

SEMILOGIE BIOLOGIQUE EN IMMUNOLOGIE

PLAN

I°) IMMUNOPRECIPITATION

I.1. Principes généraux

I.2. Courbe de précipitation

I.3 Les méthodes les plus utilisées

I.3.1. En milieu gélifié

I.3.1.1. Immunodiffusion simple

I.3.2.2. Double immunodiffusion

I.4. Electrosynérèse

I.5. Applications

II°) IMMUNOFLUORESCENCE

II.1. Principes généraux

II.2 Les fluorochromes

II.3. Les systèmes amplificateurs

II.4. Méthodes d'immunofluorescence

II.4.1. Immunofluorescence directe

II.4.2. Immunofluorescence indirecte

II.5. Applications

III°) RADIOIMMUNOLOGIE

III.1. La Radioimmunologie – Aspects fondamentaux

III.2. Les radio-isotopes utilisés

III.3. Les méthodes radioimmunologiques

III.4. Applications

IV°) L'IMMUNOENZYMOLOGIE

IV.1. L'immunoenzymologie – Aspects fondamentaux

IV.2. Les méthodes immunoenzymologiques

IV.2.1. Dosages des antigènes

IV.2.2. Dosages des anticorps

IV.3. Applications

V°) APPLICATIONS CLINIQUES

V.1. Bilan immunologique en immunopathologie

V.2. Bilan immunologique en auto-immunité

V.3. Bilan immunologique en infectiologie et immunopathologie

V.4. Bilan immunologique en endocrinologie

La sémiologie biologique en immunologie est l'étude des signes cliniques à partir d'examen immunologique. Elle regroupe plusieurs méthodes ont été décrites avec des applications cliniques touchant autant au domaine de la biologie, du diagnostic que celui de la thérapeutique, et ce en fonction de l'évolution des découvertes techniques de l'humanité.

Ainsi l'immunofluorescence est connue depuis plus de 3000 ans puisque le premier empereur chinois Qin Shi Huang disposait d'une « tableau magique » où apparaissait un bœuf au gré de l'incidence lumineuse d'une molécule fluorescente proche des futures fluorescéines utilisées en diagnostic de laboratoire.

Nous présenterons les principales méthodes et préciserons quelques applications.

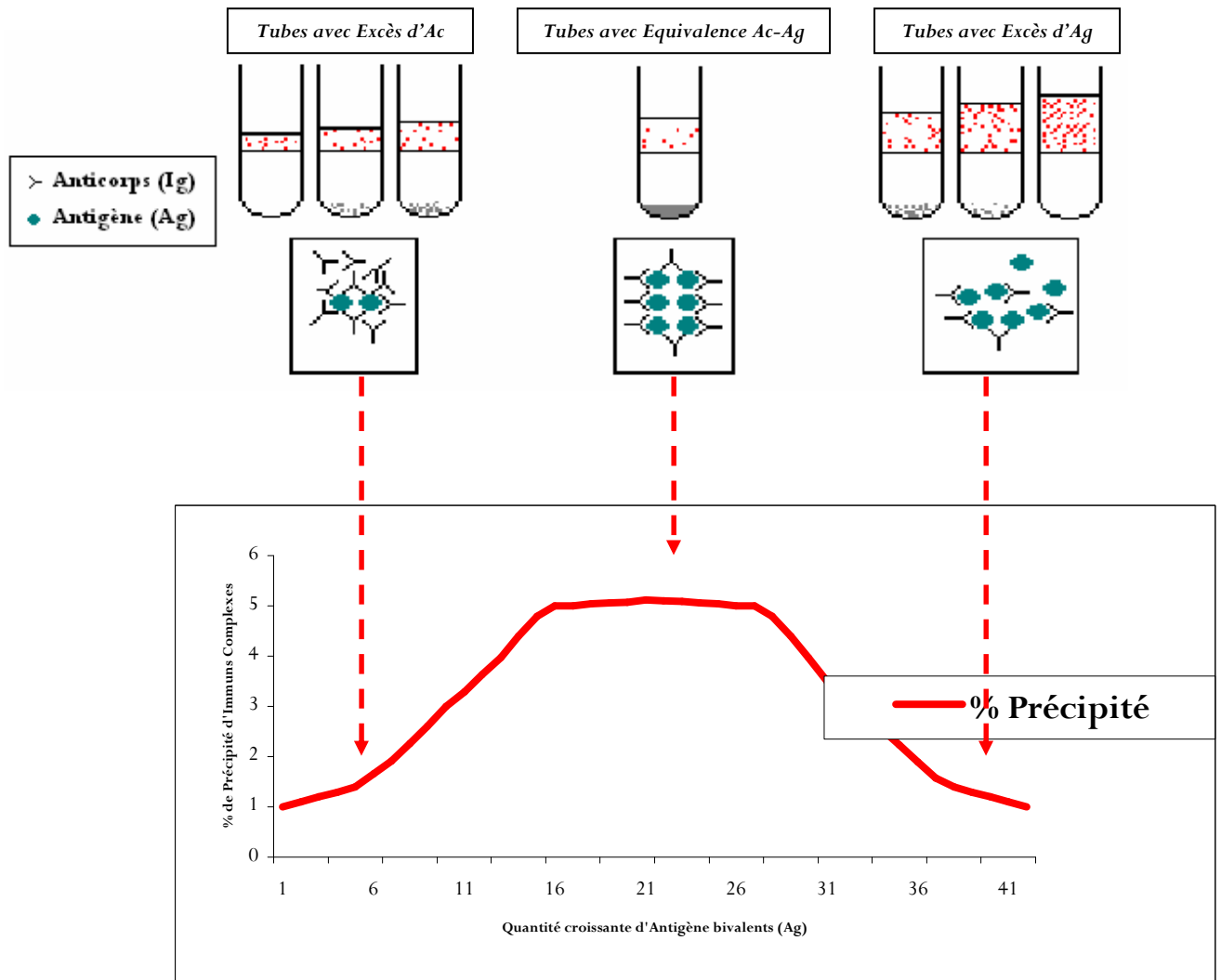
I°) IMMUNOPRECIPITATION

I.1. Principes généraux :

- Découvertes fin XIX^{ème} siècle par Kraus (1897) et mis au point en immunologie (Heidelberger & Kendall – 1929).
- L'immunoprécipitation répond aux lois stœchiométriques quantitatives comme la loi d'action des masses dans laquelle il existe des correspondances entre les proportions respectives d'antigènes et d'anticorps (avec intervention du complément) avec des vitesses d'association et de dissociation à l'origine des réactions.
- Varient en fonction du pH, θ , force ionique et concentration saline.

I.2. Courbe de précipitation :

- **Quantités croissantes d'un Ag protéique + Quantité constante d'Ac (antisérum) =** pas de précipitation dans les premiers et derniers tubes et précipitation dans les tubes centraux.
- 3 zones : Une zone d'excès d'anticorps (premiers tubes = Ac en excès dans le surnageant) / Une zone d'excès d'antigène (derniers tubes = Ag en excès dans le surnageant) / Une zone d'équivalence (tubes centraux = état de traces Ac ou Ag dans le surnageant).
- Formation d'un réseau dynamique de complexes immuns avec saturation progressive et optimale des déterminants antigénique (équivalence) selon la taille moléculaire.
- Formation de la courbe de précipitation de # types selon les types d'immuns complexes (48 heures à une semaine).



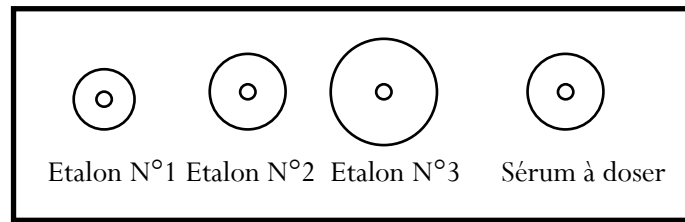
I.3 Les méthodes les plus utilisées :

I.3.1. En milieu gélifié :

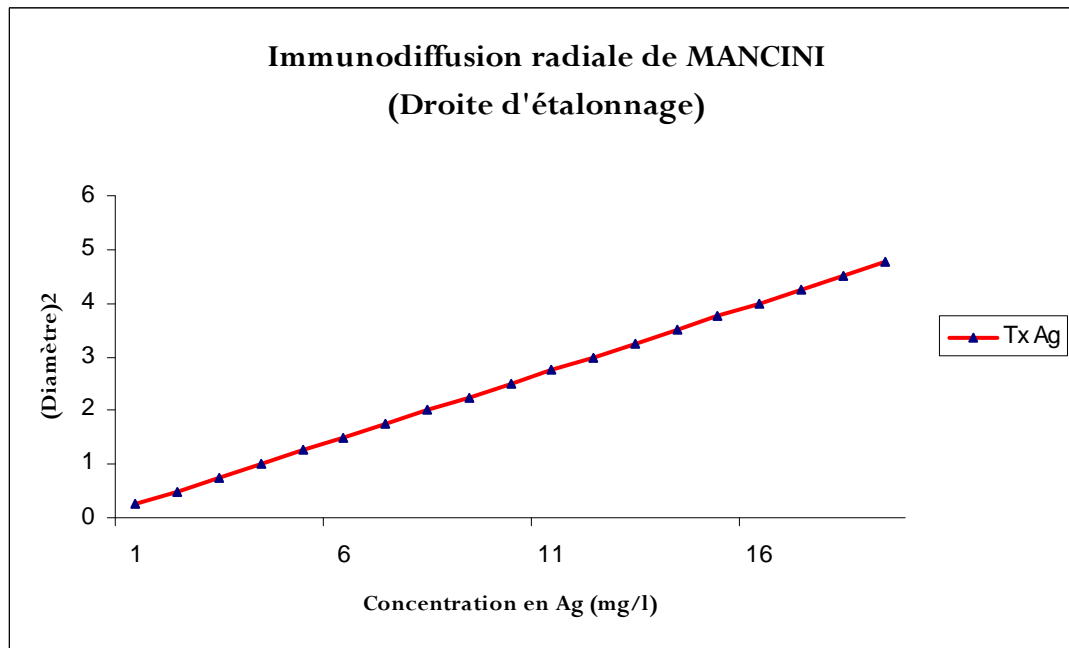
- Les antigènes doivent être divalents (haptènes donc exclus).
- Plusieurs techniques : Immunodiffusion simple

I.3.1.1. Immunodiffusion simple :

- Méthode d'immunodiffusion radiale : **technique de Mancini et de Fahey avec une diffusion bidimensionnelle avec un Ac dans le gel à concentration constante inférieure à l'équivalence et diffusion Ag spécifique de l'Ac à partir d'un réservoir à différentes concentrations.** Comparaison ensuite des lignes d'équivalence avec un système étalon.

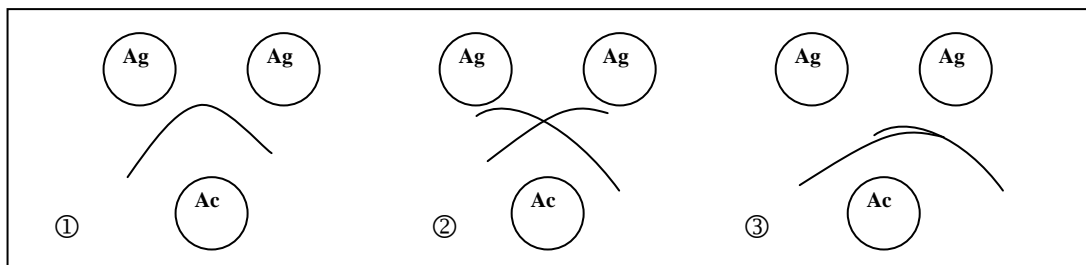


Concentration en Antigène	1	6	11	16
(Diamètre) ²	0,2	1,3	2,7	4



I.3.2.2. Double immunodiffusion :

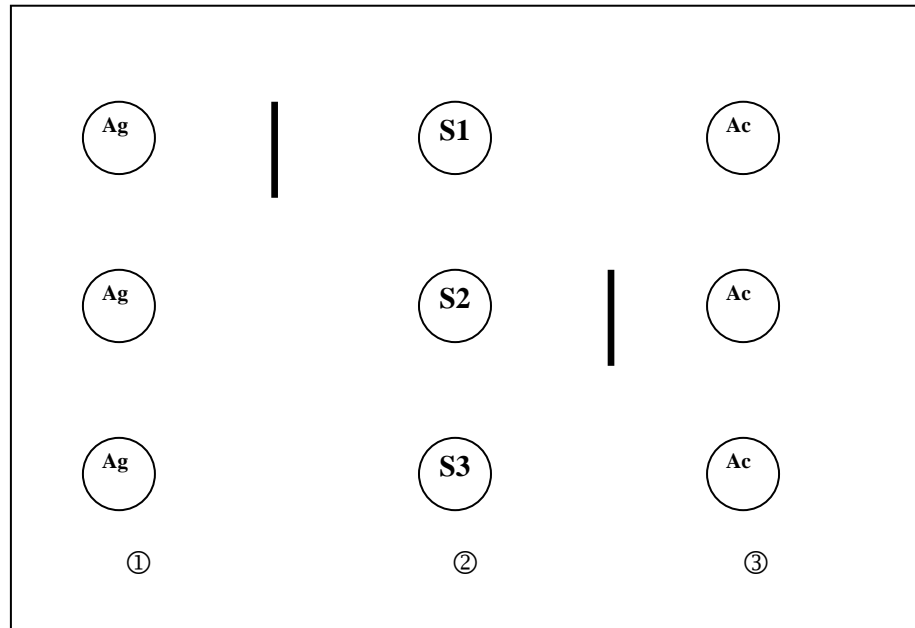
- Diffusion des Ac et Ag à partir de réservoirs séparés selon un gradient de concentration propre à chaque composé et dans la gélose neutre. Migration passive ou orientée par des champ électrique ( lectrosyn r se) ou immunoélectrophorèse).
- **Méthode de double immunodiffusion bidimensionnelle ou Technique d'Ouchterlony** : la diffusion Ag et Ac à partir de deux réservoirs séparés de qqes mm à 2 cm. Formation de lignes de précipitation selon l'importance des liaisons spécifiques Ag-Ac complètes ou partielles.



- ① Lignes formées par Ac-Ag identiques et fusionnantes = réaction d'identité (homologue).
 ② Lignes formées par Ac-Ag indépendamment sans interférer = réaction de non identité (hétérologue)
 ③ Lignes formées par Ac-Ag avec interférence partielle en éperon = réaction d'identité partielle (croisée)

I.4. Electrosynérèse :

- Diffusion des Ac et Ag à partir de réservoirs (de diamètre 2 mm) séparés par 10 mm selon un champ électrique dans la gélose neutre. Migration non due aux coefficients de diffusion, mais à la mobilité électrophorétique Ac et Ag.
- Conditions particulières : les charges Ac et Ag sont de sens inverses ; pH intermédiaire au pHi des molécules Ac et Ag.



- Exemple : Détection Antigène HBs et anticorps anti-HBs :
 - o série ① sérum pathologique avec Ag HBs
 - o série ② sérums humains étudiés (S1 :sérum + Ac anti-HBs/S2 : sérum + Ag HBs/S3 : sérum sans Ac anti-HBs ou Ag HBs
 - o série ③ sérum pathologique avec Ac anti-HBs

I.5. Applications :

- Titration de toxines bactériennes comme la toxine diphtérique (méthode de RAMON).
- Titration d'antigène viraux ou de souches vaccinales virales.
- Titration de protéines dans des maladies dégénératives ou orphelines impliquant des auto-anticorps et auto-antigènes : maladies auto-immunes (Protéines salivaires dans diverses pathologies comme la polyarthrite rhumatoïde).
- Immunoprécipitation de la chromatine en recherche ou en diagnostic.

II°) IMMUNOFLUORESCENCE

II.1. Principes généraux :

- Marquage fluorescent d'un antigène ou d'un anticorps ou un immun complexe avec un composé fluorescent (fluorochrome).
- Phénomène physique caractérisé par l'émission quasi-immédiate de lumière de plus faible énergie que celle absorbée (molécule excitée retourne à son état de repos en passant par un état intermédiaire). Un rendement quantique ainsi obtenu se définit par le rapport photons émis/photons absorbés.

- Intensité de la fluorescence augmente proportionnellement avec la quantité de fluorochrome utilisé.
- pH modifie la fluorescence : réaction immunologique réalisée à pH 7,2 - 7,4 (physiologique).

II.2 Les fluorochromes :

- Composés naturels ou synthétiques fluorescents avec un spectre visible, un rendement quantique élevé et une fluorescence différente des autres composés biologiques.
- Fluorochrome doit pouvoir se lier par une liaison covalente à un réactif immunologique.
- Cette liaison ne doit pas modifier les propriétés immunologiques du conjugué (Ac, Ag ou immun complexe).
- Fluorochromes usuels : fluorescéine et rhodamine.
- Fluorescéine : spectre d'émission dans le visible (# 520 nm) : couleur verte et sous forme d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) soluble dans l'eau.
- Rhodamine : spectre d'émission (# 550 nm) : couleur rouge et sous forme de chlorure de l'acide sulfonique de la lissamine rhodamine B200 (RB200).
- Fluorescéine et rhodamine se couple aux protéines antigéniques en gardant la fluorescence.

II.3. Les systèmes amplificateurs :

- Le système biotine-avidine ou biotine-streptavidine soluble dans l'eau se conjugue avec des Ag et Ac.
- 4 molécules de biotine se lient à l'avidine ou à la streptavidine et lient les fluorochromes.
- Méthode de détection immunocytochimique très sensible (ex : anticorps biotinilés).
- Possibilité de réaliser des doubles marquages avec fluorochromes différents.
- L'avidine est marquée le plus communément par FITC ou RITC (isothiocyanate de rhodamine).

II.4. Méthodes d'immunofluorescence :

Elles doivent respecter les 4 principes de Nairn de la spécificité :

- Absence de coloration par le sérum conjugué du même produit biologique ayant produit l'immunsérum et ne contenant pas l'anticorps.
- Diminution de la fluorescence après absorption de l'Ac conjugué à l'Ag.
- Inhibition de la fluorescence avec exposition concomitante d'un Ac non marqué et de l'Ac conjugué.
- Absence de coloration de l'Ag hétérologue pour la spécificité d'espèces.

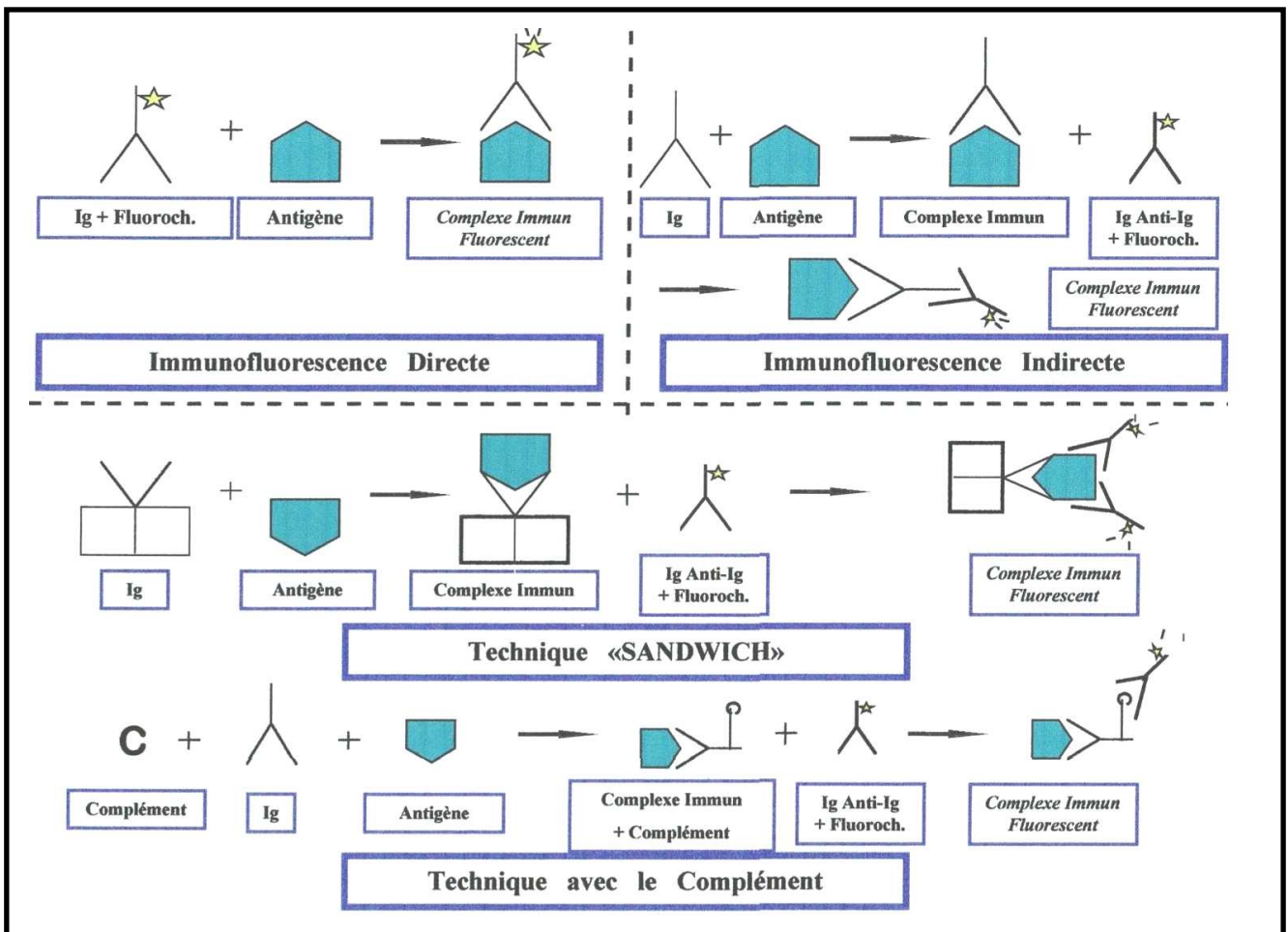
II.4.1. Immunofluorescence directe :

- **Un seul réactif fluorescent avec une méthode en « un temps ».**
- Mise en évidence de l'antigène ou de l'anticorps avec respectivement soit un anticorps ou soit un antigène marqué.

II.4.2. Immunofluorescence indirecte :

- **Méthode dite en « deux temps ».**
- Mise en évidence de l'antigène :
 - o Fixation de l'Ac non marqué spécifique de l'Ag recherché révélée grâce à une antiglobuline fluorescente.
 - o Grande sensibilité par rapport à la méthode directe (4 à 10 fois supérieure).
- Mise en évidence de l'anticorps dans les tissus :
 - o Molécule antigénique doit avoir plusieurs épitopes pour un marquage significatif.

- Mise en évidence de l'anticorps dans le sérum :
 - o Technique utilisée pour la recherche dans les sérums humains des anticorps dirigés contre des microorganismes ou des autoanticorps anti-tissu des maladies auto-immunes.
 - o La recherche d'anticorps fixant le complément est rarement utilisée : exemple : anticorps anti-îlots de Langerhans dans le diabète auto-immun utilise de l'antiglobuline anti-C3 conjuguée.



II.5. Applications :

- On emploie l'immunofluorescence directe pour identifier un germe, une classe ou une sous-classe de lymphocytes ou analyser dans une biopsie les dépôts d'immunoglobulines et de complément.
- On peut rechercher plusieurs antigènes ou anticorps dans des cellules ou des frottis ou des coupes de tissus. Deux réactifs : un Ac contre le premier Ag marqué à la fluorescéine et un autre Ac dirigé contre le deuxième Ag marqué à la rhodamine. Les deux conjugués peuvent être ajoutés ensemble ou successivement.

III°) RADIOIMMUNOLOGIE

III.1. La Radioimmunologie – Aspects fondamentaux :

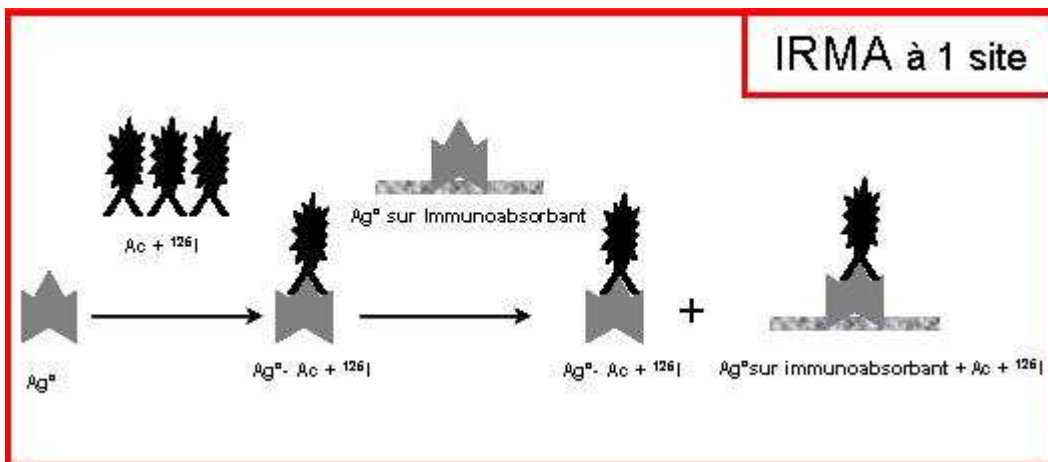
- 1959 : Yalow & Berson dose l'insuline par méthode radioimmunologique.
- Méthode permettant le dosage de substances à de très faibles concentrations grâce à des radio-isotopes. L'instabilité des radio-isotopes permet selon la période ou demi-vie correspondant à la désintégration de la moitié des atomes présents de disposer de composés traçables en matière de diagnostic et de thérapeutique.
- Le principe repose sur une compétition selon la loi d'action de masse entre un antigène froid (Ag°) à identifier ou quantifier et un antigène radiomarqué (Ag^*) en présence d'Ac. Dans un milieu constitués d'antigène marqué (Ag^*) en quantité fixe et très faible, on ajoute un liquide biologique avec un antigène froid (Ag°) à doser en quantité inconnue et de l'Anticorps en quantité constante.

III.2. Les radio-isotopes utilisés :

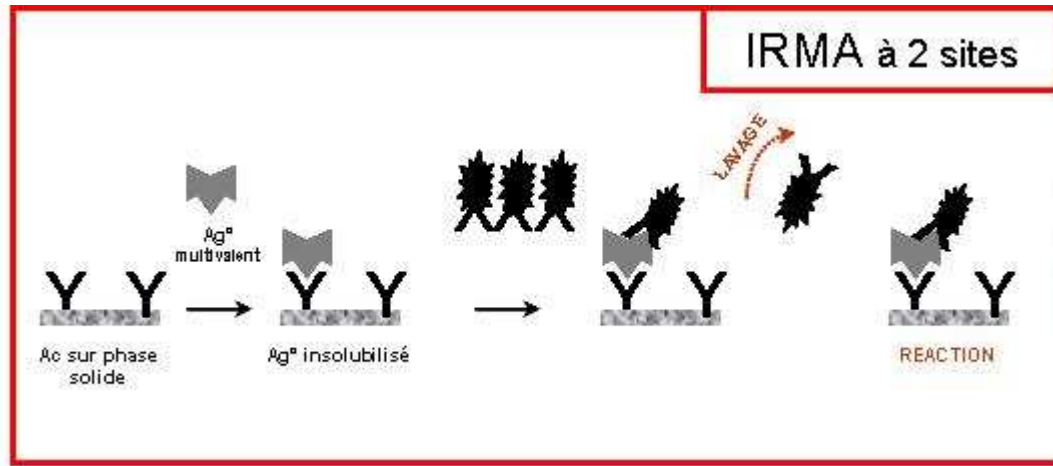
- ^{125}I : demi-vie de 60 jours – le plus employé.
- ^{131}I : demi-vie de 8 jours – période trop courte.
- 3H : stable pendant 12 ans – marqueur de choix des stéroïdes et de certains médicaments.
- ^{14}C : période de 6000 ans – trop longue et réservée à des marquages anthropométriques.

III.3. Les méthodes radioimmunologiques :

- L'immunoradiométrie :
 - o Méthode utilisée lorsque l'on ne peut marquer l'antigène avec un dosage dit IRMA (immunoradiometric assay).



- o On peut appliquer un protocole dit « sandwich » ou « à deux sites » du moment où l'antigène que l'on veut doser est bivalents.



III.4. Applications :

- Titration de molécules en quantité très faible : hormones, traces de protéines, ADN.
- Mesure d'antigènes divers ayant des ressemblances isotypiques, allotypiques ou idiotypiques.

IV°) L'IMMUNOENZYMOLOGIE

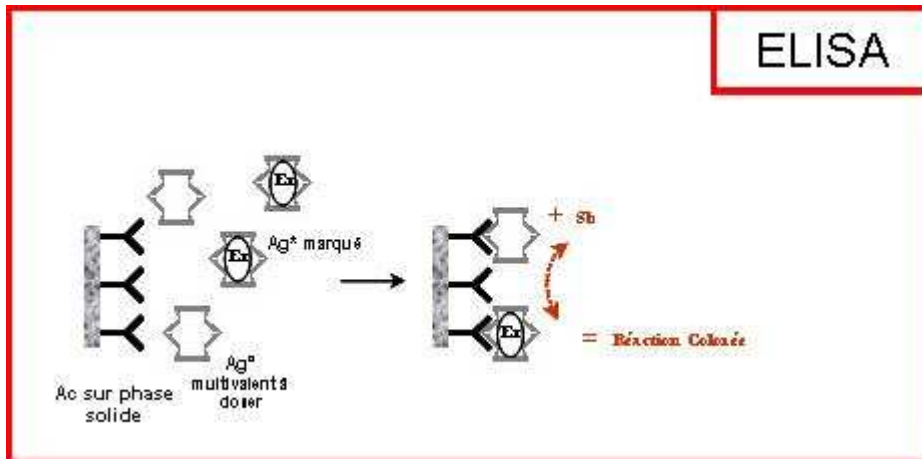
IV.1. L'immunoenzymologie – Aspects fondamentaux :

- 1971 : dosage immunoenzymatique des antigènes proposé.
- Les antigènes et les anticorps sont fixés sur des supports (immunoabsorbants) de manière passive ou par liaison covalente.
- On adjoint un marqueur enzymatique qui répond à plusieurs critères (bonne solubilité, pureté, conservation de l'activité catalytique, et de la spécificité conservée lors du couplage). On appelle conjugué le composé formé par l'antigène-enzyme ou l'anticorps-enzyme. On révèle la réaction par l'action d'un substrat sur le conjugué enzymatique.

IV.2. Les méthodes immunoenzymologiques :

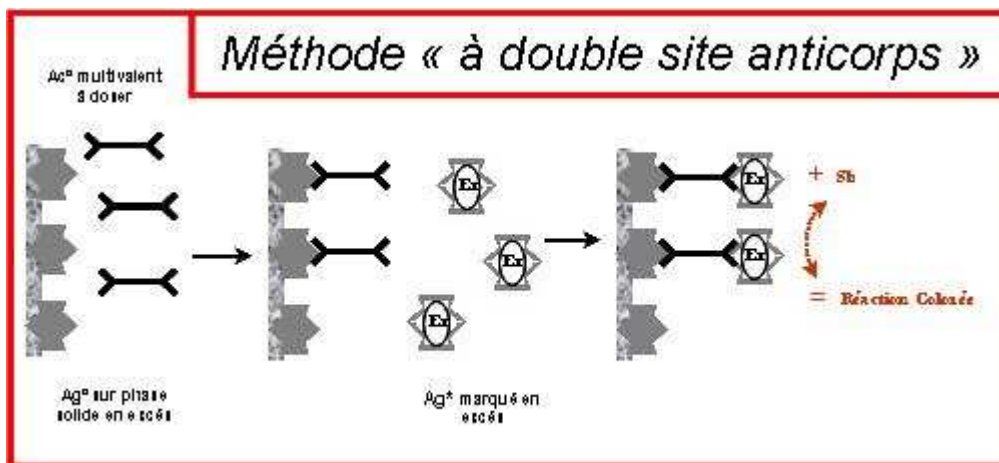
IV.2.1. Dosages des antigènes :

- Dosage par compétition le plus souvent utilisé avec une compétition entre l'antigène à doser (en quantité variable) et l'antigène marqué de même spécificité (en quantité définie).
- La méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de Engvall & Perlmann 1971 permet de réaliser une compétition avec des anticorps dirigés contre l'antigène insolubilisés par adsorption sur un support solide.



IV.2.2. Dosages des anticorps :

- La méthode indirecte avec un antigène marqué ou « méthode à double site anticorps » est très utilisée. Les anticorps à doser se lient aux antigènes spécifiques apportés en excès sur une phase solide. Puis l'antigène de même spécificité, marqué par l'enzyme, est ajouté en excès et se fixe sur les sites anticorps restés libres. L'activité enzymatique mesurée est proportionnelle à la concentration des anticorps à doser. Il faut que les anticorps soient au moins bivalents.



IV.3. Applications :

- Méthodes très utilisées en recherche pour l'identification des anticorps et antigènes couplés à diverses molécules biologiques.
- Méthode de dosage des antigènes viraux (hépatite B) ou d'antigènes hormonaux (test de grossesse).

V°) APPLICATIONS CLINIQUES :

V.1. Bilan immunologique en immunopathologie :

- Les examens de sémiologie immunologique sont utilisés pour le diagnostic de nombreuses pathologies immunitaires :
 - Les maladies auto-immunes (MAI) (Lupus Erythémateux Disséminé - LED, Polyarthrite Rhumatoïde – PR, Vascularites, Hypothyroïdie d'Hashimoto, Diabète insulino-dépendant auto-immun, etc..) avec la recherche de marqueurs que sont les auto-anticorps et les auto-antigènes spécifiques d'organes.
 - Les immunodéficiences acquises ou congénitales (Déficit de l'immunité humorale, déficit de l'immunité cellulaire, déficit d'un facteur du système enzymatique du complément) avec identification de déficits de médiateurs immuns (Ig, récepteur ou cytokines).
 - Les pathologies monoclonales immunitaires (Maladies à chaînes lourdes, Hémopathies malignes, Gammopathies monoclonales comme la Macroglobulinémie de Waldenström etc..) avec identification d'une immunoglobuline monoclonale en excès.
 - Les pathologies infectieuses (virémie et bactériémie diverses : mononucléose infectieuse, oreillons, HIV, HVC, HVB et autres pathologies infectieuses chroniques comme la tuberculose).
 - Les pathologies chroniques (hépatite chronique active, cirrhose biliaire primitive, bilan endocrinologique, bilan néonatal,

V.2. Bilan immunologique en auto-immunité :

- Recherche des anticorps anti-noyaux (ANA) dans le cas de nombreuses MAI (LED surtout) par immunofluorescence indirecte :
 - Prélèvement de sang dans un tube sec d'hémolyse sans héparine que l'on centrifuge avec récupération du surnageant (sérum).
Sur de cultures de cellules Hep2 (cellules carcinologique à rapport nucléocytoplasmique élevé) on diffuse le sérum. Les ANA vont se fixer aux noyaux des cellules Hep2 en culture. Après lavage, on introduit une solution d'anticorps anti-Fc Ig G porteurs de fluorochrome. Après lavage, on opère la lecture au microscope à fluorescence qui permet de détecter les cellules marquées et de déterminer la présence ou non des ANA.
 - En fonction du type de détection ANA et de l'importance du nombre de ANA, on oriente le diagnostic vers une MAI spécifique.

V.3. Bilan immunologique en infectiologie et immunopathologie :

- Recherche d'un processus infectieux ou immunopathologiques malins :
 - Les infections bactériennes ou virales se marquent par une perturbation de la formule protéique et cellulaire sérique, sanguine et sécrétoire au niveau de divers organes. L'hyperthermie s'accompagne d'une leucocytose, principalement neutrophiles ($> 7000/\text{mm}^3$) dans les infections bactériennes et principalement lymphocytaires ($> 4000/\text{mm}^3$) dans les infections virales. L'augmentation des éosinophiles évoque une infection parasitaire et celles des basophiles une réaction à médiation Ig E par la voie topique des allergènes. Une élévation monocytaire se voit dans certaines infections bactériennes (tuberculose – $1000/\text{mm}^3$). La baisse du taux de lymphocytes se voit dans certaines infections virales (HIV)
 - Les cryoglobulines sont des immunoglobulines qui précipitent en dessous de 37°C et restent solubles au-dessus de 37°C . Les immunoglobulines monoclonales pathologiques sont souvent des Ig M à des taux très élevés retrouvés dans les prélèvements. Elles font partie de la catégorie des cryoglobulines de type I.

La présence de cryoglobulines est fréquente dans les maladies bactériennes et parasitaires, mais à des faibles taux et de manière transitoire.

- Dans le diagnostic d'une pathologie maligne sanguine d'origine immunitaire, on prélève 10 ml de sang dans un tube sec d'hémolyse sans héparine dans une ambiance thermique proche de 37°C (Chambre à 37°C). On met les tubes dans l'étuve à 37°C jusqu'à la contraction du caillot de sang. On centrifuge pour obtenir le surnageant sérique et on laisse le tube au repos pour rechercher un précipité contenant les cryoglobulines toujours à une température entre 10°C et 36°C. L'ajout d'antiseptique au début de la mesure permet la non contamination par des antigènes bactériens exogènes. Selon le profil de précipitation, l'importance le long du tube, on définit la quantité et souvent le type de cryoglobulines pathologiques.

V.4. Bilan immunologique en endocrinologie :

- Etablissement d'un diagnostic en endocrinologie :
 - Les tests endocrinologiques pour établir le taux et le type de médiateurs hormonaux impliqués dans telle ou telle pathologie sont établis souvent par radio-immunologie ou immuno-enzymologie.
 - La recherche d'anticorps anti-TPO (anticorps thyroperoxydase contre la thyroperoxydase, enzyme importante dans la synthèse hormonale par la glande thyroïde) et l'évaluation des taux de TSH dans le bilan thyroïdien (hyper ou hypo) est la base d'analyse d'immuno-enzymologie. La TSH stimule la sécrétion d'hormones thyroïdiennes au niveau neurologique central et son dosage avec celui des hormones T3 et T4 permet de distinguer les hypothyroïdies et les hyperthyroïdies. La méthode utilisée est le dosage ultrasensible de la TSH (TSH-US).
 - Le prélèvement sanguin est traité par prélèvement dans un tube sec d'hémolyse sans héparine d'où par centrifugation on prélève le sérum. Les hormones T₃, T₄ et TSH sont stables à température ambiante pendant quelques jours. Ce sérum est conservé à +4°C pendant un maximum de 7 jours. On utilise une méthode ELISA sandwich. L'échantillon à doser est fixé sur un immunoabsorbant auquel on ajoute un anticorps monoclonal anti-TSH dirigé contre la TSH. Après incubation, on ajoute un conjugué composé d'un anticorps monoclonal anti-TSH couplé à une enzyme. La réaction du complexe avec les motifs antigéniques de l'antigène TSH fixé est mesurée par fluorimétrie ou bioluminescence dans un spectrophotomètre.

