Immunologie Clinique

Le but de l'immunologie clinique est, le plus couramment, de détecter les réponses en anticorps ou de détecter les réponse cytotoxiques du corps.

I_ Réaction antigène/anticorps en milieu gélosé

→ Voir TD (Quel bordel !)

II_ Réaction antigène/anticorps en milieu gélosé

A. Agglutination

Lors de l'agglutination, les anticorps et les antigènes s'associent de manière à former un **réseau**. S'il y a *beaucoup d'antigènes et d'anticorps*, on observe le précipité à l'œil nu, c'est **l'agglutination directe**. Mais si la *quantité d'antigènes et d'anticorps est trop faible*, on peut artificiellement déclencher l'agglutination afin de l'observer ; c'est **l'agglutination indirecte**.

Remarque : l'agglutination est optimale avec les IgM

Infos : Groupes sanguins

Les personnes du groupe A possèdent des anticorps anti-B. Celles du groupe B, des anticorps anti-A. Les personnes du groupe AB n'ont pas de tels anticorps tandis que les personnes du groupe O ont des anticorps anti-A et anti-B.

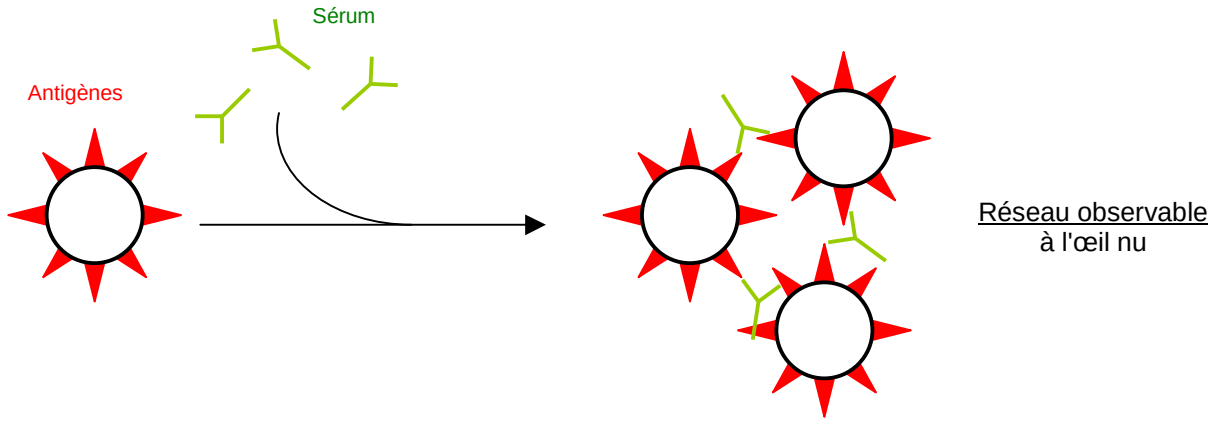
Infos : Rhésus

Pendant la gestation, une partie du sang de l'enfant passe dans le sang de la mère. Si leurs rhésus sont différents, la mère va produire des anticorps contre les hématies de l'enfant. Cela posera des problèmes au deuxième enfant, car le système immunitaire de la mère va détruire ses hématies.

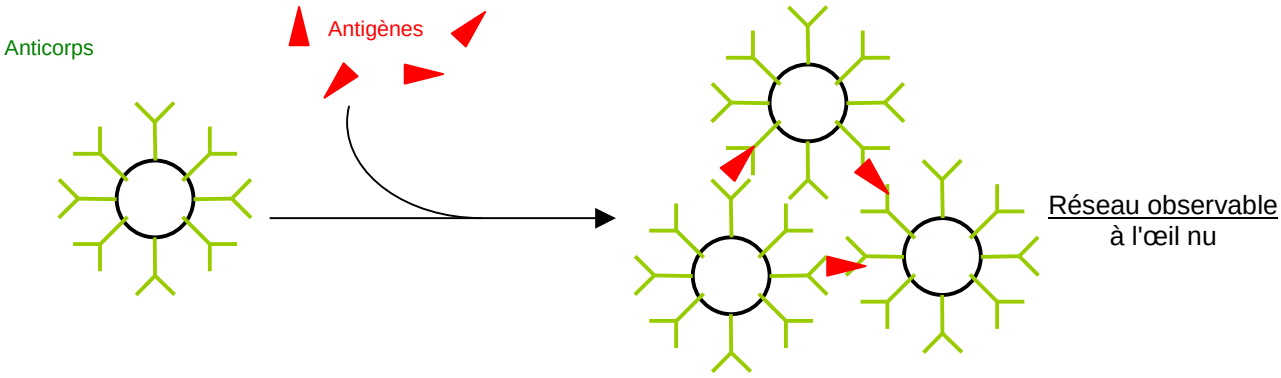
Pour pallier à ce problème, on injecte artificiellement des anticorps dans le sang de la mère qui vont neutraliser les hématies de l'enfant dans le sang de la mère, avant que la mère ne fabrique ses propres anticorps.

► Agglutination indirecte

On fixe des antigènes sur des billes de plastique (latex ou polystyrène) voire parfois des cellules. Ces billes étant volumineuses, on observe beaucoup mieux la formation d'un réseau.



Il est aussi possible de faire l'inverse, c'est-à-dire d'attacher des anticorps sur des billes afin de tester quels sont les antigènes compatibles avec certains anticorps.



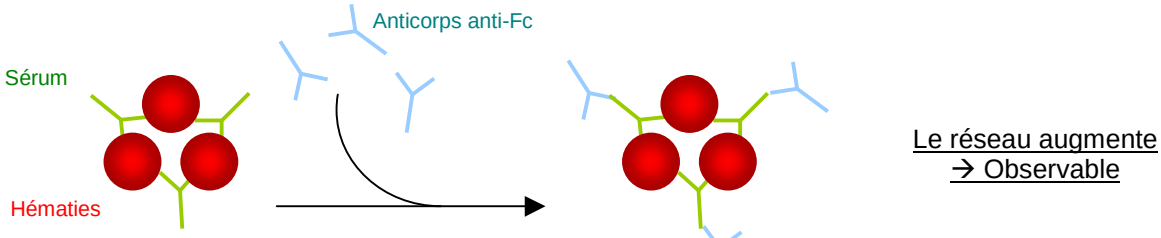
Exemples d'application :

- Repérer un agent pathogène
- Détecter la présence de produits dans le corps (drogues, dopants …)
- Détecter la présence de contaminations dans les produits agro-alimentaires

Test de Coombs

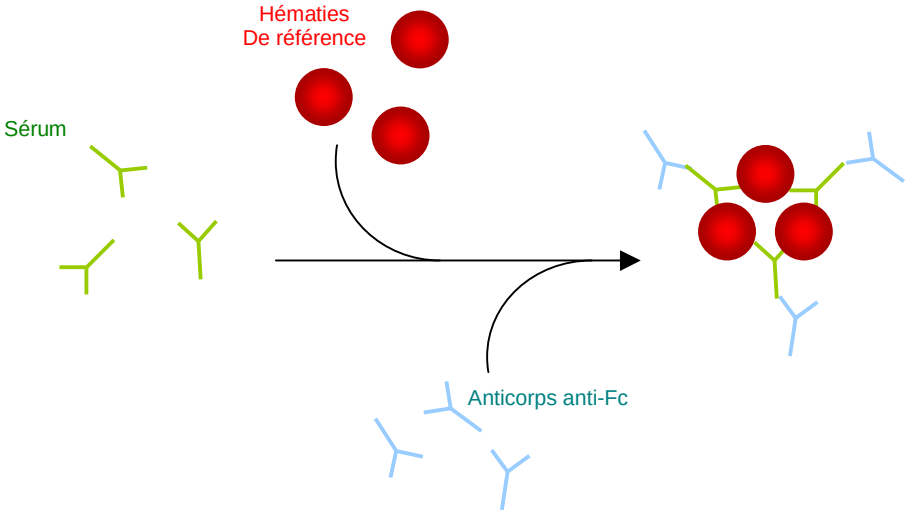
Ce test permet de détecter les maladies auto-immunes contre les hématies.
On effectue un test direct et indirect :

→ Direct



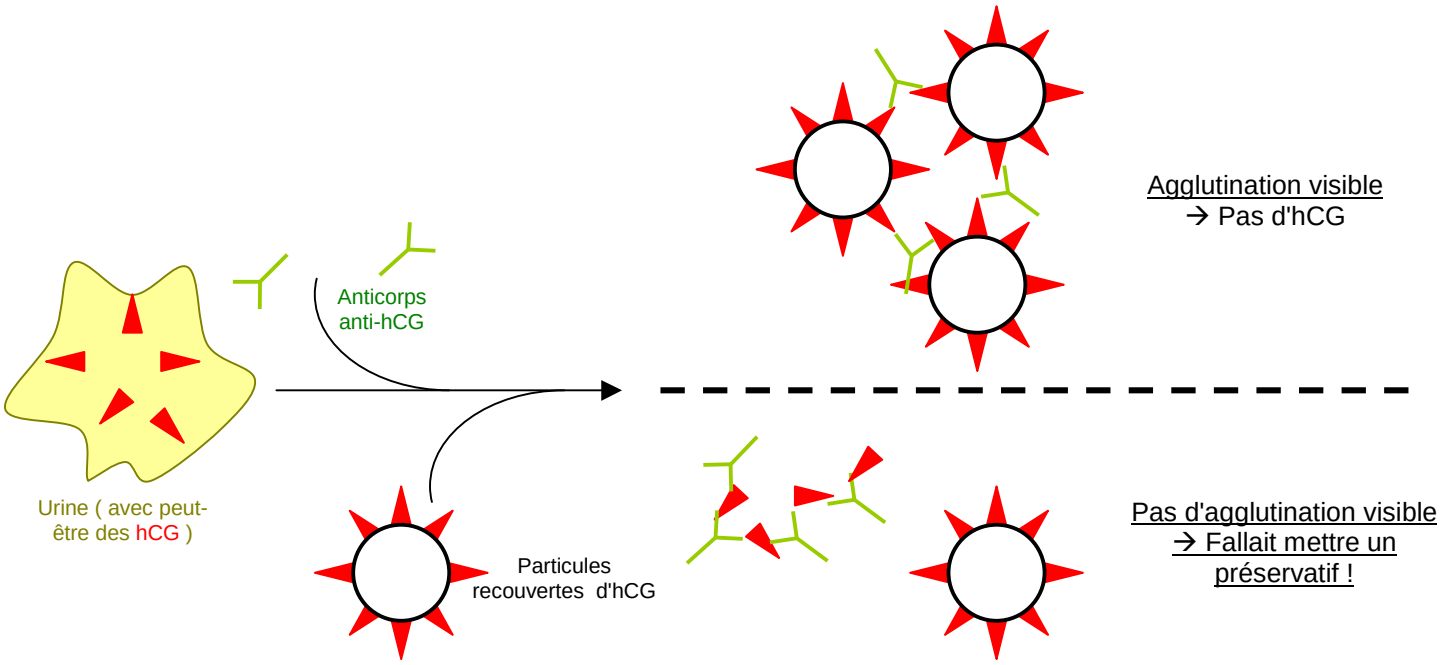
Agglutination directe
→ Inobservable

→ Indirect : test de confirmation



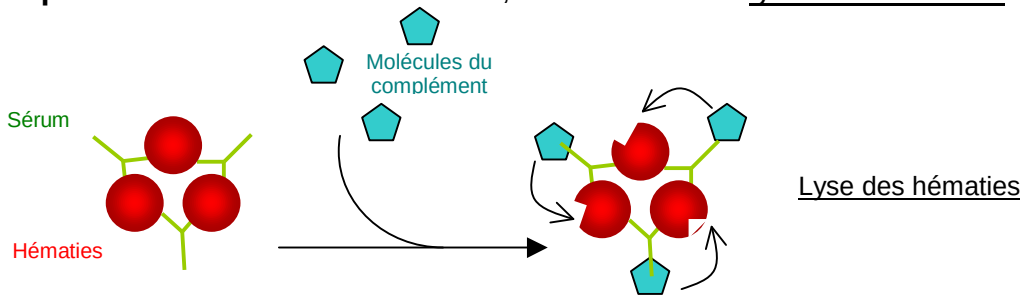
Test de grossesse

Après la fécondation, le corps de la femme se met à fabriquer l'hormone hCG. Ainsi en détectant cette hormone, on détecte une grossesse.



B. Hémolyse immune

Lorsque des hématies, des anticorps anti-hématies et des **molécules du complément** sont mises en commun, on observe une lyse des hématies.

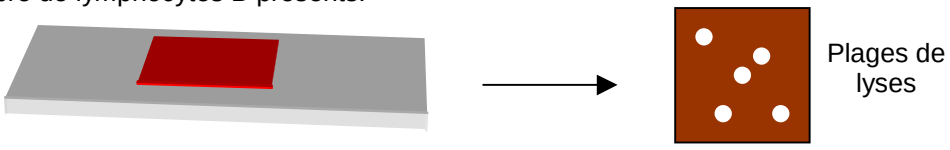


En effet, les molécules du complément se lient à l'extrémité Fc des anticorps, activant alors leurs propriétés lytiques. L'affinité des molécules du complément est différente en fonction des anticorps : excellente affinité avec les IgM, bonne affinité avec les IgG_1 et $_3$, et affinité moyenne avec les IgG_2.

► Applications :

On peut déterminer le nombre précis de lymphocytes B sécrétant des anticorps anti-globules rouges à un moment donné.

Ex : on extrait la rate d'une souris et on la broie. On met le broyât en contact avec des globules rouges immunogènes, puis on compte les plages de lyse au microscope, qui correspondent au nombre de lymphocytes B présents.



C. Techniques de marquage

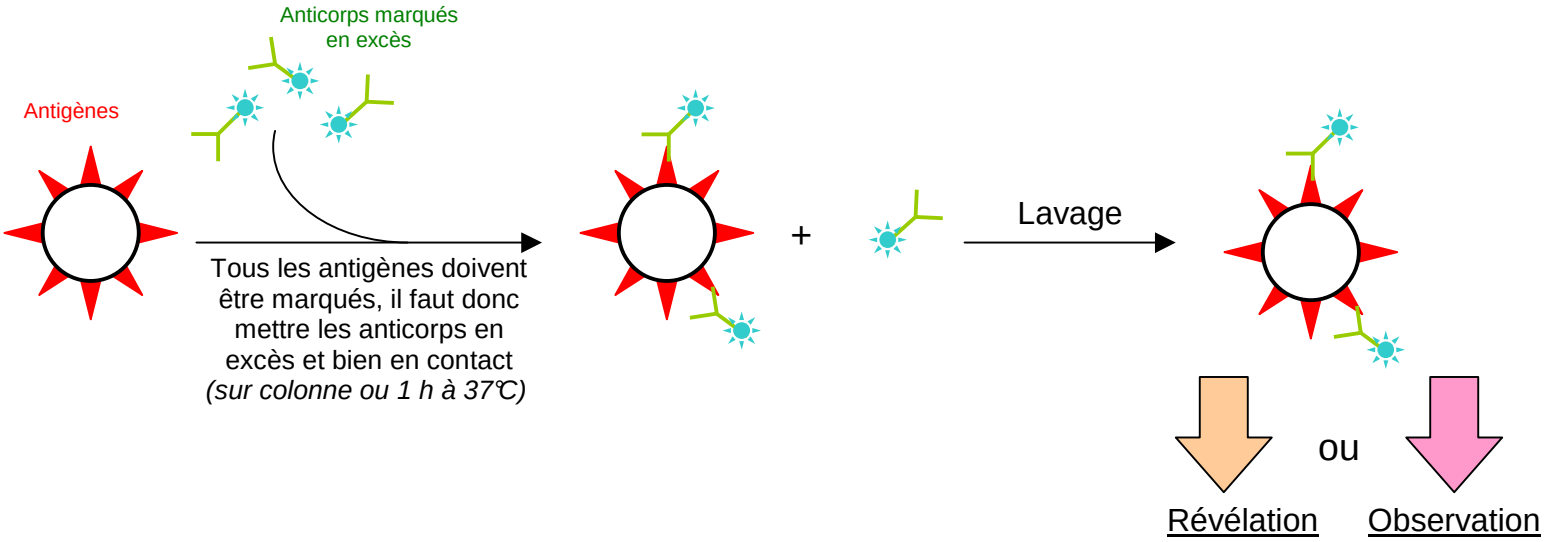
1) Immunohistochimie

Les antigènes ou les anticorps peuvent être repérés grâce à un **marqueur**. Celui-ci peut être de trois types : une enzyme, un fluorophore ou un isotope radioactif.

Pour un marquage correct, il faut que le marqueur soit lié de manière covalente avec l'antigène ou l'anticorps. Il ne doit pas non plus modifier les propriétés immunologiques de l'antigène ou l'anticorps.

2) Techniques directes et indirectes

Dosage direct :

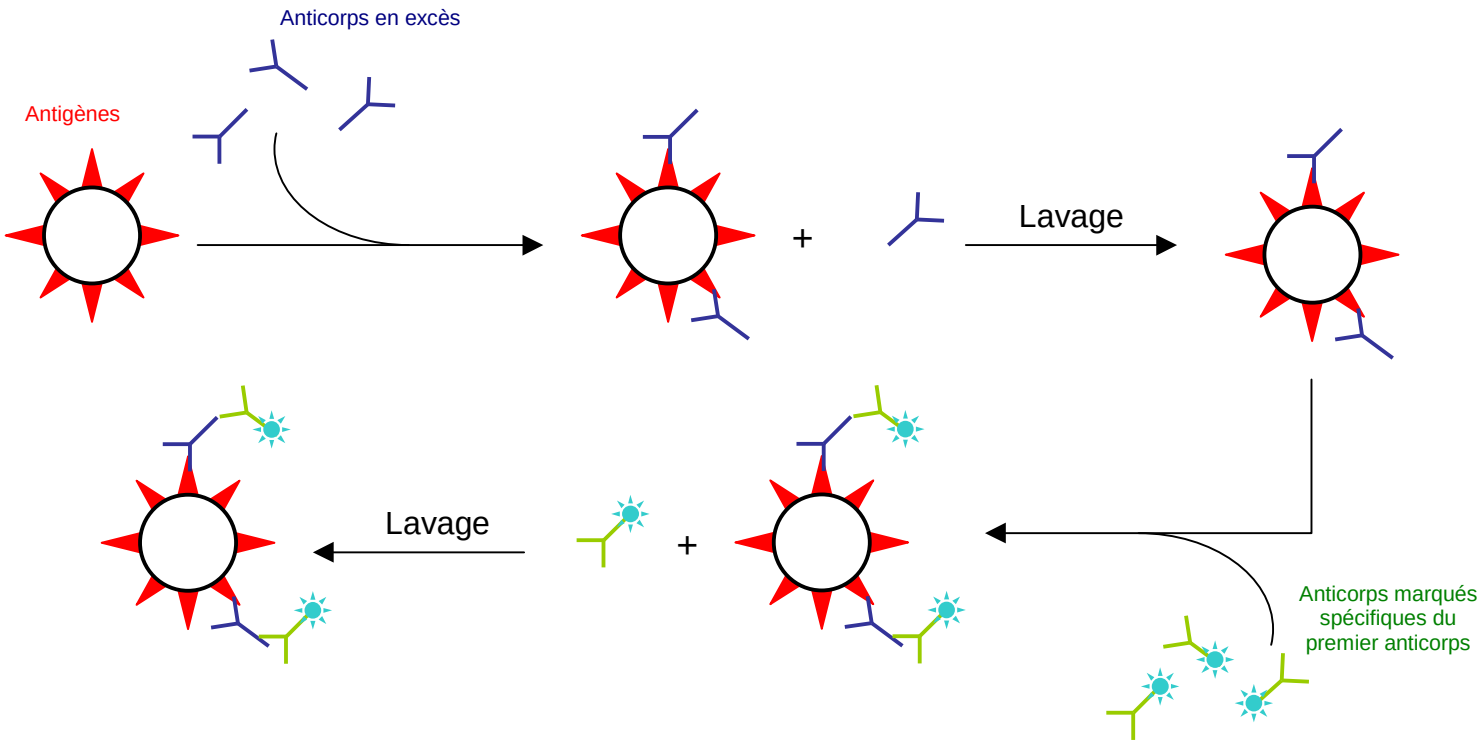


La révélation dépendra du marqueur :

- Enzyme : on utilise un substrat dont le produit est coloré, puis on mesure la concentration avec un **spectrophotomètre**
- Fluorophore : on excite puis on mesure la lumière émise par le marqueur dans un **fluorimètre**
- Radio-isotope : on utilise un **compteur à scintillation**

Plutôt que doser, on peut aussi bien observer l'emplacement de l'antigène ou l'anticorps. On utilise aujourd'hui des microscopes à fluorescence qui permettent de localiser très précisément le marqueur.

Dosage indirect



La méthode indirecte présente certains avantages face à la méthode directe. Les bruits de fond sont grandement diminués à cause de la double spécificité et du nombre de lavages accru. De plus, on perd moins de quantité du premier anticorps car le marquage d'un anticorps génère beaucoup de perte.

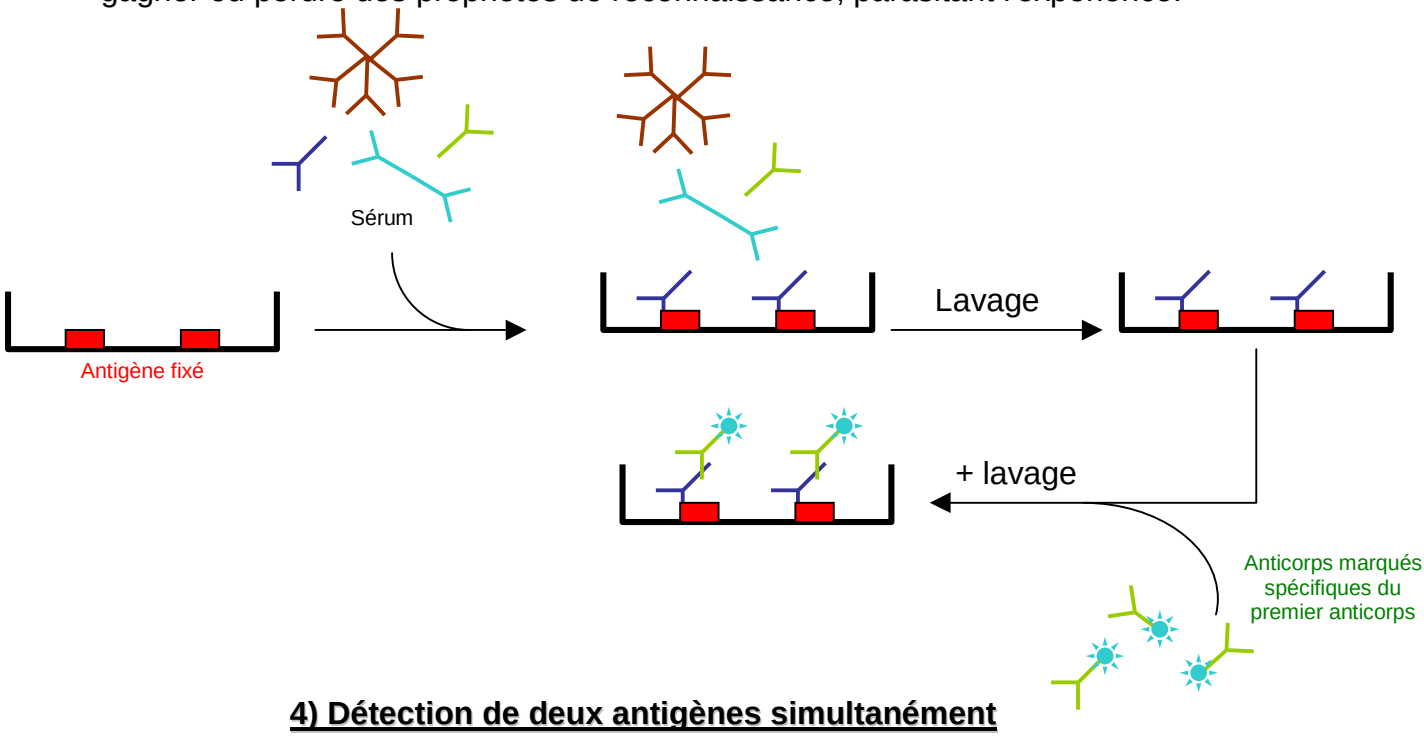
3) Détection en phases homogène et hétérogène

En phase homogène, les complexes antigène-anticorps et les anticorps libres ne sont pas séparés. On peut alors utiliser le **quenching de fluorescence**, qui est la modification de la fluorescence si l'environnement du fluorophore est modifié. Cette méthode est peu fréquemment utilisée.

Dans la majorité des cas, on utilise plutôt la phase hétérogène. Les anticorps ou les anticorps sont fixés sur un support (en verre ou en plastique), en les laissant *3 heures à 37℃* .

Remarques : _ Les anticorps se fixent naturellement sur la partie Fc, ils peuvent donc fixer facilement l'antigène.

_ Des déformation peuvent survenir sur les anticorps et ils peuvent gagner ou perdre des propriétés de reconnaissance, parasitant l'expérience.



4) Détection de deux antigènes simultanément

Méthode directe :

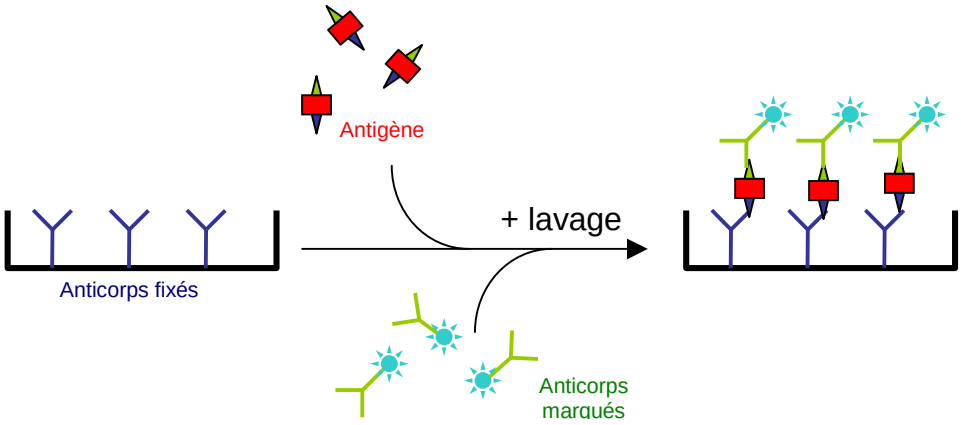
Les anticorps sont marqués par des marqueurs différenciables. On peut utiliser des marqueurs de types différents (enzymatique et fluorophore) ou de propriétés différentes (deux fluorophores de couleurs différentes).

Méthode indirecte :

Les parties Fc des anticorps doivent être reconnus spécifiquement par un seul des anticorps marqués utilisés.

5) Technique "sandwich"

On utilise un antigène qui possède des épitopes pour chaque anticorps que l'on veut relier. On trouve cette technique dans les **kits d'immunodétection**.



D. Les différents tests

1) Test Elisa

Il permet de rechercher des antigènes particuliers, ou des anticorps spécifiques d'un antigène particulier. Il contient des antigènes ou des anticorps préfixés sur un support, des anticorps spécifiques de l'antigène ou l'anticorps recherché marqués avec une enzyme, et enfin un substrat pour révéler les fixations.

On applique un milieu (tel que le sérum) susceptible de contenir l'antigène ou l'anticorps recherché, on le laisse se fixer puis on lave. On applique ensuite les anticorps marqués, on lave et enfin on applique le révélateur.

Ces tests doivent obligatoirement être comparés à des témoins positifs et négatifs, c'est pourquoi les kits contiennent aussi des milieux positifs et négatifs à tester en même temps.

Enfin, ces tests doivent être confirmés car on ne fait pas un diagnostic à la légère. On peut utiliser un autre test différent (on effectue souvent un **Western Blot**), ou bien on fait un autre test Elisa, mais spécifique d'un autre antigène.

2) Western Blot

Ce test permet de détecter des protéines. Cependant il est assez long à mettre en œuvre. On compare toujours les résultats avec des témoins positifs et négatifs.

On extrait les protéines d'un liquide biologique, que l'on sépare par électrophorèse. On les transfère sur une membrane de nitrocellulose, où on leur applique des anticorps spécifiques de certaines protéines. On applique enfin des anticorps marqués et on révèle le tout.

E. Interprétation

1) Utilisation de témoins

Il faut être sûr qu'il n'y a pas eu de problème technique qui influence le résultat des tests. C'est pourquoi on utilise toujours obligatoirement des témoins positifs.

Il faut aussi s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination, ou que les résultats ne sont pas des artefacts. C'est pourquoi on utilise toujours obligatoirement des témoins négatifs.

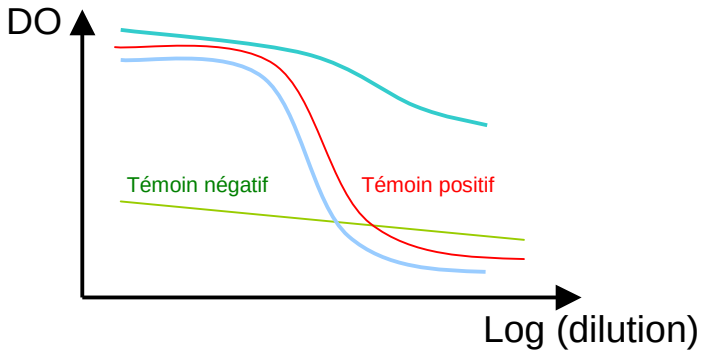
2) Sélection des anticorps ou des antigènes pour les tests

Afin de pouvoir être utilisé dans un test, un antigène doit respecter certains critères. Il doit être :

- **Universel**, c'est-à-dire que l'antigène est tellement immunogène qu'une personne malade présentera forcément des anticorps spécifiques de cet antigène.
- **Hyperspécifique**, c'est-à-dire que l'antigène ne doit appartenir qu'à un agent pathogène précis.
- L'antigène doit subir le moins de déformations possibles au cours du test, car cela pourrait fausser les résultats.

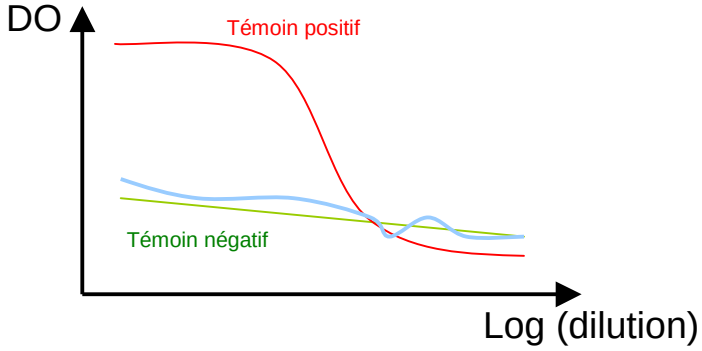
3) Analyse de résultats d'un test Elisa

Cas typiques :



La courbe d'absorption est presque identique ou supérieure au témoin positif, on dit que le sérum est alors *positif*. Dans le cas d'infections graves, on effectue quand même un test de confirmation (avec un échantillon et un test différents).

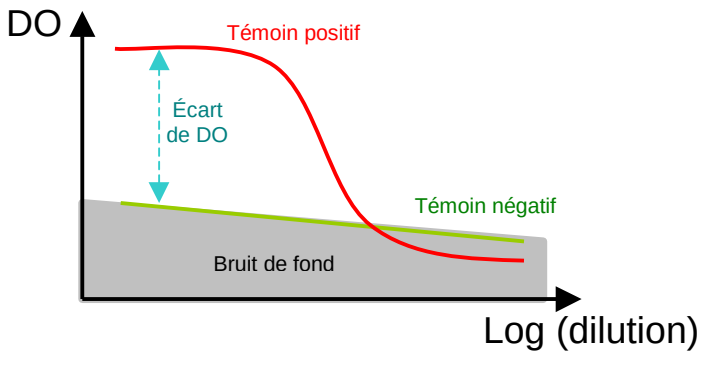
Des sérums peuvent être positifs et présenter des courbes différentes, selon leur affinité à former un complexe antigène-anticorps et leur concentration.



La courbe d'absorption ressemble au témoin négatif, on dit qu'il est *négatif*. Cependant une personne peut présenter un faible taux d'antigènes ou d'anticorps lorsque l'infection est récente ou très ancienne.

Pour les infections présentant des temps d'incubation, telles que le VIH et l'hépatite, on effectue un deuxième test plus tard.

Estimation de l'efficacité du test :



Le **bruit de fond** doit être si possible assez faible, mais ce n'est pas le plus gênant dans un test Elisa. Une manière d'estimer qu'un test est révélateur, est de regarder **l'écart relatif de DO** entre les témoins positif et négatif. Plus cet écart est important, plus le test sera sensible.

III_ Réponse cytotoxique

La réponse cytotoxique est la réponse immunitaire liée aux **lymphocytes $T_{cytotoxiques}$** et aux **cellules NK**.

Cette réponse est difficile et très longue à étudier. C'est pourquoi on ne l'étudie que dans certains cas :

- Pour rechercher un vaccin, lorsque les agents pathogènes sont intracellulaires
- En cancérologie, pour détruire des cellules tumorales grâce aux cellules immunitaires
- Pour optimiser une transplantation, en vérifiant que ces cellules ne s'attaquent pas au tissu du donneur.
  - On met en présence des cellules (souvent des lymphocytes) d'un donneur potentiel avec des cellules de la réponse cytotoxique du receveur. Si la réponse immunitaire est très lente (nulle dans de rares cas), on effectue tout de même la greffe, tandis que le receveur devra être sous **immunosuppresseurs**.