilisant un substrat chromogène insoluble, qui forme avec le premier complexe, un précipité fixé sur un point donné sur le support, ce qui forme des immunospots [14].

La méthode ELISPOT représente ainsi une technologie de référence pour la mesure des réponses spécifiques des cellules (notamment les lymphocytes), appliquée notamment dans le développement de vaccins, l'étude et le diagnostic des maladies infectieuses, des allergies, des tumeurs et des maladies auto-immunes).

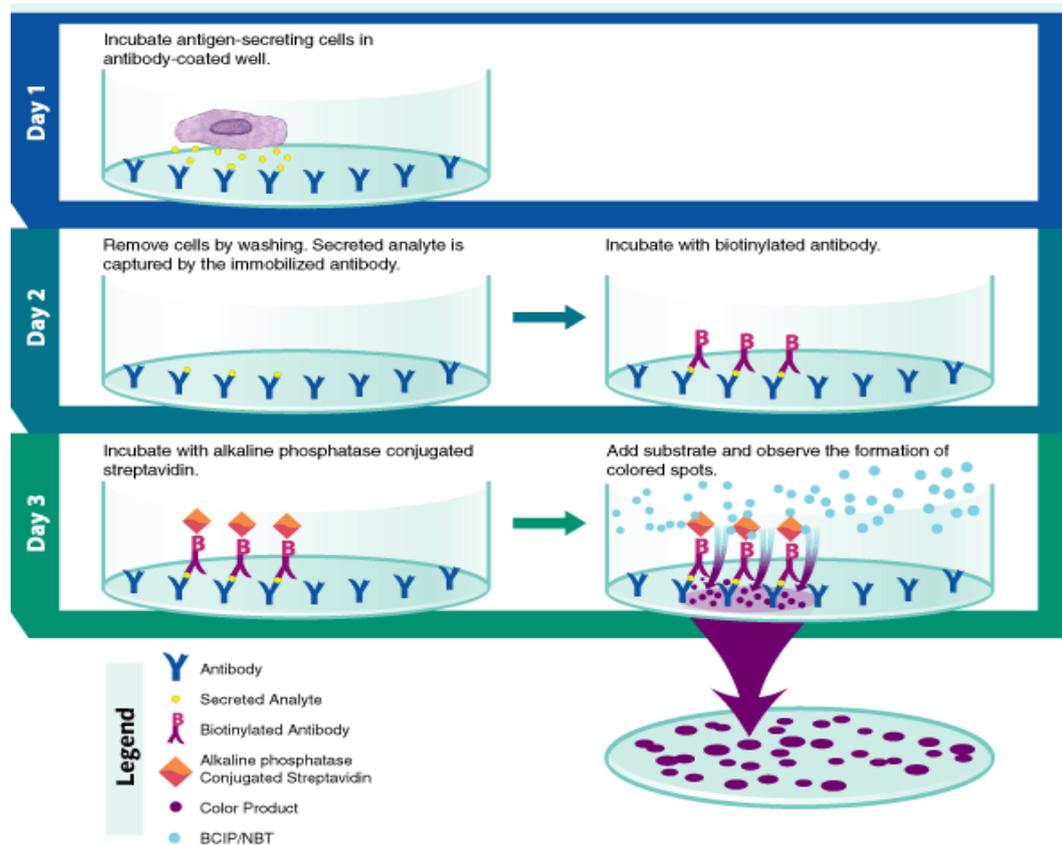


Figure 4-8 : Schéma illustrant le principe de la méthode d'ELISPOT (Bio-technne/RD system)

#### 4-5-3-L'immuno-empreinte ou Western Blot

Cette technique consiste d'abord à séparer par électrophorèse sur gel (en PAGE-SDS le plus souvent), les constituants d'un mélange renfermant l'Ag. Une fois les constituants séparés selon leur poids moléculaire ou même selon leur charge, un transfert est effectué sur une membrane de nitrocellulose. L'Ag est ensuite focalisé ou localisé après incubation avec une solution d'Ac spécifiques couplés à une enzyme, un radio-isotope ou un fluorochrome (<https://www.futurasciences.com>).

Cette technique est très sensible et largement appliquée en recherche mais aussi pour étudier les spécificités des Ac dans l'infection par le VIH (confirmation ou infirmation du test ELISA).

Soit pour la recherche et la détection de protéines intracellulaire, après lyse des cellules ciblées par l'analyse :

Ou la mise en évidence et la détection de protéines virales, notamment dans le diagnostic des infections virales dues aux VIH ou au virus de l'hépatite virale. Ce qui nécessite une dissociation préalable des particules virales, comme le montre la figure suivante, en présence du SDS, un agent de dissociation :

L'électrophorèse PAGE-SDS est basée sur le principe de migration dans le gel de Polyacrylamide, en utilisant des protéines standards, appelées souvent : Marqueurs de taille, afin d'estimer les PM des protéines antigéniques séparées et facilitant leur identification :

Une approche alternative pour éviter les problèmes liés à la manipulation de substances radioactives consiste à lyser les cellules directement dans un tampon riche en détergent. Le lysat cellulaire ou tissulaire ainsi obtenu est incubé avec du SDS et soumis à une électrophorèse en gel de Polyacrylamide. Les protéines ainsi séparées en fonction de leur masse moléculaire sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps marqué spécifique. Après lavage pour éliminer la fixation d'anticorps non spécifique, la position des protéines est révélée à l'aide d'un Ac anti-Ig marqué avec un radioélément ou une enzyme. Cette méthode appelée Western blot a de nombreuses applications en biologie clinique. Elle permet notamment de détecter la présence dans le sérum des patients HIV+ d'anticorps spécifiques du virus et donc de contribuer au diagnostic de l'infection.

La procédure expérimentale de la technique du western blot (W.B ou immuno-emprunte) est basée sur les étapes clés suivantes :

**1-Séparation des protéines cibles sur électrophorèse.**

2-Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

3-Coloration au Rouge S Ponceau (facilement lavable) et prise du profile (en rouge) en photo : témoin.

4-Décoloration de la membrane de NC par lavage du Rouge S Ponceau.

5-Saturation de la membrane de nitrocellulose par la BSA ou lait écrémé (protéines du lait)

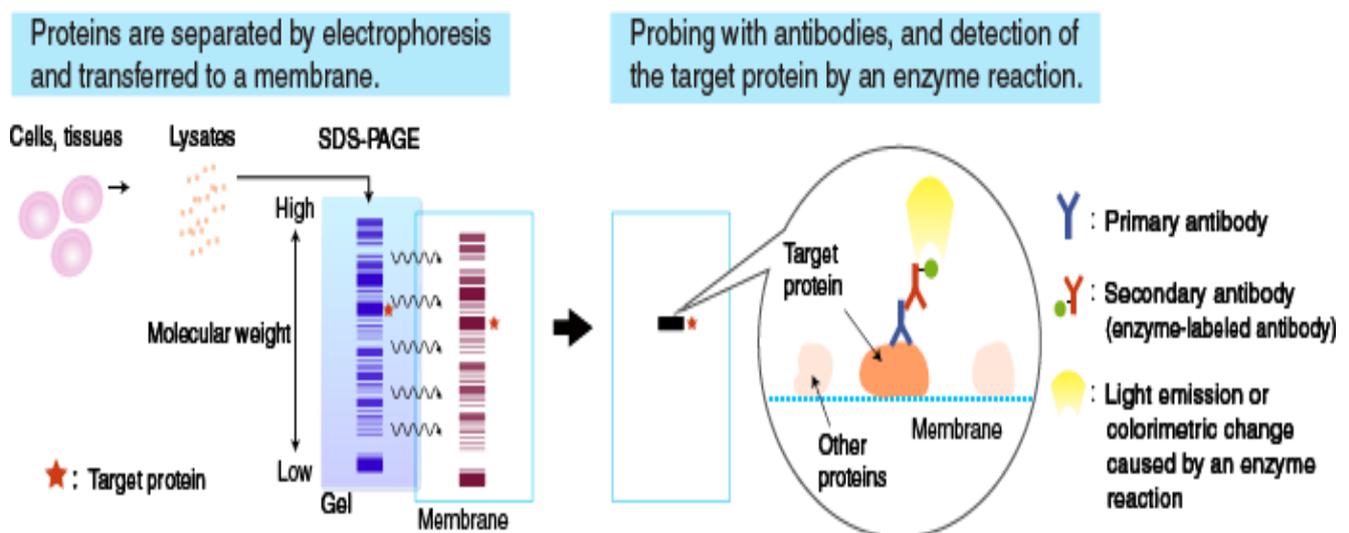
6-Ajout de l'anticorps primaire.

7-Ajout de l'anticorps secondaire d'espèce différente (Ac anti-Ig) marqué (greffé souvent avec une enzyme).

8-Ajout du substrat de l'enzyme et détection de la réaction enzymatique.

9-Prise d'un profile autoradiographique

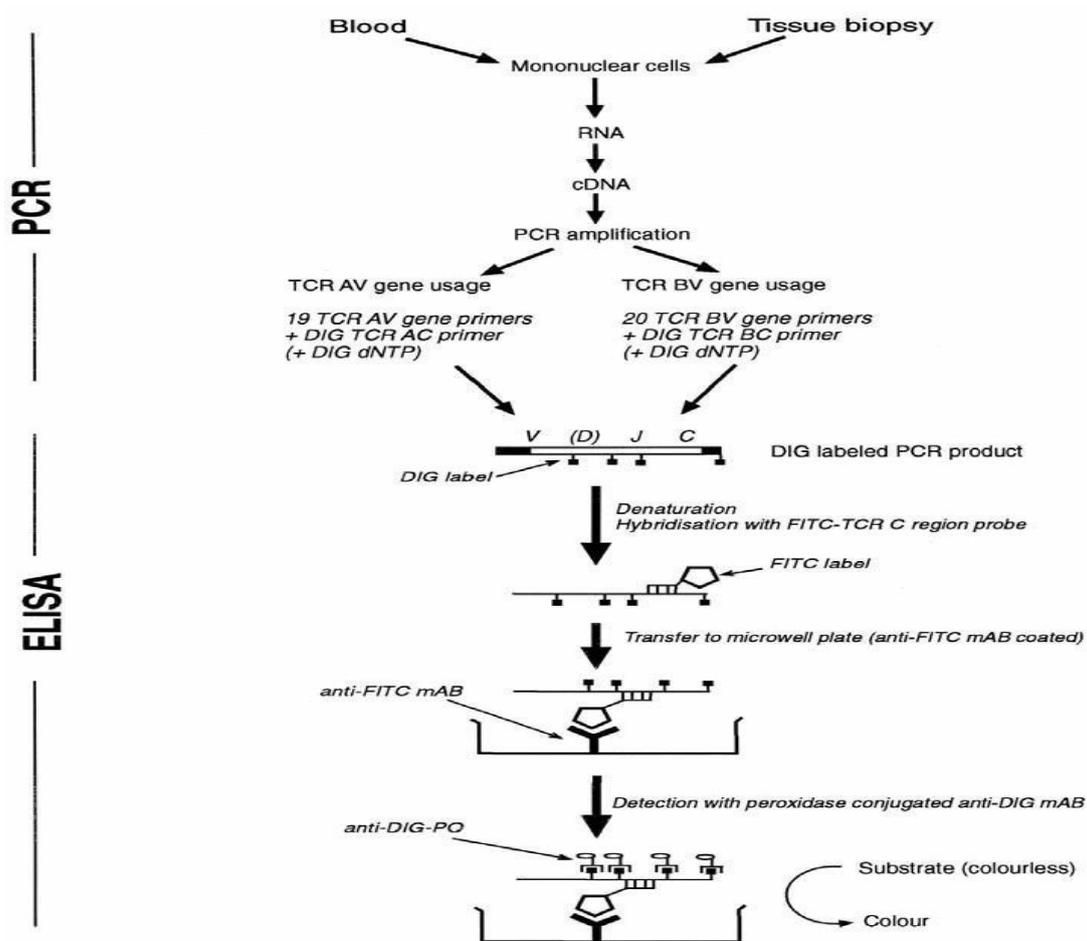
La figure ci-après illustre la démarche du W.B.



**Figure 4-9 :** Procédure du western blot (Source: MBL International A JSR Sciences Company)

#### 4-5-4-La PCR-ELISA

Cette méthode regroupe une étape de Polymerase Chain Reaction (PCR) utilisée en biologie moléculaire pour l'extraction et l'amplification du gène codant un anticorps ou un récepteur cellulaire d'un lymphocyte, spécifique d'un anticorps ou d'un autre médiateur immunologique, et d'une étape de détection, par la technique ELISA, du produit d'expression du gène étudié, sur un clone cellulaire. Le gène peut être issu d'un tissu (ou biopsie) ou même à partir du sang.



**Figure 4-10** : Schéma de la PCR-ELISA.

Après l'extraction de l'ARNm du gène étudié, celui-ci est transcrit par Transcriptase inverse en ADN codant. L'ADN codant correspondant au gène cible est ensuite amplifié par PCR en présence d'autres séquences génétiques d'intérêt analytique : celle de digoxigénine DIG (un marqueur de révélation de séquences d'ADN) et celles correspondant à des séquences signales des récepteurs lymphocytaires TCR AV et TCR BV. Après l'amplification, les régions géniques TCR sont hybridées avec un marqueur fluorescent, la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Le complexe est transféré sur microplaque préalablement préparée avec un anticorps monoclonal de capture spécifique de la FITC. Après fixation du complexe Ac anti-FITC-séquence génétique hybridée, le tout est pris en sandwich et révéle par ajout d'anticorps secondaire de révélation, l'anticorps monoclonal anti-DIG couplé la peroxydase. La réaction est achevée ainsi après ajout du substrat de la peroxydase permettant de quantifier le signal de détection et de dosage de l'antigène, qui est représenté par les séquences d'ADN du gène ciblé.

## Partie exercices corrigés

### Exercice 01

#### Obtaining Rabies Virus Purified Antigen

Aisu I. Nadyrova<sup>1</sup>, Antonina G. Mukhamedzhanova<sup>2</sup>, Albert N. Chernov<sup>2</sup>,  
Marina A. Efimova<sup>1,3</sup>, Haris N. Makaev<sup>2</sup>

Asian Journal of Pharmaceutics • Oct-Dec 2018 (Suppl) • 12 (4) | S1299

Afin d'étudier l'antigène de virulence du virus de la rage, une suspension cérébrale de 20 % de cerveau d'un agneau infecté par une souche du virus de la rage "Ovechiy" GNKI a été utilisée. La suspension a été homogénéisée sur un appareil *Fast-Prep 24 (MP Biomedicals)* pendant 20 secondes en présence de particules de carbure de silicium uniformes. Ensuite le mélange a été déposé sur une micro centrifugeuse (*5804R*) à 4200 g pendant 60 min. Le surnageant résultant a été ultracentrifugé à 37 000 g pendant 90 min, puis le précipité formé a été dissous dans du Tris-HCl 0,02 M. La purification du matériel contenant le virus a été effectuée par décantation et séparation par densité sur gradient de saccharose de 20 à 60 % dans une ultracentrifugeuse *Optima L-90K (Beckman)* à 30 000 g pendant 240 min, suivie d'une chromatographie de filtration sur gel. La pureté des antigènes isolés a été contrôlée par électrophorèse dans un gel de Polyacrylamide à 12,5 % en présence de 0,1 % de dodécylsulfate de sodium. Cette démarche a été suivie par un transfert sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Bio-Rad) et une identification immunologique par des sérums hyperimmuns de lapins.

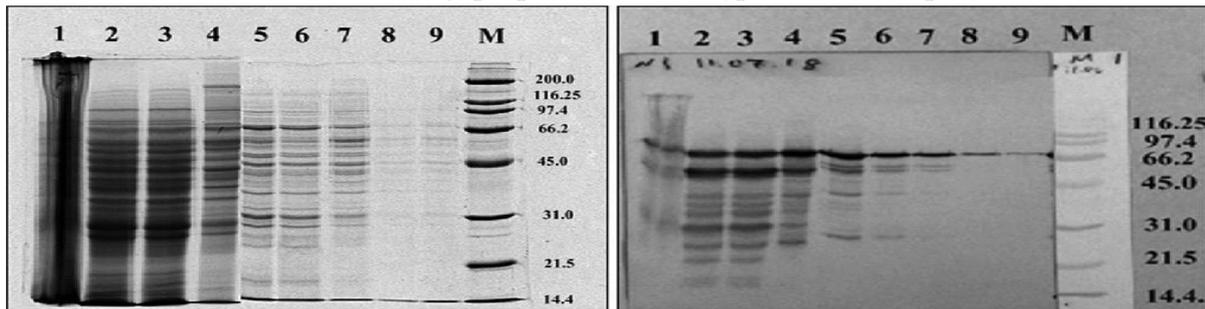


Figure 1 : Analyse de l'activité des fractions antigéniques : (Gauche) - électrophorèse PAGE-SDS ; (Droite) - Immunoblot avec sérum de lapin hyperimmun : 1 - suspension cérébrale originale ; 2 - surnageant après centrifugation (4200 g) ; 3 - surnageant après ultracentrifugation (37000 g) ; 4 - matériel viral avant séparation sur gradient de sucrose (stratification) ; 5 - Fraction 1 (zone 20-30% de sucrose) ; 6 - Fraction 2 (zone 30-40% de saccharose) ; 7 - Fraction 3 (zone 40-50% de saccharose) ; 8 - Fraction 4 (zone 50-60% de saccharose) ; 9 - Fraction 5 (à 60% de sucrose) ; M - marqueur de masses moléculaires moléculaire large gamme (Bio-Rad).

1-Interprétez les résultats trouvés dans l'article, en faisant un lien entre les différentes techniques immunologiques mises en place à travers ces travaux.

2- Expliquez le principe et l'intérêt des manipulations suivantes dans l'article :

a-Transfert sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, Bio-Rad).

b-Ajout de 0,1 % de dodécylsulfate de sodium dans l'électrophorèse.

c-Ultracentrifugeuse *Optima L-90K (Beckman)* à 30 000 g pendant 240 min.

3-Avez-vous une idée sur le PM des antigènes viraux identifiés dans cet article ? Justifiez votre réponse.

### Corrigé de l'exercice 01

En comparant le profile électrophorétique avec le profile obtenu après révélation immunologique (Western Blot) où des anticorps spécifiques d'un mélange des antigènes viraux, ont été utilisés, on remarque que la majeure partie des bandes de migration (séparation) sont localisées entre 45 et 67KDa.

Il apparaît clairement que l'intérêt de l'immuno-emprunte est d'identifier l'antigène viral, parmi la grande diversité des protéines séparées sur PAGE-SDS, à partir de l'homogénat cellulaire cérébral.

Néanmoins, la majorité des fractions antigéniques du virus est récupérée dans les fractions récupérées entre 20% et 50% de saccharose, avec apparition du même nombre de bandes migrées (02 bandes protéiques : une située à environ 50KDa et une autre plus grande à 66,2KDa, bien claires et denses) en comparaison aux extraits cérébraux avant séparation sur gradient de densité, à savoir :

- La suspension cérébrale originale.
- Le surnageant après centrifugation (4200 g).
- Le surnageant après ultracentrifugation (37000 g).
- Le matériel viral avant séparation sur gradient de sucrose (stratification).

A des teneurs en sucrose supérieurs à 50%, seule l'antigène localisé à un PM de 66,2KDa est récupéré, et encore, à de faibles concentrations, vue la bande apparue avec une densité moins importante.

### **Exercice 02**

Dans le but d'étudier l'évolution d'un cancer du tractus digestif, le marqueur tumoral ACE (Antigène Carcinoembryonnaire) a été identifié. Pour cela, une biopsie de l'estomac est réalisée : les cellules récupérées sont soumises à une lyse cellulaire et leurs protéines membranaires ont été déposées sur un gradient de sucrose allant de 5 à 60%, suivie d'une ultracentrifugation (UC). La fraction initiale (avant dépôt sur gradient de sucrose) ainsi que chacune des fractions séparées sur gradient sucrose, ont fait l'objet d'une migration électrophorétique sur PAGE-SDS en présence du  $\beta$ -Mercaptoéthanol, suivie d'une identification par Western Blot. Le tableau ci-après résume les résultats obtenus.

**(Remarque :** *l'épaisseur des bandes de migration diffèrent selon leur concentration dans chaque fraction*)

<b>Fractions étudiées</b>	<b>F1 : avant UC sur gradient de sucrose.</b>	<b>F2 : Entre 0 et 5% de sucrose</b>	<b>F3 : entre 5 et 20% de sucrose.</b>	<b>F4 : entre 20 et 45% de sucrose.</b>	<b>F5 : entre 45 et 60% de sucrose.</b>
<b>Sur PAGE-SDS</b>	05 bandes de migration : aux PM : 12, 33, 68, 115 et 125 (KDa)	05 bandes de migration : aux PM : 12, 33, 68, 115 et 125 (KDa)	04 bandes de migration : aux PM de 33, 68 et 115 et 125 (KDa)	02 bandes de migration : aux PM de 115 et 125 KDa.	01 bande de migration : au PM de 125 KDa.
<b>Sur western blot (après révélation immunologique)</b>	02 bandes de migration : aux PM 12 et 115 (KDa).	02 bandes de migration : aux PM 12 et 115 (KDa).	01 bande de migration : au PM de 115 KDa.	01 bande de migration : au PM de 115 KDa.	Absence de bandes de migration propres à l'échantillon analysé.

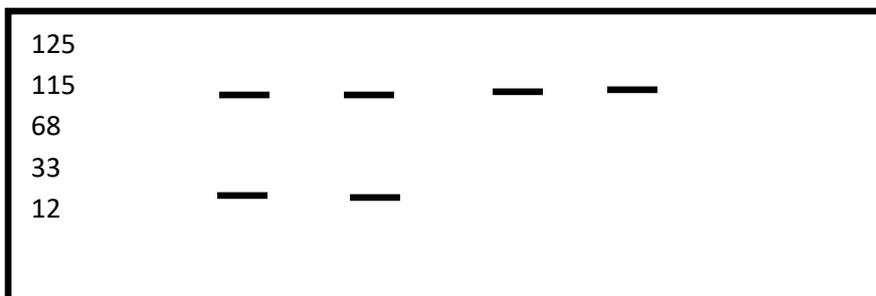
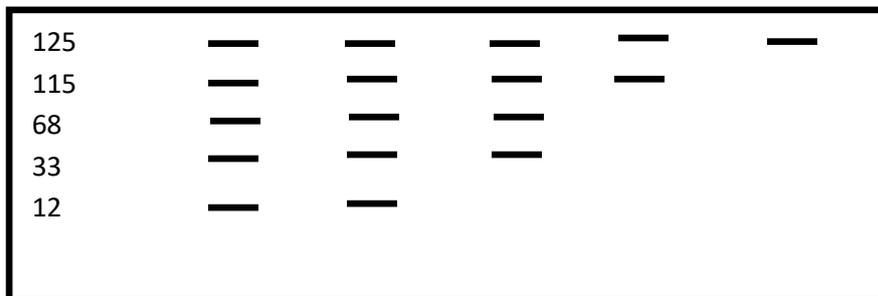
**Questions :** *il est à noter que certaines fractions contiennent quelques molécules non séparées sur le gradient (contaminantes).*

- 1-Schématisez les résultats trouvés et représentés sur le tableau ci-dessus, en illustrant les bandes de migration, dans chaque fraction (**05 points**).
- 2-Interprétez les résultats trouvés, sachant qu'une migration de la fraction F1 sur PAGE-SDS en absence du  $\beta$ -Mercaptoéthanol révèle 04 bandes aux PM : 33, 68, 125 et 127 (KDa) sur PAGE-SDS et 01 seule bande sur Western blot (après révélation immunologique) au PM :127 KDa. (**04 points**).
- 3-Trouvez le poids moléculaire de l'antigène étudié (**02 points**).
- 4-Si on souhaite confirmer la présence du marqueur tumoral étudié, dans l'échantillon analysé, quelle technique proposerez-vous et quelle est la fraction idéale à analyser, parmi les 05 fractions représentées dans le tableau ci-dessus ? Décrivez l'expérience à réaliser (**04 points**).
- 5-Sachant que le Western Blot est fait en utilisant un Ac monoclonal, pensez-vous que l'antigène analysé est composé de plusieurs épitopes ? Justifiez votre réponse et proposez une technique complémentaire pour confirmer votre résultat.

**Corrigé de l'exercice 02**

**1-représentation schématique des profils électrophorétiques :**

Par ordre des fractions (de gauche à droite : F1 ; F2 ; F3 ; F4 ; F5) avec : profils PAGE-SDS en haut et profils western blot en bas (**05 points**).



**2-Interprétation des résultats :**

Les protéines sont séparées dans le gradient de sucrose selon leur densité, qui reflète leur taille, d'ailleurs on voit bien la corrélation entre la densité des fractions et le PM des protéines retrouvées dans chacune des fractions, ainsi plus la densité du sucrose augmente,

plus la taille des molécules protéiques augmente. Les protéines de haut PM sont récupérées (séparées) dans les fractions obtenues à des valeurs élevées en sucrose. En comparant les profils du gel PAGE-SDS avec celui du western blot (WB), on remarque que l'antigène étudié est identifié dans les conditions dissociantes aux deux PM : 12 et 115 KDa. D'ailleurs lors de la récupération de la protéine 115KDa en absence de la protéine 12KDa, à partir de la fraction F3 jusqu'à la fraction F4, il y a une seule bande sur le profil WB correspondante au PM de 115 KDa. Puis à la fraction F5 où seule la protéine de 125KDa est récupérée, il y a absence totale de reconnaissance immunologique. Dans les conditions natives (en absence du  $\beta$ -Mercaptoéthanol), il y a uniquement 04 bandes protéiques détectées dans la fraction F1 (avant séparation sur gradient sucrose) dont une nouvelle molécule de 127KDa, qui est d'ailleurs la seule existante au niveau du profil WB. Ce résultat atteste que l'antigène ACE étudié est une protéine dimérique composée de deux sous-unités de 115 et 12 KDa, respectivement.

**3-**Le poids moléculaire de l'antigène étudié est de 127KDa.

**4-**Si on veut confirmer la présence de l'Ag étudié dans l'échantillon analysé, on peut utiliser la technique ELISA simple. Choix de la fraction à analyser :

Si la migration électrophorétique se fait dans les conditions natives, l'idéale est de choisir la fraction F5 (récupérée entre 45 et 60% de sucrose) qui contiendra une grande concentration de la protéine de grand PM (à l'état natif) qui est de 127 KDa qui représente justement l'antigène entier, étudié, avec moins d'impuretés (autres protéines de PM plus faible). Dans ces mêmes conditions, la fraction F4 peut être aussi choisie du fait de la présence de la protéine 127, mais il faut savoir que plus on choisit des fractions récupérées à des faibles concentrations en sucrose, plus la détection est moins fiable, ce qui est dû à la présence des autres molécules de contamination (de faibles PM).

Si la migration électrophorétique se fait dans les conditions dénaturantes, il est inévitable que le choix doit se faire sur la fraction F1 qui contiendra l'ensemble des deux sous-unités constituant l'antigène : 12 et 115.

Procédure : on verse sur la plaque ELISA l'échantillon analysé, après fixation, on réalise un lavage suivi de la saturation du support par des protéines globulaires (BSA ou protéines de lait écrémé), puis on rajoute l'anticorps monoclonal spécifique de l'Ag analysé. Cet Ac est couplé à une enzyme de type peroxydase. Après lavage pour éliminer les protéines libres, on rajoute le substrat de l'enzyme et un indicateur de pH. La mesure des absorbances dans les puits de la plaque ELISA nous renseigne sur la concentration en Ag détecté par l'Ac utilisé.

**5-**Oui l'Ag analysé est composé de plusieurs épitopes, au moins Deux.

Cela peut s'expliquer par l'apparition de deux bandes sur le profil WB dans la fraction F1 (en conditions dissociantes), car les deux sous-unités séparées sont détectées par une réaction immunologique avec le même anticorps monoclonal, ce qui fait que les deux sous-unités : de 12 et de 115 KDa respectivement possède des épitopes en commun.

Pour confirmer cette hypothèse, on peut employer la méthode d'Ouchterlony :

Après avoir séparé les deux sous-unités dans deux différentes fractions : on peut réaliser une filtration sur une membrane permettant la séparation des deux sous-unités 12 et 115 KDa, de la fraction F1 après son traitement par le  $\beta$ -Mercaptoéthanol (suivi d'un chauffage), puis une filtration sur membrane permet d'obtenir deux fractions F1 (contenant la protéine de 12KDa) et F1' (contenant la protéine de 115 KDa) en utilisant une membrane de seuil de coupure approprié (par exemple de 50KDa). Ensuite au puits du centre de la gélose on injecte l'Acm et dans deux puits adjacents du contour de la même gélose, on injecte chacune des deux fractions F1 et F1'. L'apparition d'un Arc de précipitation continu, correspondant à une réaction d'identité totale, est preuve que les deux sous-unités sont reconnues par l'Acm et présentent donc le même épitope qui se répète deux fois : le même épitope.

### Exercice 03

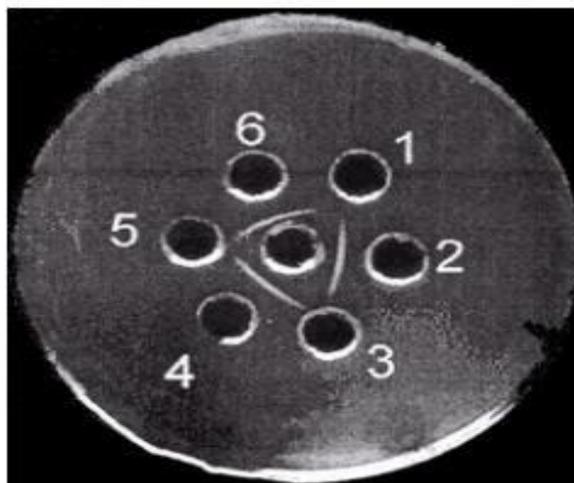
La vitellogénine est une protéine animale transportée par le sang et stockée dans les ovaires. On émet l'hypothèse que chaque vitellogénine est spécifique de l'espèce qui la fabrique. À partir de l'analyse des résultats présentés ci-dessous, indiquez si l'hypothèse précédente est validée ou non. L'expérience porte sur l'étude des vitellogénines de trois espèces de Xénopes par le test d'Ouchterlony : *Xenopus laevis*, *Xenopus borealis* et *Xenopus tropicalis*.

Résultats :

Dans une boîte de Pétri renfermant un gel d'agarose, 7 puits ont été creusés et reçoivent :

-Puits central : sérum d'un lapin ayant reçu plusieurs jours avant le prélèvement, une injection de vitellogénine de *Xenopus laevis*.

-Puits périphériques : 1. du sérum de lapin normal 2. De la vitellogénine de *Xenopus laevis* femelle, 3. du sérum de *Xenopus laevis* mâle, 4. de la vitellogénine de *Xenopus borealis* femelle 5. De l'albumine d'œuf de poule 6. De la vitellogénine de *Xenopus tropicalis* femelle.



### **Corrigé de l'exercice 03**

L'apparition d'arcs de précipitation entre le puits central renfermant du sérum d'un lapin préalablement immunisé par la vitellogénine de *Xenopus laevis* et les puits périphériques 2, 4 et 6 renfermant les vitellogénines des femelles des 3 espèces différentes : *Xenopus laevis*, *Xenopus borealis*, *Xenopus tropicalis* prouve une réaction immunologique entre les Ac du sérum du lapin et les antigènes de la vitellogénine des 3 espèces. D'autre part, l'absence des arcs de précipitation au niveau des autres puits : 1, 3 et 5 renfermant soit du sérum des animaux mâles étudiés ou de l'albumine d'œuf de poule (pour le puits N°05) atteste parcontre l'absence d'une réaction Ag-Ac due à l'absence de vitellogénine dans les sérums testés. De ce fait la reconnaissance des différentes molécules de vitellogénines produites par les 3 espèces différentes de *Xenopus* par les mêmes anticorps, dirigés contre la vitellogénine de *Xenopus laevis* est une preuve de l'existence de déterminants antigéniques (épitopes) communs entre les vitellogénines des 3 différentes espèces.

En conclusion, l'hypothèse émise en début de l'expérience n'est pas validée.

## Références bibliographiques

- [1] Allouni R. (2020). Cours d'immunologie générale. Section biotechnologie. Université Ferhat Abbas. Sétif. Algérie.
- [2] monde.ccdmd.qc.ca In : Kaplon H. et Carnoy C. (2015). ACHERA : Guide des anticorps monoclonaux et protéines de fusion à usage thérapeutique. Université de Lille 2. 79p.
- [3] Roopenian D. C. and Akilesh S. (2007). FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol.* 7(9):715-25. doi: 10.1038/nri2155.
- [4] Lgu ensat A., Sayah K., Abbad A. et Elou a ii (2015). Réaction antigène-anticorps appliquée en techniques immunologiques. Faculté des sciences et techniques. Université Abdelmalek Essaadi - Tanger.
- [5] Allard b. (2012). Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers. Thèse de Doctorat en Immunologie. Université Paris-Sud 11. France. Pp241.
- [6] Béné, M., C., Drouet, C., Fisson, S., Seillès, E., Méthodes en immunologie : Des principes aux bonnes applications, 2014, Elsevier Masson 62, ISBN : 978-2-294-74022-0, ISBN numérique : 978-2-294-74159-3, Issy-les-Moulineaux cedex, France.
- [7] Touaitia R. (2020). Immunologie appliquée. Université Tébessa. Algérie. 23p.
- [8] Weill B. Laboratoire d'immunologie. Faculté de médecine Cochin-Port Royal. Chapitre 24- méthodes en immunologie.  
[https://lvts.fr/Pages\\_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%2024.htm](https://lvts.fr/Pages_html/Encyclopedies/Cours%20Immuno/chapitre%2024.htm)
- [9] Mattee M. I. N. (2011). Serological tests involved in identification of infectious agents  
[Excellnet serological tests in identification of infectious agents \(slideshare.net\)](https://www.slideshare.net/Excellnet-serological-tests-in-identification-of-infectious-agents)
- [10] Six A. (2009). Introduction aux techniques immunologiques (Immuno-chimie). Université Pierre et Marie Curie.  
[http://adrien.six.online.fr/DESCLI2009/Document/DESCLI2009\\_ET01&ET02\\_Screen.pdf](http://adrien.six.online.fr/DESCLI2009/Document/DESCLI2009_ET01&ET02_Screen.pdf)

[11] Aryal S. (2022). Radial Immunodiffusion- Principe, Procedure, Results, Uses. Immunology. Radial Immunodiffusion- Principe, Procedure, Results, Uses (microbenotes.com).

[12] Allouni R. (2020). Cours d'immunologie générale. Section biotechnologie. Faculté SNV. Université de Setif. Algérie. 67p.

[13] Robert B., De Vaux Ch. St. Cyr., Robert L. et Grabar P. (1959). Etude comparative par immunoélectrophorèse et par polarographie des extraits trichloracétiques et perchloriques du sérum humain normal. Clinica Chimica Acta. 4 (6) : 828 – 840.

[14] Madeleine Howell-Moroney (2022). Radioimmunoassay. [Radioimmunoassay | The Embryo Project Encyclopedia \(asu.edu\)](https://www.asu.edu/embryo-project-encyclopedia/radioimmunoassay).

[15] Zafrani L., Monneret G. (2017). Comprendre la cytométrie en flux. Méd. Intensive Réa (2017)26:517-522 DOI 10.1007/s13546-017-1317-5

[16] Owen J., Punt J., Stranford S. A., Jones P. P. (2013). Kuby Immunology. Nort American. 7<sup>th</sup> edition. Pp692.

#### **Sites web utilisés :**

<https://docplayer.fr/19298126-Methodes-immunochimiques.html>.

[The principle and method of Western blotting \(WB\) - MBL \(mblintl.com\)](https://www.mblintl.com/the-principle-and-method-of-western-blotting-wb)

antibodis-online GmbH Scholes-Rahe-Str. 15 / 52072 Aachen. Allemagne.

Garland Publishing. Current Biology. <http://www.biology.arizona.edu> – 1998

<https://microbiologie-clinique.com/Elisa.html>

memobio.fr

<https://theory.labster.com/ab-structure-fr/>

<http://droguet-sebastien.e-monsite.com/pages/activites-technologiques-terminale-2014-2015/immunoprecipitation-simple-methode-de-mancini.html>).

[http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/micro161/antigeantibody\\_reactions/Chap5\\_Ag\\_Ab\\_reactions.htm](http://www2.hawaii.edu/~johnb/micro/micro161/antigeantibody_reactions/Chap5_Ag_Ab_reactions.htm)

