

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

---

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

---

Université de RELIZANE

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département : Sciences Biologiques



# Polycopié pédagogique

## Immunologie appliquée

Dr YSSAAD Djamila  
Département des Sciences Biologiques  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Cours destiné aux étudiants de  
Deuxième année Sciences alimentaires

2024 / 2025

## **Pres-requis**

Ce support de cours englobe 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.

Dans ce cours, l'étudiant doit être motivé à acquérir des nouvelles informations sur les différentes méthodes utilisées en analyses immunologiques afin de diagnostiquer les différentes maladies affectant le système immunitaire, pour cette raison, l'étudiant a besoin d'avoir des prérequis et des connaissances sur les notions de base de l'immunologie.

L'étudiant sera capable de différencier les techniques d'immunologie et d'en connaître leur principe.

-Initialiser aux définitions de base des termes et des méthodes utilisées en analyses Immunologiques.

- Acquérir des informations sur la technique d'immuno-précipitation d'agglutination et d'hémagglutination.

-Reconnaître les bases de la technique de fixation du complément et hémolyse.

-La détection et le dosage des antigènes/ La détection et le titrage des anticorps (vis-à-vis d'un Ag ou d'un mélange d'Ag) par les techniques d'immunomarquages (ELISA, Immunofluorescences, RIA).

-Pousser l'étudiant à l'utilisation des connaissances des bases d'immunologie pour comprendre les différents mécanismes impliqués lors de l'application de la technique (vaccination, Sérothérapie, application des Anticorps monoclonaux).

-Ce cours permet également une introduction aux diagnostics des pathologies qui affectent le système immunitaire telles que les allergies, les maladies auto-immune, l'immunodéficience, le rejet de greffe).

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Généralités</b> .....	<b>3</b>
1. Notion d'immunologie.....	3
1.1. Immunité non spécifique.....	3
1.2. Immunité spécifique .....	3
1.3. Les organes lymphoïdes.....	4
1.3.1. Les organes lymphoïdes primaire.....	4
1.3.2. Les organes lymphoïdes secondaire .....	4
1.4. Réaction antigène-anticorps .....	5
1.4.1. Immunogénicité .....	5
1.4.2. Antigénicité .....	6
1.4.3. Immunoglobulines .....	6
1.5. Le complément .....	8
1.5.1. Fonctions du complément .....	9
1.5.2. Voies d'activation du complément .....	10
Exercices d'évaluations 1 .....	11
<b>Chapitre 2 : Techniques immunologiques (sans marquages)</b> .....	<b>13</b>
1. Réaction de précipitation .....	14
1.1. Précipitation en milieu liquide .....	15
1.2. Précipitation en milieu gélifié (Immunodiffusion).....	16
1.2.1. Immunodiffusion simple .....	16
1.2.2. Immunodiffusion double .....	17
1.2.3. Immunodiffusion radiale .....	17
1.2.4. Immunoélectrophorèse.....	18
Exercice d'évaluation 02 .....	18
2. Réaction d'agglutination et d'hémagglutination .....	21
2.1. Réaction d'agglutination .....	21
2.1.1. Réaction d'hémagglutination .....	23
2.1.1.1. Test de Coombs .....	24
3. Réaction de fixation du complément et hémolyse.....	25
Exercices d'évaluations 3 .....	26
<b>Chapitre 3 : Techniques d'immunomarquages</b> .....	<b>28</b>
1. Technique immunoenzymatique (ELISA).....	28

1.1. Types d' ELISA.....	29
1.1.1.ELISA direct.....	29
1.1.2. ELISA sandwich.....	29
1.1.3. ELISA indirect.....	30
1.1.4.ELISA compétitif.....	30
2.Technique d'immunofluorescence .....	31
2.1.Immunofluorescence directe .....	31
2.2.Immunofluorescence indirecte .....	31
3.Dosage radio-immunologique (RIA).....	31
3.1. Principe de la RIA .....	31
<b>Chapitre 4 : Vaccination et sérothérapie/Technique des anticorps monoclonaux .....</b>	<b>33</b>
1. Vaccination .....	33
2.Prprietes d'un vaccin .....	33
2.1. Antigénicité.....	33
2.2. Immunogénicité.....	33
2.3. Efficacité .....	34
2.4. Innocuité.....	34
4. Les principaux vaccins.....	34
4.1. Vaccins vivants de faibles virulences .....	34
4.2. Vaccins inactives .....	34
4.3. Extraits ou produits des microorganismes Anatoxines .....	34
5.Serotherapie.....	35
5.1. Modes d'administration .....	35
6. production d'Ac monoclonaux.....	36
6.1. Étapes de production.....	36
6.2. Applications et utilisations des Ac monoclonaux .....	38
<b>Chapitre 5 : Diagnostic des pathologies affectant le système immunitaire .....</b>	<b>40</b>
1. Dysfonctionnement de système immunitaire .....	40
1.1. Dysfonctionnement par excès .....	40
1.1.1. Allergies .....	40
1.1.2. Maladies auto-immunes .....	41
1.2. Dysfonctionnement par défaut .....	41
1.2.1. Déficits immunitaires .....	41
1.3. Transplantation d'organes.....	42
1.3.1. Rejet de greffe .....	42

Conclusion générale .....	43
Références bibliographiques .....	44

### Liste des figures

<b>Figure 1</b> : L'immunogénicité .....	5
<b>Figure 2</b> . Structure d'immunoglobine.....	7
<b>Figure 3</b> . Action des immunoglobulines.....	7
<b>Figure 4</b> . Interaction épitope-paratope.....	9
<b>Figure 5</b> . Les composants du complément.....	10
<b>Figure 6</b> . La voie d'activation du complément .....	11
<b>Figure 7</b> . Test de l'anneau ( Ring test ).....	15
<b>Figure 8</b> : Techniques de Heidelberg et Kendall.....	16
<b>Figure 9</b> . Immunodiffusion simple .....	16
<b>Figure 10</b> . Immunodiffusion double .....	17
<b>Figure 11</b> : Immunodiffusion radiale.....	17
<b>Figure 12</b> .Immuno-électrophorèse .....	18
<b>Figure 13</b> . Principe de la réaction d'agglutination .....	21
<b>Figure 14</b> . Agglutination direct .....	22
<b>Figure 15</b> . Agglutination indirect (test de grossesse) .....	22
<b>Figure 16</b> .Agglutination indirect (test de grossesse) .....	23
<b>Figure 17</b> . Détermination des groupe sanguins ABO .....	23
<b>Figure 18</b> . Test de Coombs direct/ indirect.....	24
<b>Figure 19</b> . Technique de fixation du complément et hémolyse. ....	25
<b>Figure 20</b> .Principe des techniques d'immunomarquage.....	28
<b>Figure 21</b> . ELISA type SANDWICH .....	30
<b>Figure 22</b> . Les principales étapes du Test ELISA indirect .....	30
<b>Figure 23</b> . Principe de L'immunofluorescence .....	32
<b>Figure 24</b> Principe de la RIA .....	32
<b>Figure 25</b> . Actions d'une Sérothérapies.....	35
<b>Figure 26</b> . Production d'anticorps monoclonaux .....	39
<b>Figure 27</b> . Mécanisme de l'allergie .....	40

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Différentes classes d ' immunoglobuline .....	8
<b>Tableau 2.</b> Différents types de maladies auto-immunes.....	41

## Introduction générale

L'immunité est le mécanisme utilisé par l'organisme pour se protéger contre des agents environnementaux qui sont étrangers à l'organisme. Une molécule étrangère présente sur la surface d'un agent infectieux (par ex., bactérie, virus ou autre pathogène) est appelée un antigène. On distingue deux types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité acquise. L'immunité innée (également appelée immunité non-adaptative) consiste de tous les éléments dont un individu est doté à sa naissance, et qui sont toujours présents et disponibles quasi-immédiatement pour protéger l'individu contre une infection (la barrière protectrice de la peau, les membranes muqueuses des voies respiratoires supérieures, le réflexe de toux, le pH acide de l'estomac et les enzymes telles que le lysozyme...). Des éléments internes jouent également un rôle dans l'immunité innée, y compris, les protéines spécialisées que l'on trouve dans le sang, les substances chimiques comme l'interféron libéré par les cellules immunitaires, et certaines cellules immunitaires qui agissent comme agents de sécurité non spécifiques s'opposant à tout envahisseur étranger.

D'un intérêt supérieur dans notre situation, cependant, est l'immunité acquise (également appelée immunité adaptative). Ce type d'immunité est bien plus spécialisé et complexe. D'ailleurs, l'immunité acquise est une manifestation évolutive relativement nouvelle, exclusivement présente chez les vertébrés.

La principale différence entre l'immunité innée et l'immunité acquise est qu'une réponse immunitaire acquise est hautement spécifique à un antigène particulier ; ainsi, un individu doit avoir un contact initial avec l'antigène étranger, ce qui à son tour déclenche une chaîne d'événements débouchant sur cette forme d'immunité. Non seulement la réponse immunitaire acquise s'améliore à chaque exposition successive à l'antigène particulier mais, en outre, elle garde en mémoire les propriétés antigéniques d'un agent infectieux particulier et peut l'empêcher de causer une maladie ultérieurement.

L'exposition initiale du système immunitaire à un agent étranger ou pathogène est appelée l'immunisation. Cette réponse immunitaire déclenche plusieurs événements, comme l'activation de certaines cellules appelées leucocytes (globules blancs) et la production subséquente d'anticorps .

Toutefois, la vaccination et la sérothérapie sont des moyens d'immunisation présentent un intérêt médical considérable, représentent deux approches différentes dans la lutte contre les infections. La vaccination est une approche préventive fondée sur la faculté de faire acquérir à l'organisme des moyens de défense immunitaire spécifique afin d'éviter la maladie ; c'est une immunité active qui est installée et pour une durée importante. La sérothérapie, au contraire,

constitue une approche curative lors de laquelle on fournit à l'organisme les moyens immunitaires de se défendre alors que l'infection est déjà déclarée. C'est là une immunité acquise de façon passive et, de plus, qui est très limitée dans le temps.

Ces dernières n'ont pas cessé de se développer depuis leur découverte il y a environ une centaine d'année. D'ailleurs la nature diversifiée des vaccins et des sérums, et les différentes voies d'administration le prouvent.

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 de l'immunoélectrophorèse, ELISA ; Immunofluorescence ...etc.

# Chapitre 1 Généralités

## 1. Notion d'immunologie

L'immunologie est une branche de la biologie dédiée à l'étude du système immunitaire, mais aussi une partie de la médecine qui s'occupe des maladies du système immunitaire.

- **Immunité:** L'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui appartient en propre (**le soi**) et de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger (**le non soi**) : les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels il est exposé, mais aussi ses propres constituants altérés (comme des cellules tumorales) .
- L'ensemble **des organes, des tissus, des cellules et des molécules** qui s'opposent à la pénétration et à la prolifération des substances étrangères (**antigène**) notamment des agents pathogènes est appelé: **Système immunitaire (SI)**.

-Le système immunitaire est un système de défense remarquable par sa capacité d'adaptation. Il a deux fonctions : reconnaissance et réponses effectrices.

### 1.1. L'immunité non spécifique (naturelle/innée) :

D'action immédiate, qui fait intervenir des cellules responsables de la phagocytose. Elle utilise les fonctions d'exclusion du revêtement cutané-muqueux et la mise en jeu de signaux d'activation entre des ensembles de molécules plasmatiques (complément, coagulation) et des cellules (polynucléaires neutrophiles, macrophages et cellules NK). Cette immunité conduit notamment à la réaction inflammatoire.

### 1.2. L'immunité spécifique (acquise/adaptative) :

Se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère, prélude à sa destruction ; elle garde le souvenir de la rencontre. Cette immunité implique la reconnaissance de constituants appelés **antigènes (Ag)** par des molécules complémentaires très diversifiées (récepteurs d'antigènes) appelés **anticorps**.

Les récepteurs antigéniques sont aussi présents sur des cellules de l'immunité spécifique ; **les lymphocytes T et B** et sont appelés respectivement **TCR** (T cell receptor) et **BCR** (B cell receptor) ;

- **Le lymphocyte T** : Le lymphocyte T est responsable de l'immunité cellulaire, qui vise à détruire les cellules pathogènes, que ça soit des bactéries ou des cellules cancéreuses. On distingue deux types de lymphocytes T :

- Les **LT CD8** qui évolue en **LT cytotoxique**.
- Les **LT CD4** qui donneront des **LT helper (ou auxiliaires)**; qui va sécréter **des cytokines, interleukines**.
- **Le lymphocyte B** : est responsable de l'immunité humorale, qui vise à produire les **anticorps** spécifiques (plasmocyte) de l'agent pathogène.
- la reconnaissance antigénique dans le cas des TCR et BCR ne peut s'effectuer seulement si l'Ag est présenté par une molécule de **CMH (Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité)**.
- Les molécules du CMH sont des protéines membranaires se trouvant sur les CPA qui présentent des antigènes peptidiques afin qu'ils soient reconnus par les lymphocytes T.
- Cela permet de distinguer les antigènes portés par les cellules du soi et du non-soi
- Les molécules de **classe I (CMH I)**: sont exprimées par toutes les cellules nucléées.
- Les molécules de **classe II (CMH II)** : sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigène.
- **CMH-I**; Présenter les Ag aux lymphocytes TCD-8
- **CMH-II**; Présenter les Ag aux lymphocytes LT-CD4, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B

### **1.3. Les organes lymphoïdes**

#### **1.3.1. Les organes lymphoïdes primaires :**

La moelle osseuse (et le foie chez le fœtus) est le site de développement et de maturation des cellules B. Les érythrocytes (globules rouges), granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), monocytes et plaquettes sont également produits par hématopoïèse dans la moelle osseuse.

Le thymus est un organe situé dans la cage thoracique, recouvrant le cœur et les grands vaisseaux sanguins. Cet organe se compose de deux lobes et il s'agit du site de développement et de maturation des cellules T. Les cellules T progénitrices de la moelle osseuse migrent vers le thymus où, à travers une différenciation supplémentaire, elles deviennent déterminées à répondre à un antigène spécifique et développent des protéines de surface cellulaire appelées récepteurs des cellules T (TCR).

#### **1.3.2. Les organes lymphoïdes secondaires:**

Les lymphocytes matures sont stimulés par les antigènes pour subir une division et une différenciation supplémentaires dans les organes et tissus lymphoïdes secondaires, dont les plus importants sont la rate et les ganglions lymphatiques. Les lymphocytes matures peuvent également interagir avec les antigènes et se différencier pour synthétiser des anticorps

spécifiques dans d'autres régions de l'organisme. Le tissu lymphoïde qui est associé aux surfaces muqueuses (tissu lymphoïde associé aux muqueuses ou MALT), les amygdales et l'appendicite en sont des exemples.

#### 1.4.Réaction Antigène-Anticorps

- **Antigènes** : Une substance qui induit une réponse immunitaire. L'antigène est habituellement reconnues par des Immunorécepteurs; **BCR, immunoglobulines (Anticorps), TCR.**
- **Anticorps: Glycoprotéine** complexe utilisée par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des cellules dérivées des **lymphocytes B: les plasmocytes.**

##### 1.4.1. Immunogénicité:

Pouvoir d'un antigène à induire une réponse immunitaire chez un individu donné et dans des conditions données. L'immunogénicité est la capacité à induire une réponse immunitaire humorale (fluides) et/ou à médiation cellulaire. Certains antigènes sont très immunogènes, d'autres le sont peu.

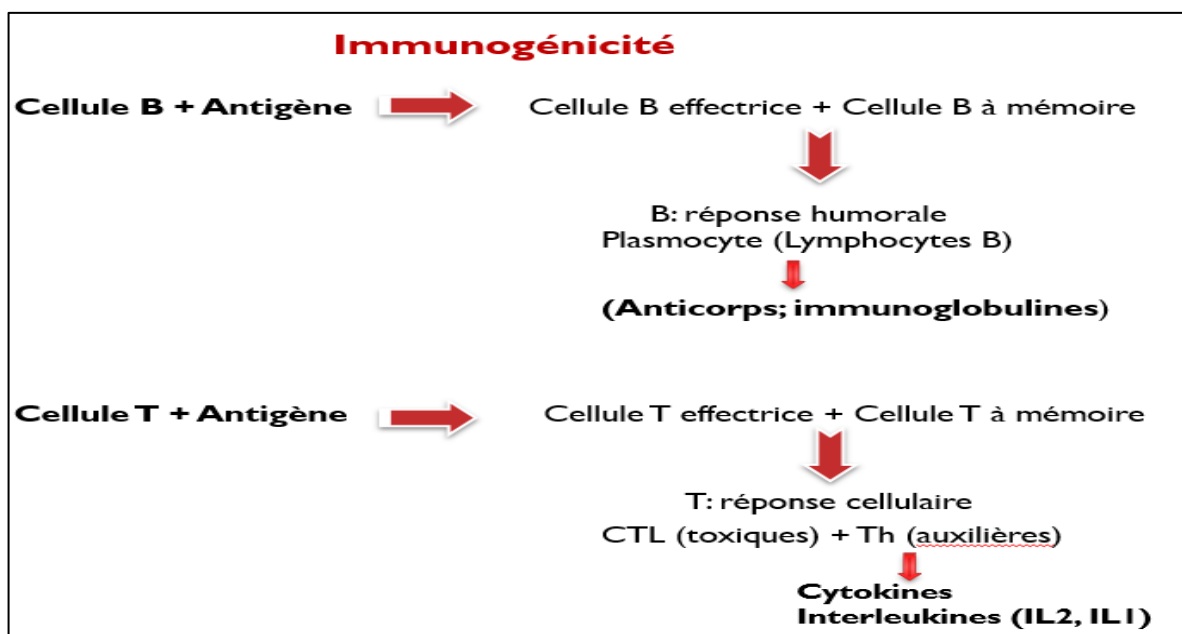


Figure 1 : L'immunogénicité.

### **1.4.2. Antigénicité :**

Est la capacité à se combiner spécifiquement avec les produits finals des réponses : Anticorps et / ou récepteurs de surface cellulaire. Bien que toutes les molécules qui possèdent la propriété d'immunogénicité aient aussi la propriété d'antigénicité, l'inverse n'est pas vrai. Exemple : Les haptènes : substance chimique de faible poids moléculaire possédant une réactivité antigénique mais dépourvue de pouvoir immunogène ; les sels, de métaux lourds (nickel, chrome, mercure), des quinones végétales, des molécules de synthèse, (médicaments, colorants, etc.), ou encore des molécules naturelles (hormones peptidiques ou stéroïdes).

### **1.4.3. Immunoglobulines :**

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont l'une des solutions les plus extraordinaires de la nature face au problème des antigènes ou du matériel « étranger ». L'immunité acquise, qui, comme nous le savons désormais, est relativement récente en termes d'évolution, est caractérisée par la capacité du système immunitaire à produire un anticorps en réponse à un antigène spécifique. Le contact initial par l'antigène qui entraîne cette production d'anticorps est appelé l'immunisation. L'activation subséquente de lymphocytes et la production d'immunoglobulines entraînent finalement la neutralisation de l'agent étranger.

Les immunoglobulines font partie d'une grande famille de molécules connexes, actives sur le plan biologique, mais pas identiques, qui constituent l'ingrédient essentiel à tous les stades de l'immunité acquise.

Chaque molécule d'immunoglobuline est bifonctionnelle. Une région, ou un fragment, de la molécule, appelé le fragment Fab, est concerné par la fixation d'antigène, alors qu'un autre fragment de la molécule Ig, le fragment Fc, favorise les fonctions dites effectrices et peut se lier aux cellules effectrices. Les fonctions effectrices incluent la liaison de l'Ig aux tissus hôtes et à diverses cellules du système immunitaire et à l'activation du système du complément.

Les cellules du système immunitaire telles que les macrophages, neutrophiles, cellules tueuses naturelles (NK), éosinophiles et mastocytes ont des récepteurs de surface pour les immunoglobulines. Ces cellules interagissent avec la région Fc de l'immunoglobuline pour initier les fonctions comme la phagocytose, la destruction des cellules tumorales et la libération de molécules biologiquement actives.

#### **➤ Isotype :**

Chez l'homme, on dénombre cinq classes différentes (ou isotypes) de chaînes lourdes, qui diffèrent considérablement dans leurs propriétés physiques et biologiques. Les deux chaînes

lourdes de n'importe quelle Ig donnée sont identiques. La chaîne lourde détermine la classe de l'immunoglobuline, soit IgG, IgM, IgA, IgD, ou IgE.

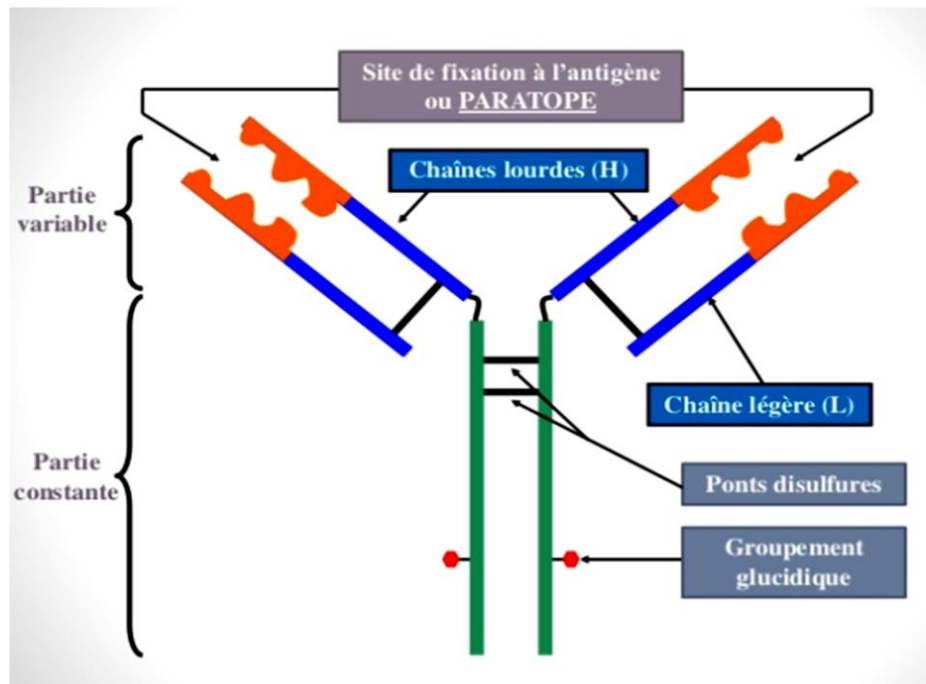


Figure 2. Structure d'immunoglobuline.

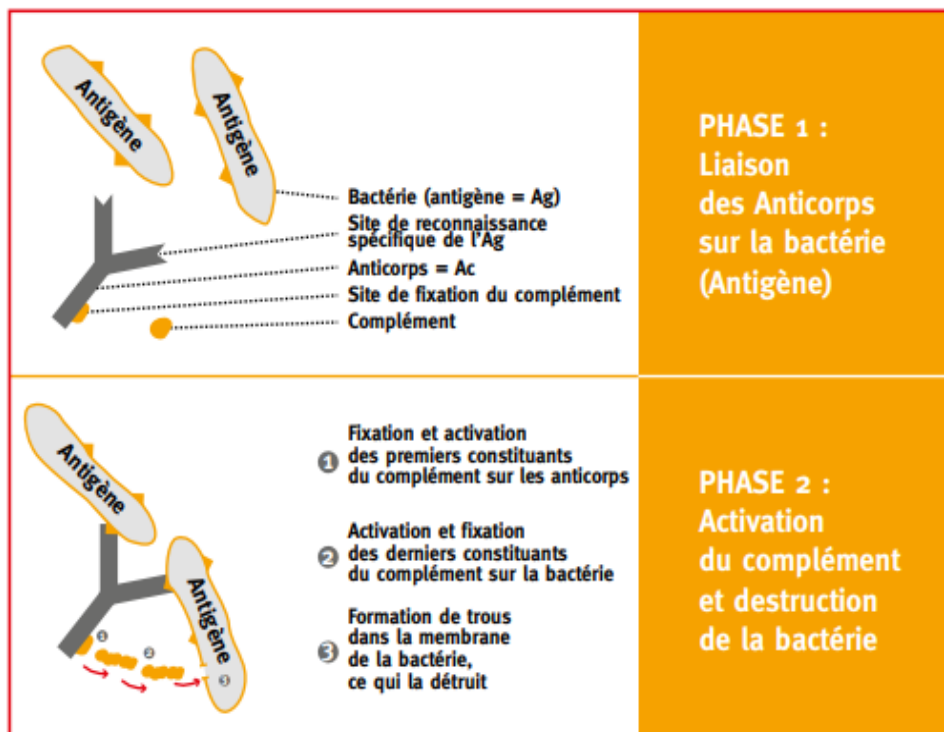


Figure 3. Action des immunoglobulines

**Tableau 1. Différentes classes d'immunoglobuline**

Classe	Chaîne lourde	Structure générale	Localisation	Fonctions
<b>Ig G</b>	- $\gamma$ - 3 domaines constants	monomère	Ig majoritaire dans le sérum	→ Principal Ac des réactions primaires et secondaires - Produit une immunité passive chez le fœtus → Fixe le complément
<b>Ig M</b>	- $\mu$ - 4 domaines constants	monomère ou pentamère	- monomère attaché aux LB - pentamère libre dans le sérum	→ Récepteur antigénique des LB → première classe d'Ig libérée lors d'une réponse primaire - fixe le complément
<b>Ig A</b>	- $\alpha$ - 3 domaines constants	monomère ou dimère	- monomère dans le plasma - dimère dans les sécrétions, salive, larmes, suc intestinal, lait.	→ Protège les surface des muqueuses
<b>Ig E</b>	- $\epsilon$ - 4 domaines constants	monomère	- peau, muqueuses, voies gastro-intestinale et respiratoires, amygdales. - trace dans le sérum	→ Participe à la réaction d'inflammation et aux allergies - Intervient dans la lutte contre les parasites
<b>Ig D</b>	- $\delta$ - 3 domaines constants	monomère	surface des LB	→ récepteur du LB → Intervient dans l'activation des LB

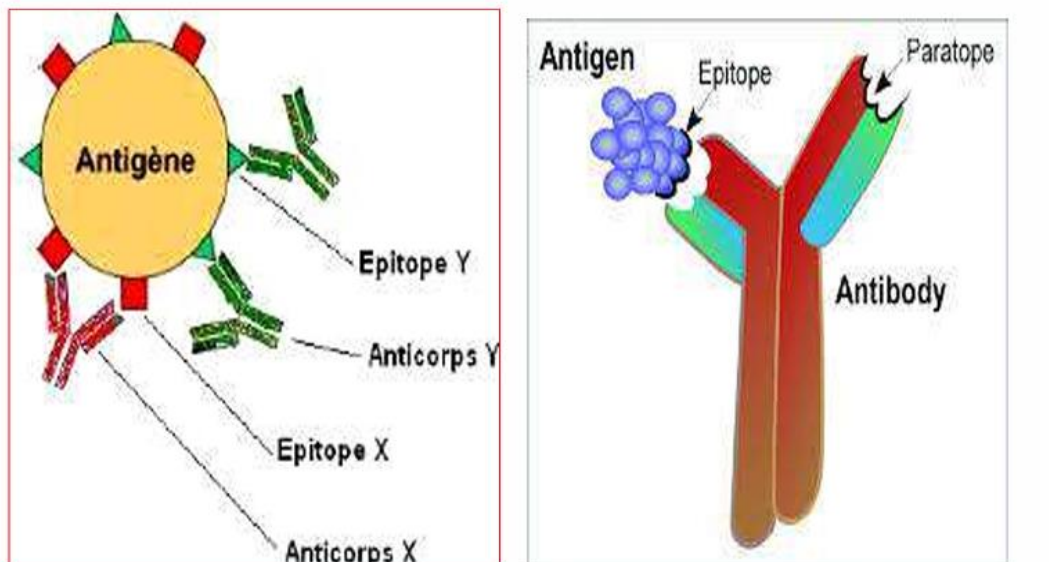
➤ **Épitope** : Un épitope, aussi appelé déterminant antigénique, est une molécule qui peut être reconnue par un paratope (partie variable d'un anticorps ou d'un récepteur membranaire des lymphocytes B ; BCR), pour déterminer si elle appartient au domaine du soi ou du non-soi. Cette reconnaissance épitope/paratope est donc à la base de la réponse immunitaire spécifique : elle permet la sélection clonale; La sélection des acteurs capables de s'attaquer spécifiquement à l'antigène correspondant à un épitope particulier.

Il existe plusieurs types d'épitopes : **les épitopes B et les épitopes T** ; Les épitopes B sont la clé de l'immunité humorale (figure).

### 1.5. Le complément

Le système du complément : Comprend au moins 9 protéines plasmatiques (proenzymes; C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9). et de facteurs de régulation (B, D), qui ont un rôle dans l'inflammation ; Les protéines du complément présentes dans le sang qui agissent ensemble selon une séquence ordonnée spécifique pour favoriser la réaction inflammatoire. Les protéines du complément peuvent également interagir avec d'autres composants du système immunitaire comme les phagocytes et les anticorps pour détruire les pathogènes.

- Synthétisé par les macrophages et les hépatocytes
- Circule habituellement sous forme inactive
- Cascade d'activation séquentielle qui convertit chaque proenzyme dans son état actif et amplifie la réponse.
- Le complément n'est pas spécifique. Il complète d'une certaine manière l'action des anticorps.



**Figure 4.** Interaction épitope-paratope.

### 1.5.1. Fonctions du complément :

Certaines fractions du complément ont d'autres fonctions immunitaires qui sont médiées par les récepteurs du complément (CR) présents sur diverses cellules.

- Le CR1 (CD35) favorise la phagocytose et participe à l'élimination des complexes immuns.
- LeCR2(CD21) régule la production d'Ac par les lymphocytes B et est le récepteur du virus Epstein-Barr.
- Les récepteurs CR3 (CD11 b/CD18), CR4 (CD11c/CD18) et C1q jouent un rôle dans phagocytose.
- Les C3a, C5a et C4a (faiblement) ont une activité anaphylatoxine: ils provoquent la dégranulation des mastocytes qui induit une augmentation de la perméabilité vasculaire et une contraction musculaire lisse.
- Le C3b agit comme une opsonine en recouvrant les microorganismes et ainsi augmentant leur phagocytose.

- Le C3d augmente la production d'Ac par les lymphocytes B.
- Le C5a est un chimioattracteur des neutrophiles; il régule les activités des neutrophiles et des monocytes et peut augmenter l'adhérence des cellules, la dégranulation et la libération d'enzymes intracellulaires des granulocytes, la production de métabolites toxiques de l'oxygène, et le lancement d'autres événements métaboliques cellulaires.

### 1.5.2. Les voies d'activation du complément :

Le système du complément est activé suite à l'interaction en cascade de protéines plasmatiques via une série de réactions enzymatiques. Deux voies principales:

- Voie "Classique": en lien avec les immunoglobulines. Elle est déclenchée par des complexes antigènes anticorps (IgG1, IgG3, les IgM). Le premier composant de la voie classique : C1. Le C1 est un gros complexe, composé de trois sous composants : C1q, C1r et C1s. Quand le C1q lie le complexe antigène-anticorps, il active C1r, qui devient protéolytique, et clive C1s pour désamorcer la cascade de protéolyse.
- Voie "Alternative": en réaction à certains antigènes (bactéries, virus, de parasites) Voie classique du complément (facteurs B, D, C3, C5, C6, C7, C8, C9).
- Voie de la lectine liant le mannose ou voie de la MBL (Mannose-binding lectin) : Elle est activée par liaison de la protéine sérique MBL aux mannoses contenus dans les polysaccharides des parois de certaines bactéries (C4, C2, C3, C5, C, C7, C8, C9).

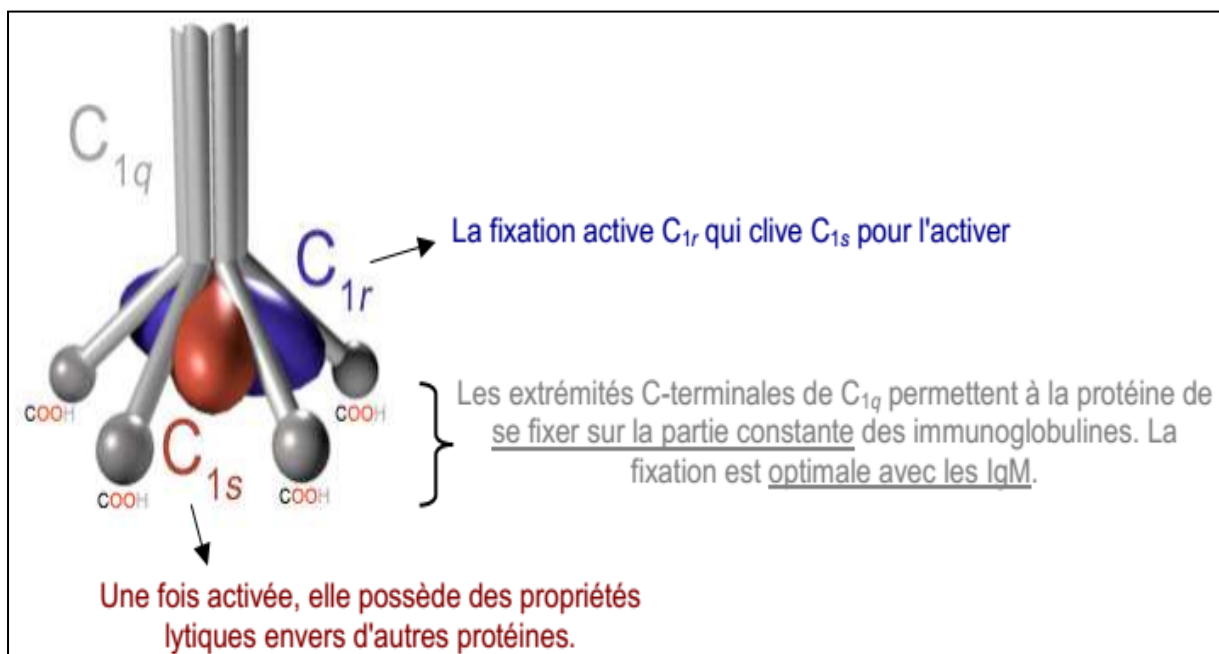
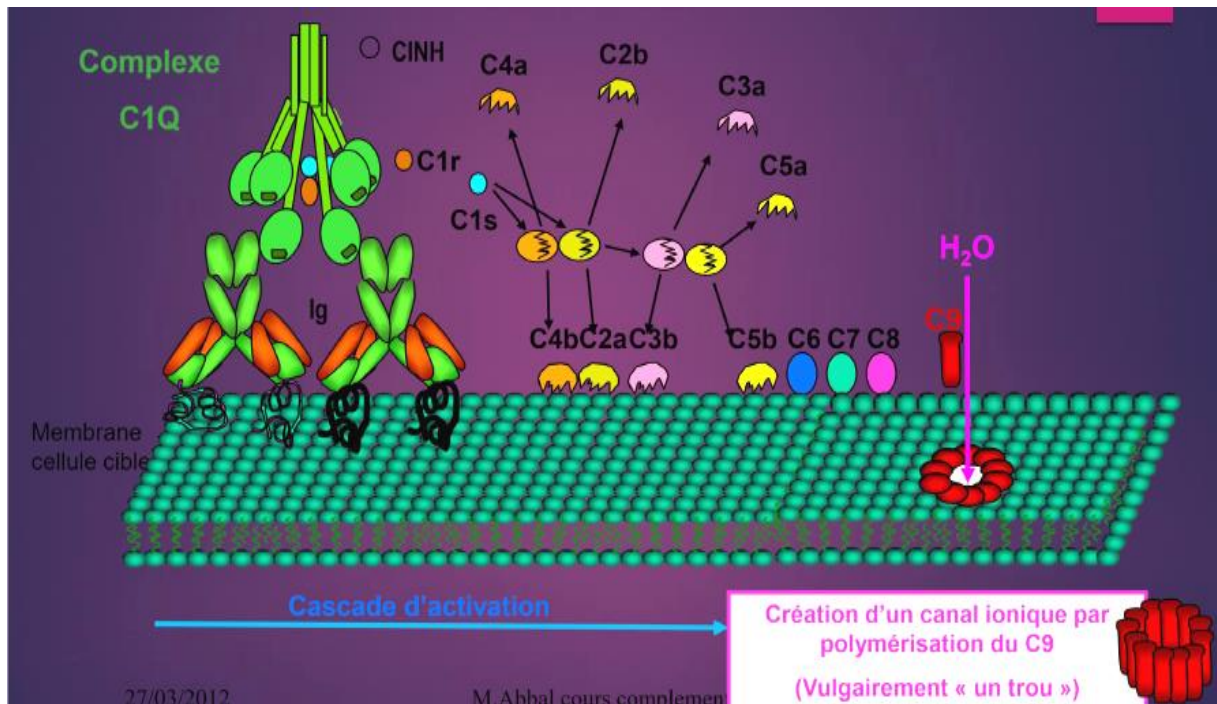


Figure 5. Les composants du complément.



**Figure 6.** La voie d'activation du complément

### Exercice d'évaluation 01

Pour déterminer les conditions de la maturation des lymphocytes B et T on réalise sur 2 lots de souris, les expériences illustrées dans le tableau ci-dessous :

Lots de Souris	Traitement	Résultats
<b>A</b>	Irradiation	Disparition de tous les lymphocytes
	Puis greffe de moelle osseuse	Réapparition de lymphocytes B et T dans le sang
<b>B</b>	Ablation du thymus et irradiation	Disparition de tous les lymphocytes
	Puis greffe de moelle osseuse	Réapparition seulement des lymphocytes B dans le sang

- En s'appuyant sur les résultats expérimentaux des expériences, déduire le rôle de la moelle osseuse et du thymus (**Ablation=action d'enlever un organe**).

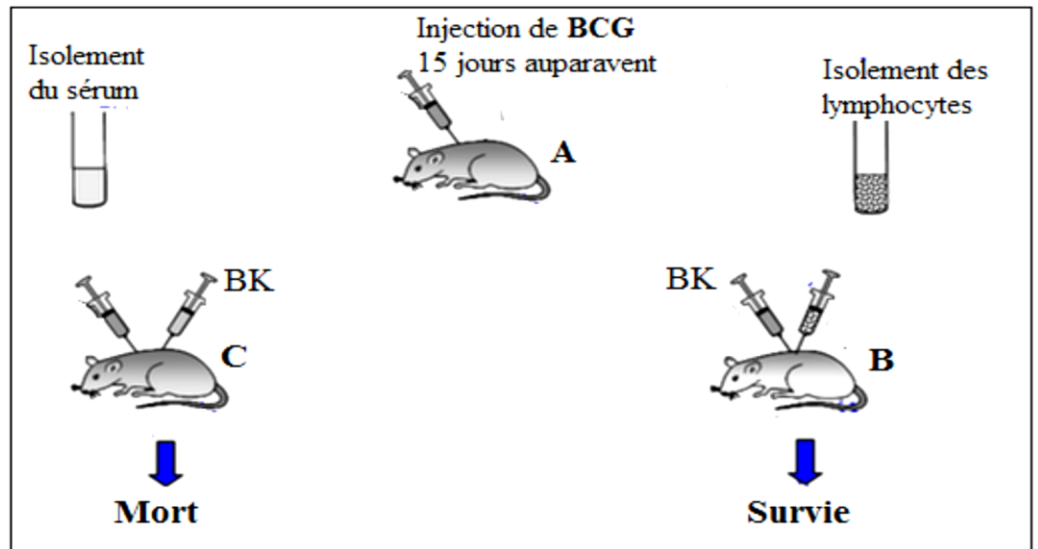
## Exercice 2

Le bacille de **Koch** (BK) est une bactérie responsable de la tuberculose (BCG). Pour connaître l'immunité intervenante pour combattre le bacille de Koch, on propose les expériences représentées dans le document ci-dessous : Les souris A, B et C sont de même souche.

1- Définir un sérum.

2- Que contient l'injection du BCG?

3- Le sérum de la souris A contient-il des anticorps dirigés contre les BK ? Justifiez votre réponse ?



4- Dédurre, par analyse, le type de réponse immunitaire dirigée contre les BK.

5- En s'appuyant sur les données de ces expériences, est-il possible de combattre les BK par un sérum issu d'une souris immunisée contre les BK ?

### Solutions d'exercices

#### Corrigé type 1

**Souris A** : l'irradiation détruit la moelle osseuse et tue toutes les cellules immunitaires se trouvant dans le sang. Chez ces souris, la greffe de moelle osseuse fait réapparaître les lymphocytes B et T dans le sang. On en déduit que ces 2 types de cellules T et B proviennent (naissent) de la moelle osseuse, plus tard ils sont trouvés dans le sang.

**Souris B** : De la même manière que chez les souris A, l'irradiation détruit la moelle osseuse et les lymphocytes sanguins chez les souris B. En absence de thymus, la greffe de moelle osseuse restaure seulement les LB retrouvés alors dans le sang et non les LT. De là, on déduit que :

-la moelle osseuse fournit les LB. Ceux-ci naissent et se différencient et deviennent **matures** dans la moelle osseuse.

-les LT naissent dans la moelle osseuse (progéniteurs de T = pro T) et se différencient pour devenir matures dans le thymus.

#### Conclusion

**Rôle de la moelle osseuse** : Lieu de production et de maturation des lymphocytes B. Lieu de production des lymphocytes progéniteurs de LT (pro T).

**Rôle du thymus** : Lieu de maturation des lymphocytes progéniteurs de T en lymphocytes T.

## **Corrigé type 2**

1-Le sérum est le liquide sanguin débarrassé de ses cellules et des protéines de la coagulation.

1' Le sérum est le liquide provenant du sang coagulé.

2-L'injection du BCG comprend des bacilles atténués qui sont des bacilles vivants dont le pouvoir pathogène est rendu très réduit ou très affaibli.

3-La mort de la souris C confirme que le sérum de la souris A immunisée contre les bacilles de Koch ne contient pas d'anticorps anti- bacilles de Koch

4-La survie de la souris B confirme que les lymphocytes prélevés de la souris A sont responsables de la réponse immune qui a abouti à l'élimination des BK. Donc, le type d'immunité intervenant dans ce cas est **cellulaire T**

5-Il n'est pas possible d'éliminer les BK par l'intermédiaire d'un sérum provenant d'une souris immunisée contre les BK car il ne contient pas d'anticorps anti BK.

## **Chapitre 2 : Les techniques immunologiques**

Les techniques immunologiques reposent sur une réaction antigène-anticorps. Ces techniques sont utilisées pour mettre en évidence, des antigènes ou des anticorps. on doit disposer d'anticorps spécifiques correspondant à la spécificité antigénique recherchée

### ➤ **Rappel : Principe de la réaction Ag-Ac**

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

- **Exothermique** : la réaction est caractérisée par la formation d'une liaison libérant de l'énergie, ce qui a pour conséquence une influence de la température sur le bon déroulement de la réaction.

- **Réversible** : la liaison qui s'effectue entre l'Ac et l'Ag sont des liaisons faibles (hydrogène, hydrophobe ...), elle peut donc être rompue assez facilement ( variation du pH, température, force ionique).

- **Spécifique** : le site d'une immunoglobuline (paratope) peut se combiner avec un épitope et un seul.

La réaction Ag-Ac aboutit à la formation d'un complexe appelé immuncomplexe ; L'immuncomplexe est le produit qui sera mis en évidence dans toutes les techniques immunologiques.

➤ **Production d'immuns sérums (Ac polyclonaux):**

Un immunosérum renferme des anticorps polyclonaux qui comportent :

- des immunoglobulines de classes et de sous-classes différentes
- plusieurs allotypes de chaînes lourdes et légères kappa
- des chaînes légères kappa et lamda
- différents paratopes liant les différents épitopes de la molécule d'antigène d'affinités différentes

Le but de l'immunisation est l'obtention d'un immunosérum riche en anticorps spécifiques de l'antigène et de forte affinité. Les propriétés d'un immunosérum sont de plus variables dans le temps et se modifient avec la répétition des injections.

➤ **La voie d'administration :**

Plusieurs voies d'administration sont possibles : sous-cutanée, intradermique, intramusculaire, intrapéritonéale et intraveineuse. La voie orale est exceptionnellement utilisée pour la préparation d'un immunosérum. Les antigènes cellulaires sont injectés par voie veineuse ou dans certains cas par voie intrapéritonéale.

Pour les antigènes administrés en présence d'adjuvant complet de Freund et pour les antigènes couplés à un porteur, les voies intramusculaires, intradermiques ou sous cutanées sont choisies. Toutefois la voie intrapéritonéale peut être utilisée. Les réactions inflammatoires locales ou générales induites par l'adjuvant de Freund sont fréquentes.

L'administration de l'antigène en plusieurs sites au cours d'une même injection est préférable à l'administration de la totalité de l'antigène en un seul site.

Les tests immunologiques ayant été utilisés historiquement pour détecter la présence d'anticorps dans le sérum de patients, on les appelle communément tests sérologiques. La quantité d'anticorps présente dans le sérum est déterminée par titrage de celui-ci en dilution limite. Le titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution positive.

**1.La technique d'immunoprécipitation**

L'immunoprécipitation est secondaire à la formation de complexes immuns (anticorps antigènes) de grande taille qui se précipitent sous une forme visible à l'œil nu suite à l'augmentation de leur densité (formation d'un réseau). L'immunoprécipitation Technique sans marquage La formation de complexes immuns de grande taille entre un antigène multivalent (possède plusieurs épitopes) et un immun sérum (de préférence polyclonal):

-Un Ag moléculaire multivalent peut être précipité par des Ac multivalents spécifiques : formation d'un complexe immun qui évolue dans le temps pour former un réseau : Le précipité.

-Plus on a de sites de liaisons sur les Ac, plus ils seront précipités. Les techniques d'immunoprécipitation peuvent être:

- Qualitatives : Le résultat est exprimé en « présence + » ou « Absence- » de l'antigène ou l'anticorps recherché.
- Quantitatives : Le résultat est exprimé en quantité (généralement en mg/l).

### 1.1.Immunoprécipitation en milieu liquide

#### a.Test de l'anneau ( ring test )

On introduit dans un tube des Ag et des Ac et on laisse reposer. Ils vont lentement diffuser dans le milieu, créant des gradients de concentration. Lorsqu'ils sont à l'équivalence, c'est-à-dire qu'il y a autant de paratope que d'épitopes, ils forment des complexes et précipitent (un anneau de précipitation).

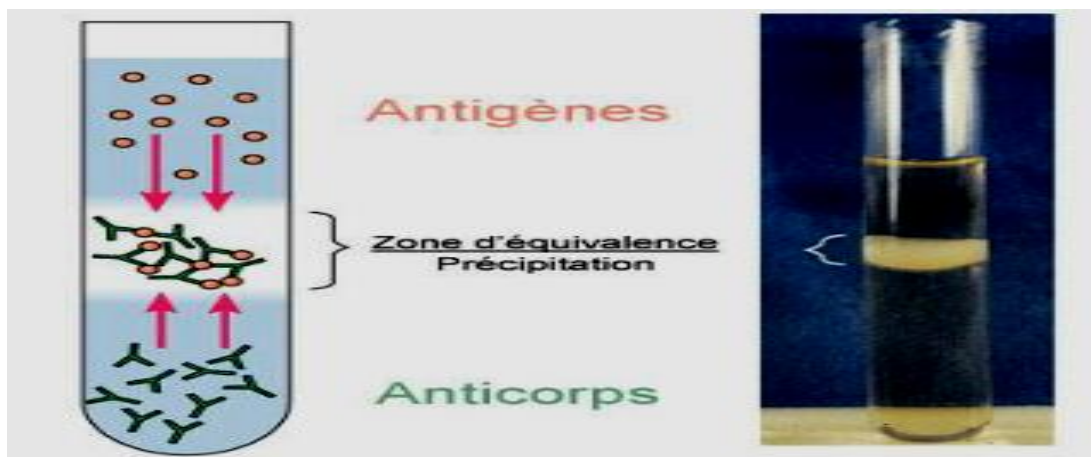


Figure 7. Test de l'anneau ( ring test )

#### b.Techniques de Heidelberg et Kendall

On verse dans plusieurs tubes une quantité constante d'anticorps, et une quantité croissante (d'antigènes. On centrifuge les tubes, et on compare la quantité de précipité en fonction de la concentration.

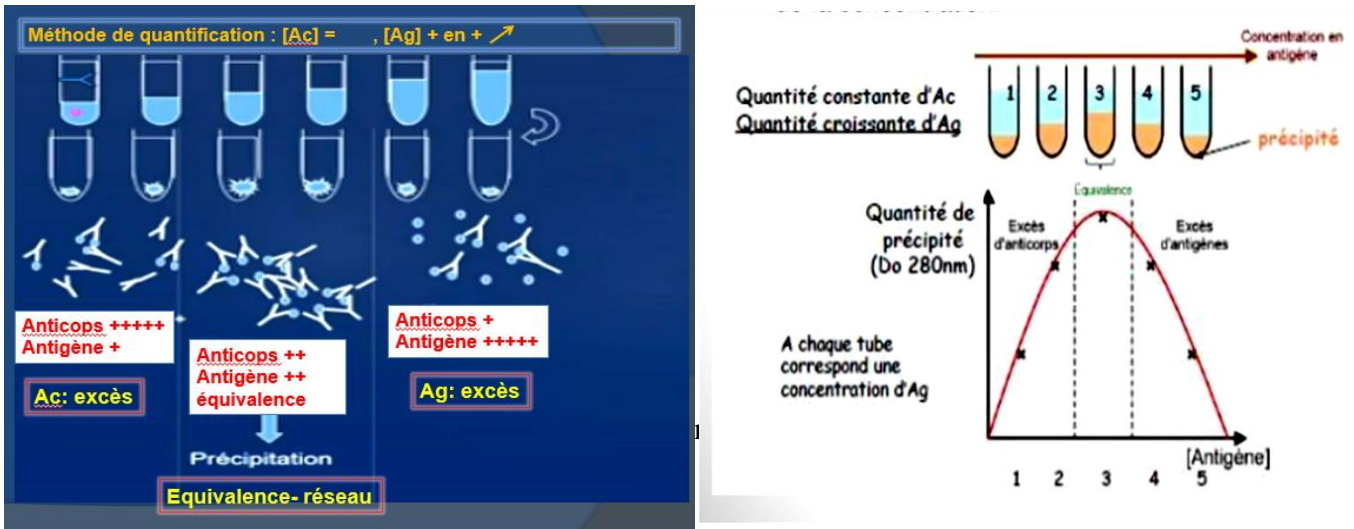


Figure 8 : Techniques de Heidelberg et Kendall

## 1.2- Immunoprécipitation en milieu gélifié

### 1.2.1. Immunodiffusion simple

On met en contact dans un tube deux géloses contenant chacune des antigènes et des anticorps. Les molécules vont diffuser et former un arc de précipitation à l'équivalence.

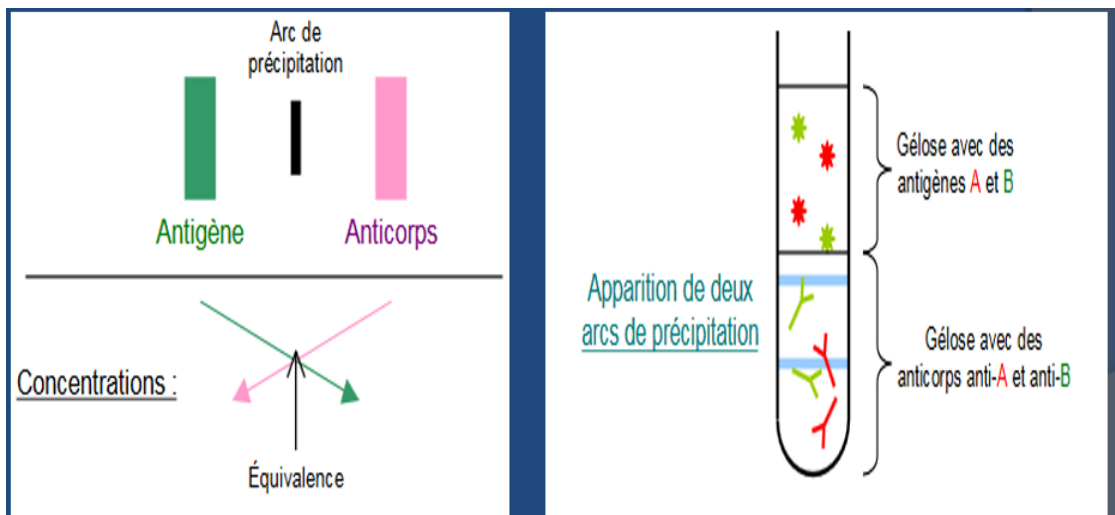


Figure 9 . Immunodiffusion simple

### 1.2.1. Immunodiffusion double

On fait des puits dans la gélose que l'on remplit de différents antigènes et anticorps. On observe alors des arcs de précipitation qui sont différents en fonction des antigènes et des anticorps présents.

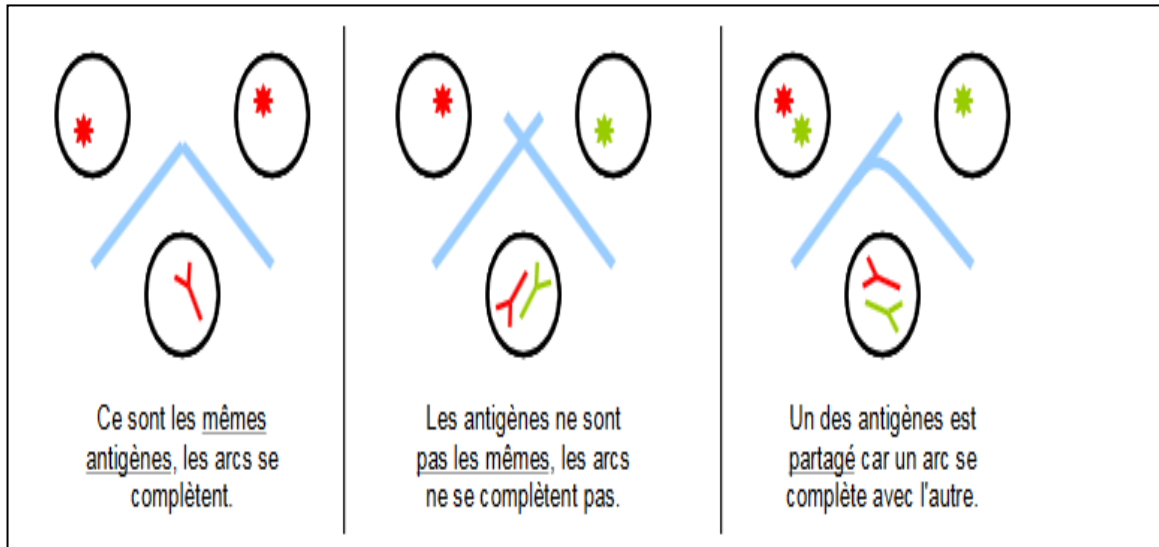


Figure 10. Immunodiffusion double

### 1.2.3. Immunodiffusion radiale

On remplit des puits avec un antigène de concentrations différentes, dans une gélose remplie d'anticorps contre cet antigène. On observe des cercles de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la concentration d'antigène. On peut alors doser l'antigène.

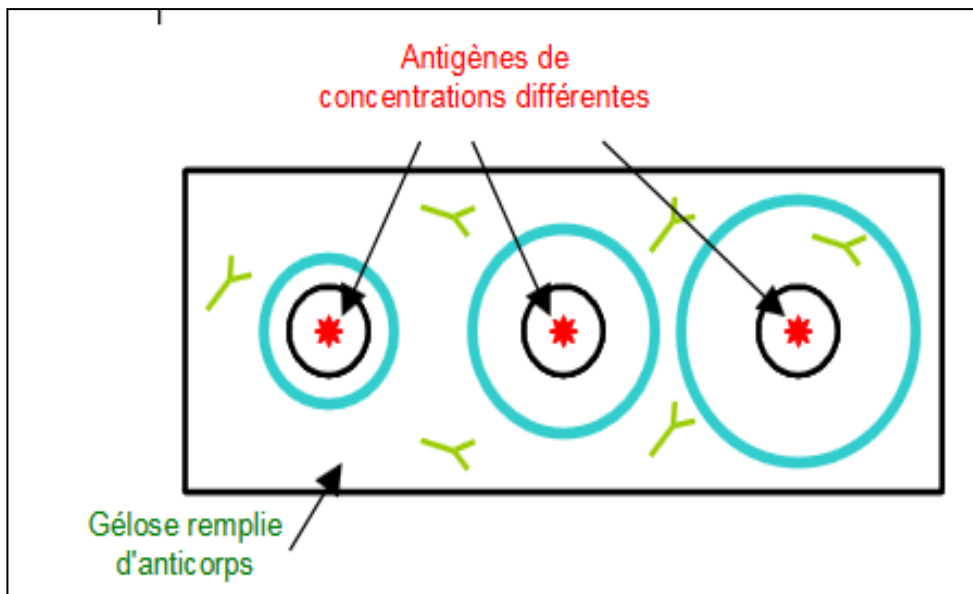


Figure 11 : Immunodiffusion radiale

### 1.2.4. Immuno-électrophorèse

Cette technique permet d'analyser des mélanges complexes d'antigène. On effectue une électrophorèse de ce mélange afin de séparer les antigènes (migration dans un champ électrique) et la précipitation des protéines à l'aide d'immuns sérums.

Premier temps: Electrophorese



Deuxieme temps: Immunodiffusion

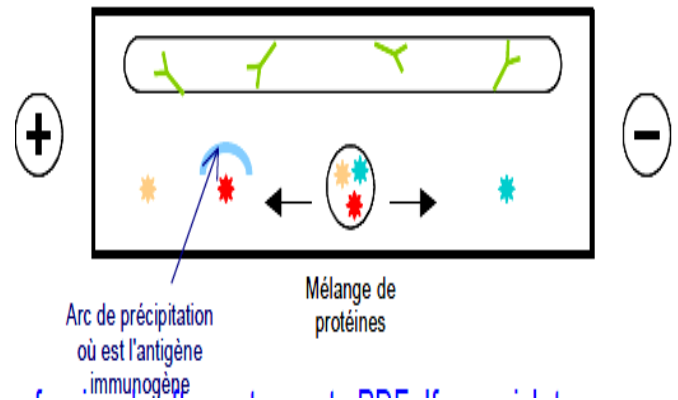


Figure 12. Immuno-électrophorèse

### Exercices d'évaluation 2

**Exercice 1 :** La spécificité d'un anticorps est liée à sa capacité de liaison avec un antigène précis. Le test d'immunodiffusion double ou test d'Ouchterlony, permet la mise en évidence de cette liaison antigène-anticorps.

**On cherche à déterminer si 2 individus humains ont été en contact avec un antigène du virus de la grippe (HA : hémagglutinine) et donc s'ils ont produit des anticorps dirigés contre cet antigène.**

B= sérum d'un individu contenant des anticorps anti-HA ;

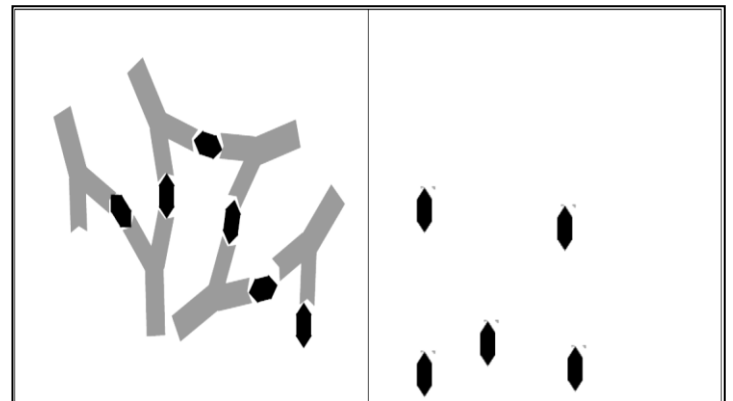
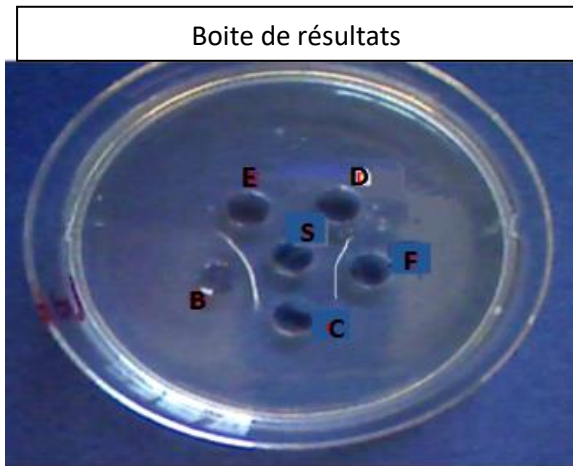
C= sérum d'un individu ne contenant pas d'anticorps anti-HA ;

D= sérum de l'individu 2 à tester

E= eau distillée

F= sérum de l'individu 1 à tester

S= sérum contenant de l'antigène HA



- 1- Justifiez la disposition des solutions dans les différents puits.
- 2- **Déterminez**, à l'aide des résultats fournis, si les individus testés ont été mis en contact avec le virus de la grippe.

**Exercice 2 :** La méningite tuberculeuse (TBM) est encore une cause sérieuse de morbidité et de mortalité dans les pays en développement. Pour établir un diagnostic rapide, le test de MANCINI (immunodiffusion radiale) est utilisé pour détecter l'antigène circulant de mycobactérie dans le LCR (Le liquide céphalorachidien) de patients.

[LCR] mg/L	Diamètres mesurés en cm	Diam au carré en cm <sup>2</sup>
0,6	1.4	1.96
1	1.5	2.25
A	1.6	2.56
2.25	2	4

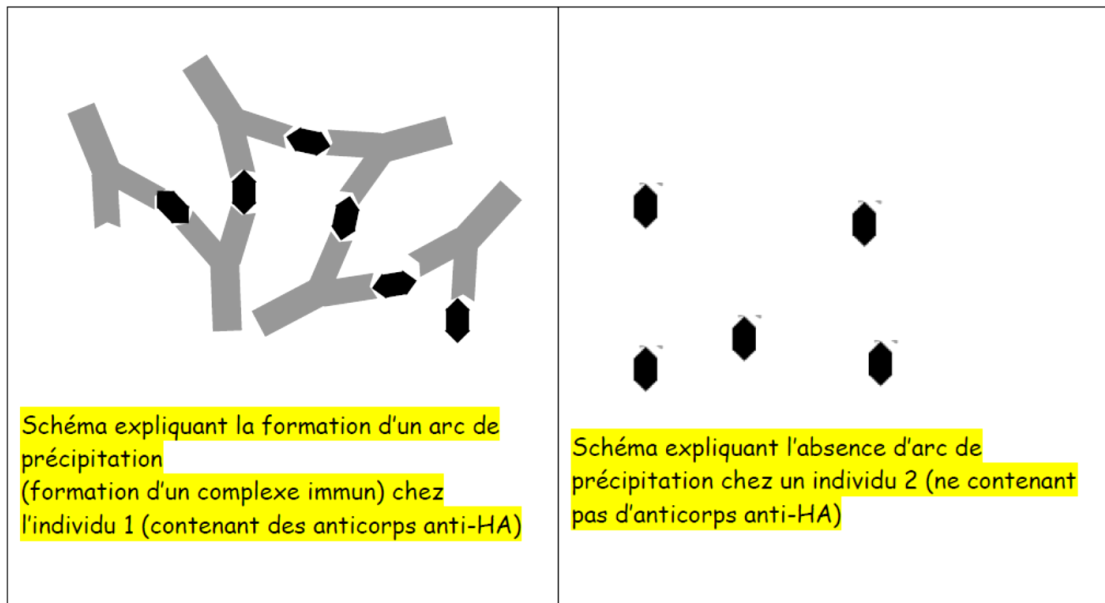


- 1- Tracer la courbe D (cm<sup>2</sup>) en fonction de la concentration en LCR.
- 2- Déduire la concentration en antigène contenu dans l'échantillon à tester.

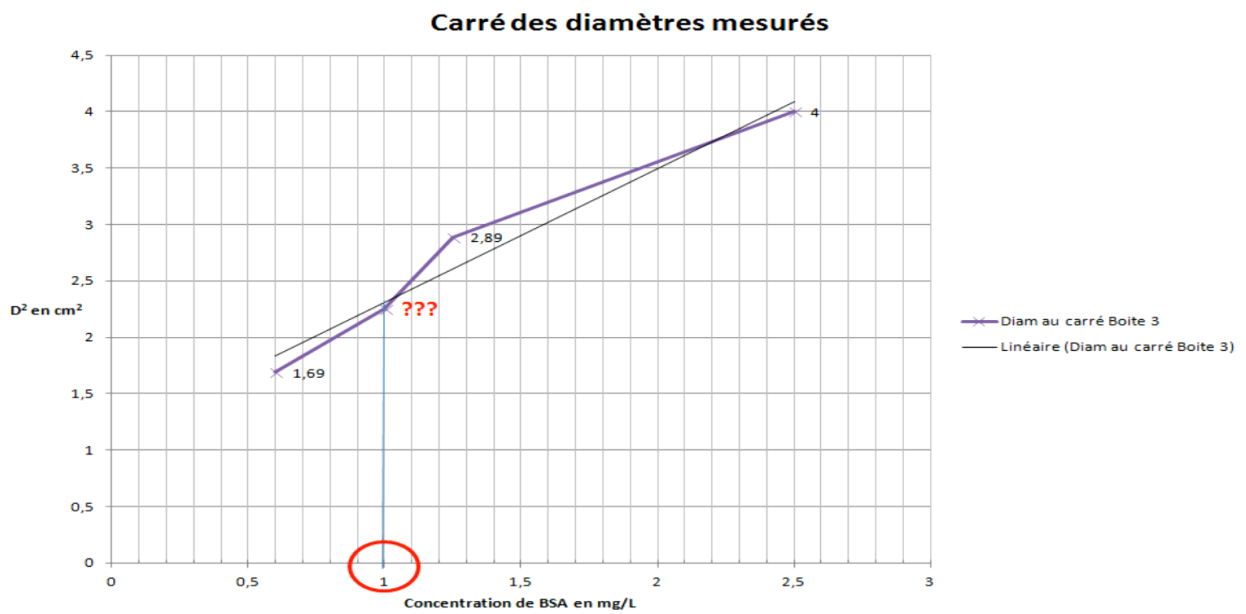
### Solutions d'exercice

**Corrigé type 1:** J'observe un arc de précipitation pour l'individu 1, j'en déduis que l'individu 1 a été mis en contact avec un antigène du virus de la grippe car il a produit des anticorps dirigés contre cet antigène. Je n'observe pas d'arc de précipitation pour l'individu 2, j'en déduis que l'individu 2 n'a pas été mis en contact avec un antigène

**Bilan** : Un anticorps réagit de **façon spécifique** avec un antigène. Antigène et anticorps se reconnaissent et se fixent. L'ensemble forme le **complexe immun** et **l'Ag est neutralisé**. Or il existe de très nombreux antigènes différents donc il est nécessaire qu'autant d'anticorps différents soient produits.



**Corrigé type 2:**



## 2. Réaction d'agglutination et d'hémagglutination

### 2.1. Réaction d'agglutination

La réaction d'agglutination met en présence des Ag sur un élément figuré (cellules, érythrocytes (GR), particules, bactéries) et un antiserum contenant des Ac spécifiques agglutinants.

Le terme d'agglutinine est utilisé pour décrire les anticorps qui agglutinent les antigènes particuliers. Quand l'antigène est un érythrocyte (globule rouge), on utilise le terme d'hémagglutination.

#### ➤ Principe de la réaction

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'oeil nu, c'est **l'agglutination directe (active)**. 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 (passive)**. 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.

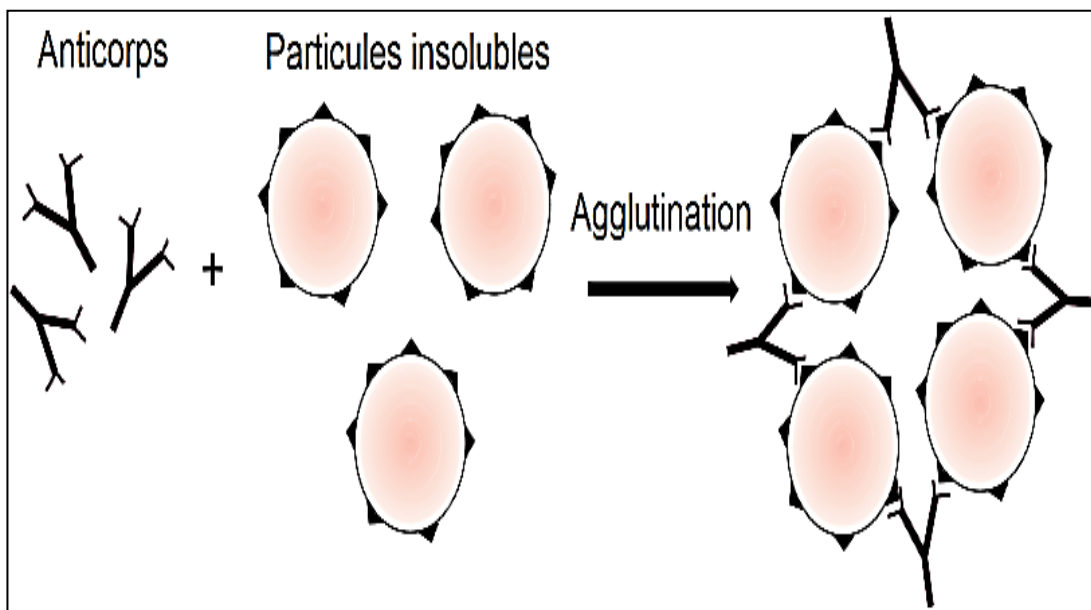
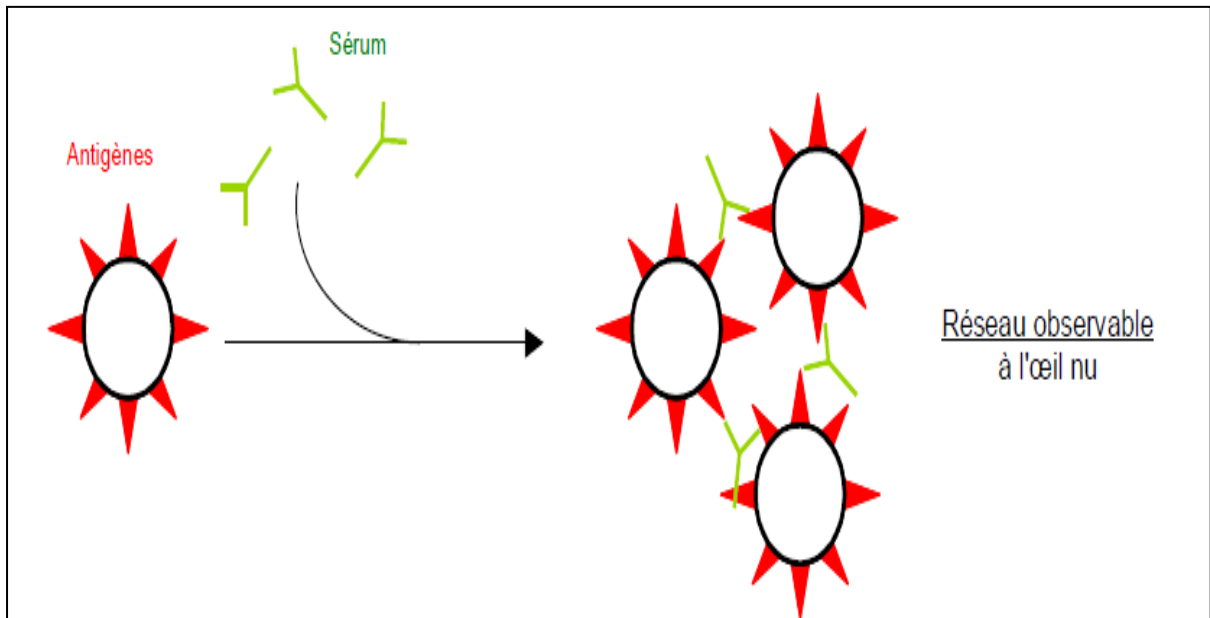


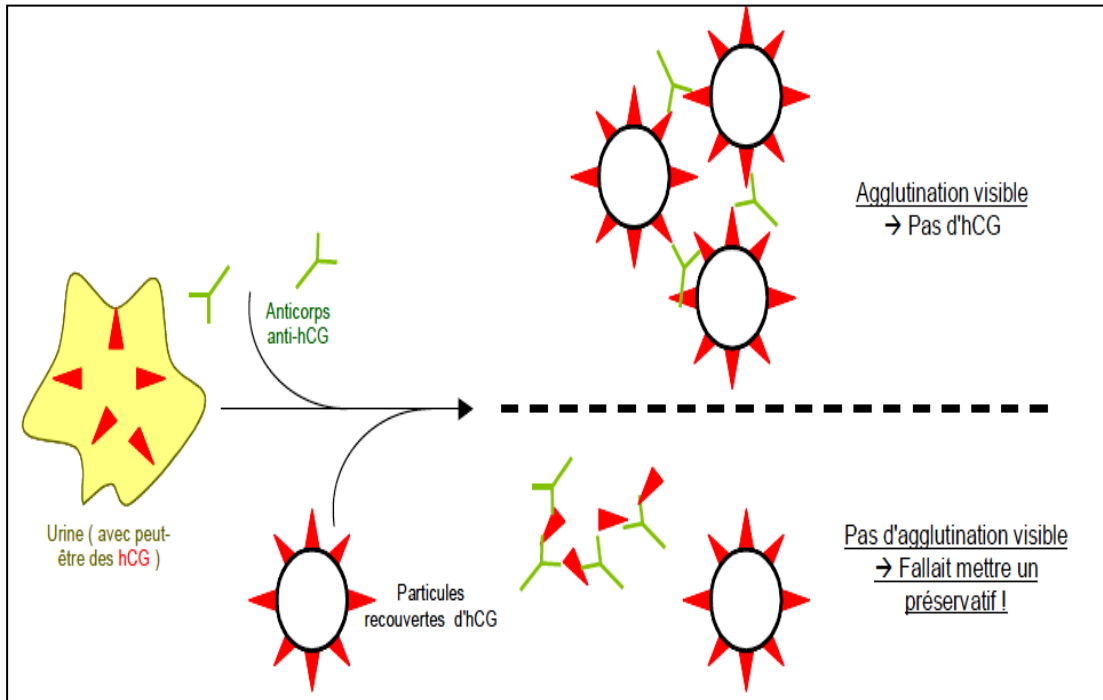
Figure 13. Principe de la réaction d'agglutination



**Figure 14.** Agglutination direct

**EXP 1. 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.



**Figure 15.** Agglutination indirect (test de grossesse)

## 2. Test virologique

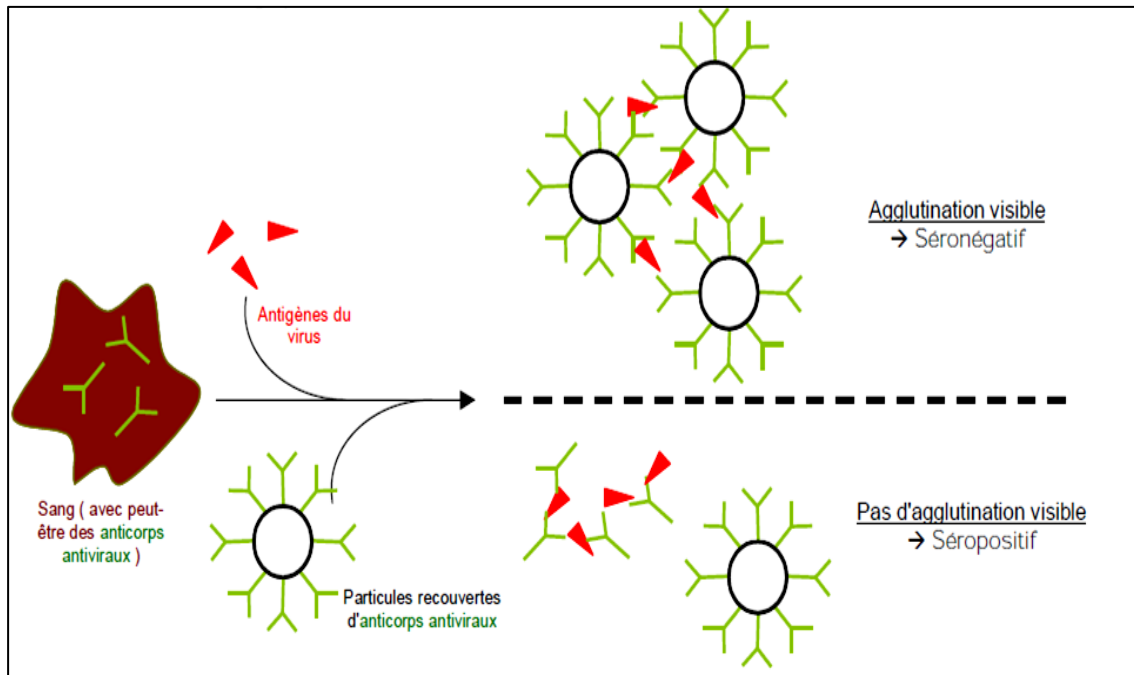


Figure 16. Agglutination indirect (test de grossesse)

### 2.1.1. Hémagglutination

Réaction d'agglutination directe ; Cette Méthode est largement appliquée à la détermination des groupes sanguins (ABO) et à la détection d'Ac.









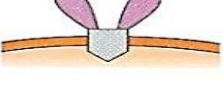







	Anti-B	Anti-A	Anti-A+B
<b>Groupe A</b> 	pas d'agglutination 	agglutination 	
<b>Groupe O</b> 			
<b>Groupe B</b> 			
<b>Groupe AB</b> 			

Figure 17. Détermination des groupe sanguins ABO

### 2.1.1.1. Le test de Coombs

Le test de Coombs consiste à rechercher la présence des auto-anticorps. Différents anticorps sont mis en présence du sang du patient et entraînent une agglutination des globules rouges en cas de présence d'auto anticorps : L'antiglobuline

#### a/Test de Coombs direct

##### ➤ L'antiglobuline :

un anticorps dirigé contre une immunoglobuline. Utilisé en laboratoire comme réactif, il permet de mettre un anticorps en évidence. L'analyse permettant cette mise en évidence nommée à l'origine « réaction de Coombs » est maintenant appelée « test direct à l'antiglobuline TDA ».

#### a/Test de Coombs indirect

Le test de Coombs indirect est réalisé lorsque le test de Coombs direct s'avère positif. Ce test consiste à déterminer la spécificité de l'auto Anticorps pour l'antigène des GR, en mettant en présence le sérum du patient avec des GR tests.

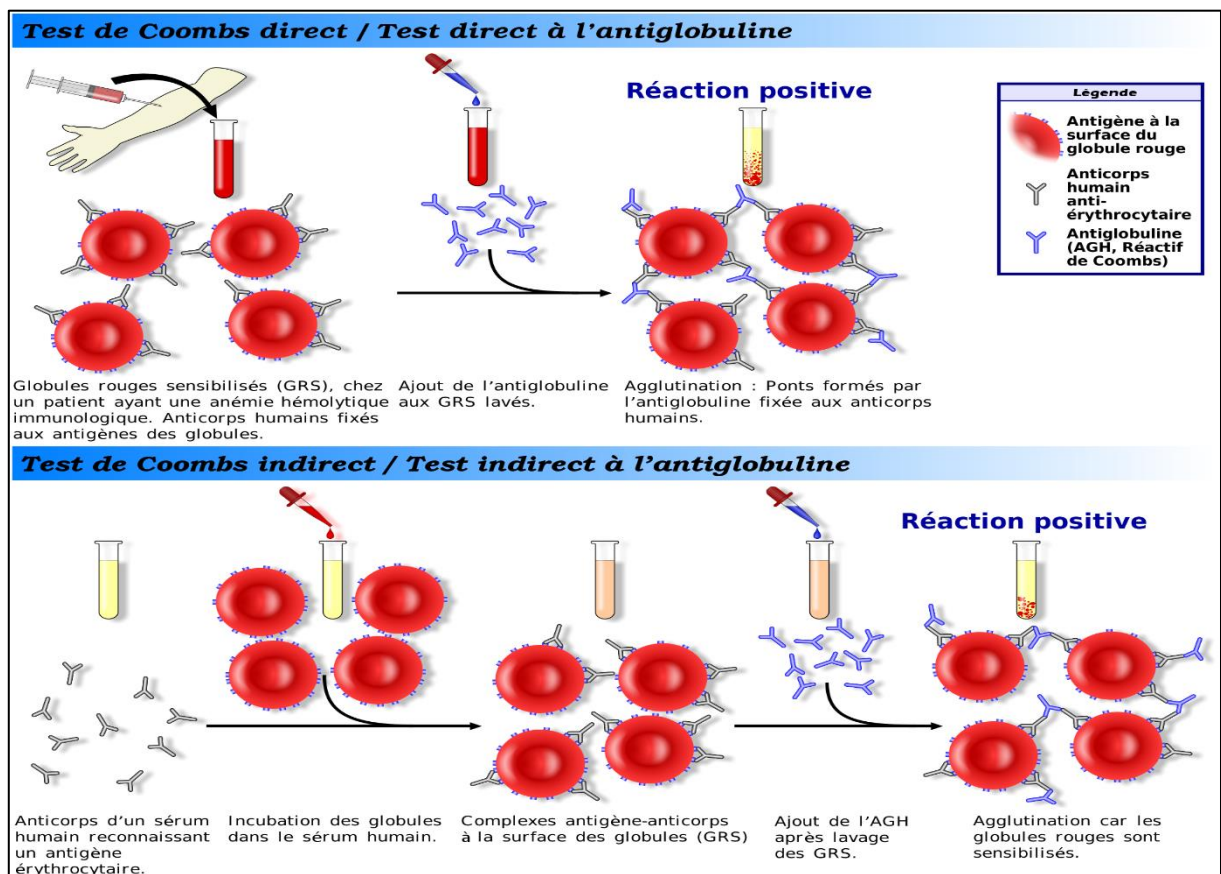


Figure 18. Test de Coombs direct/ indirect

### 3. Réaction de fixation du complément et hémolyse

Les techniques utilisant le complément sont basées sur le fait que les complexes Ac-Ag sont capables d'activer donc « consommer » les protéines du complément. • Elles sont utilisées pour la détection d'anticorps dans le sérum de patients

#### ➤ Principe de la technique

Après inactivation thermique du complément dans le sérum du patient, on lui ajoute du complément et l'antigène spécifique à l'anticorps recherché. Si cet anticorps est présent dans le sérum, le complément sera fixé et consommé. On ajoute ensuite des érythrocytes (GR) couverts d'anticorps (le système indicateur).

- Test positif: L'absence d'une hémolyse du système indicateur indique la consommation du complément.
- Test négatif: le complément ajouté est disponible pour lyser des GR du système indicateur.

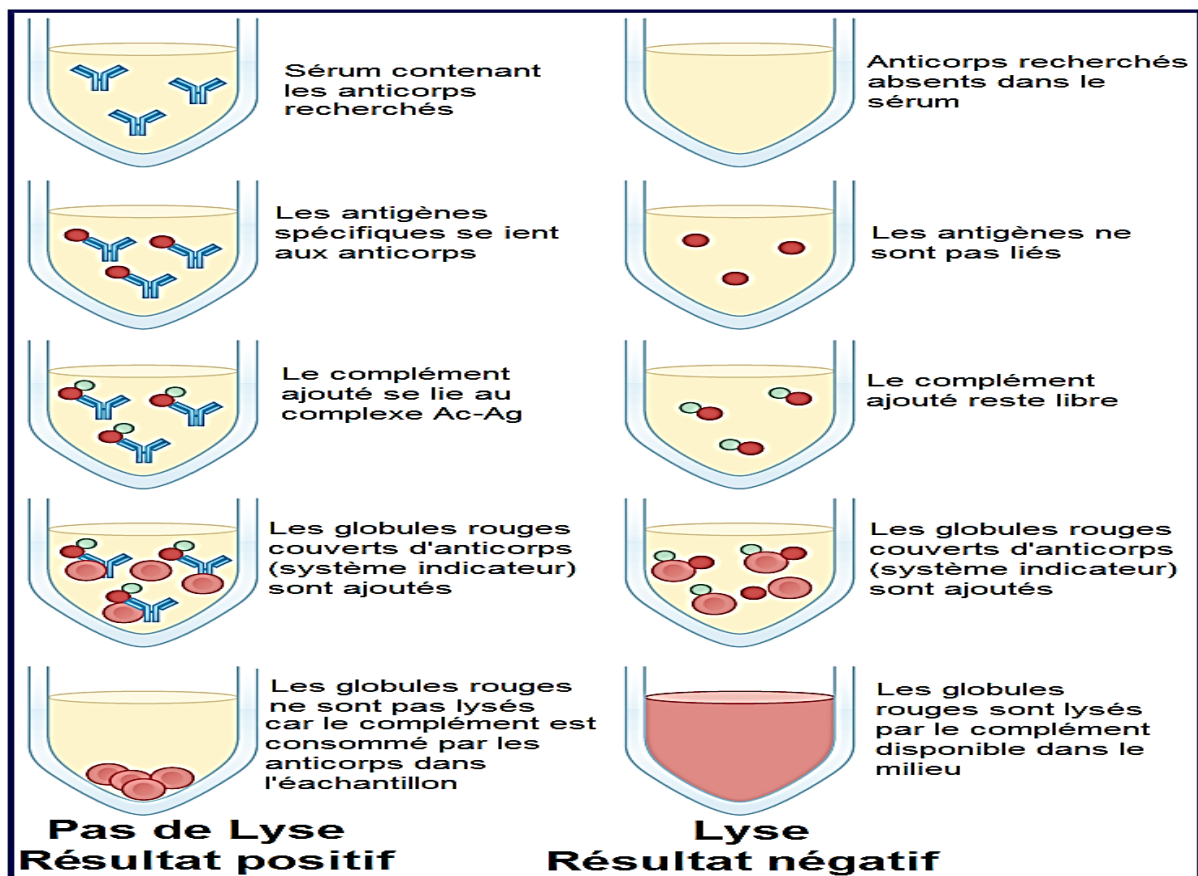


Figure 19. Technique de fixation du complément et hémolyse.

### Exercice d'évaluation 3

#### Exercice 1:

a- On veut déterminer des groupes sanguins de 4 individus à l'aide de sérums test. Les résultats obtenus sont indiqués dans le *tableau 1* ci-après :

Numéros du prélèvement	Résultats avec le sérum test anti-A	Résultats avec le sérum test anti-B	Résultats avec le sérum test anti-A et anti-B
N°1	<i>Pas d'agglutination</i>	<i>Pas d'agglutination</i>	<i>Pas d'agglutination</i>
N°2	<i>Agglutination</i>	<i>Agglutination</i>	<i>Agglutination</i>
N°3	<i>Pas d'agglutination</i>	<i>Agglutination</i>	<i>Agglutination</i>
N°4	<i>Agglutination</i>	<i>Pas d'agglutination</i>	<i>Agglutination</i>

- 1) En exploitant ces résultats, déterminez le groupe sanguin de chacun de ces individus.
- 2) On ajoute les hématies tests du groupe sanguin A ou B à un autre prélèvement de sang de chacun de ces individus.

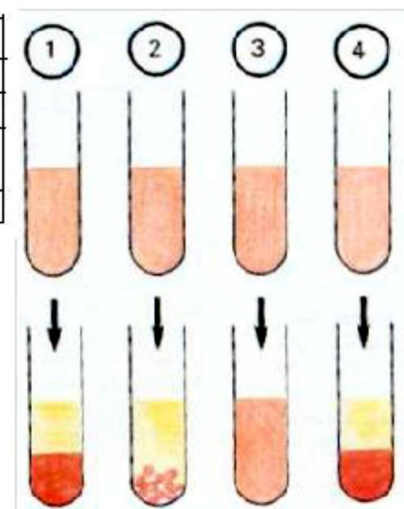
b- Reproduisez le *tableau 2* ci-dessous sur votre copie, dans lequel vous indiquez les résultats attendus (*agglutination* ou *pas d'agglutination*) pour chaque cas.

Prélèvement :	N°1	N°2	N°3	N°4
Résultats avec les hématies tests du groupe A				
Résultats avec les hématies tests du groupe B				

#### Exercice 2 :

Quatre tubes à essai sont préparés avec des globules rouges de mouton dans une solution saline. Différents composés sont ajoutés avant incubation à 37°C. Après 2h, on observe les résultats suivants:

Tube	Contenu	Résultat
1	NaCl 0.9 %	Sédimentation
2	Anticorps de lapin anti -GRM	Agglutination
3	Anticorps de lapin anti -GRM + Complément de cobaye	Hémolyse
4	Complément de cobaye	Sédimentation



- 1-Que déduire du résultat obtenu dans chacun des tubes 2, 3, et 4 ?
- 2-Quelle conclusion tirez-vous quant au rôle de l'anticorps et celui du complément, qu'elle est la voie d'activation du complément impliquée dans cette expérience ?
- 3-Quelle est le type d'immunité caractérisé dans ce cas ?

## Solutions d'exercices

### Corrigé type 1:

Numéros du prélèvement	Le groupe sanguin
N°1	O
N°2	AB
N°3	B
N°4	A

Prélèvement :	N°1	N°2	N°3	N°4
Résultats avec les hématies tests du groupe A	Agg	Pas agg	Agg	Pas agg
Résultats avec les hématies tests du groupe B	Agg	Pas agg	Pas agg	Agg

### Corrigé type 2:

**1- Tube 1 :** Témoin : Les globules rouges de mouton (GRM) sont intacts (sains) - **Tube 2 :** Les GRM sont agglutinés. Cela signifie que l'addition des anticorps a causé leur agglutination.

**Tube 3 :** Les GRM sont lysés. Donc l'addition du complément en présence des anticorps a causé la lyse des GRM.

**Tube 4 :** Les GRM sont intacts. Donc la présence du complément seul ne permet pas l'agglutination des GRM ni leur lyse.

**2- Rôle des anticorps :** Réaction (liaison) avec les GRM formant des complexes immuns entraînant leur agglutination.

**Rôle du complément :** lyse des GRM. Il s'agit de la voie classique (C1 C9).

## Chapitre 3 : Les techniques d'immunomarquage

### ➤ Définition

Les techniques d'immunomarquage sont utilisées pour analyser des Ag ou haptènes en très faible quantité (sensibilité de l'ordre du nmol/L). Ce principe est aussi utilisé pour étudier les immunocomplexes non précipitant et non agglutinant.

Le grand principe du marquage est de fixer sur un des réactifs une substance qui permettra d'identifier l'immunocomplexe recherché.

Les marqueurs les plus utilisés sont :

- Les enzymes (phosphatase alcaline ou peroxydase)
- Les fluorochromes (fluorescéine ou rhodamine)
- Les radio-isotopes

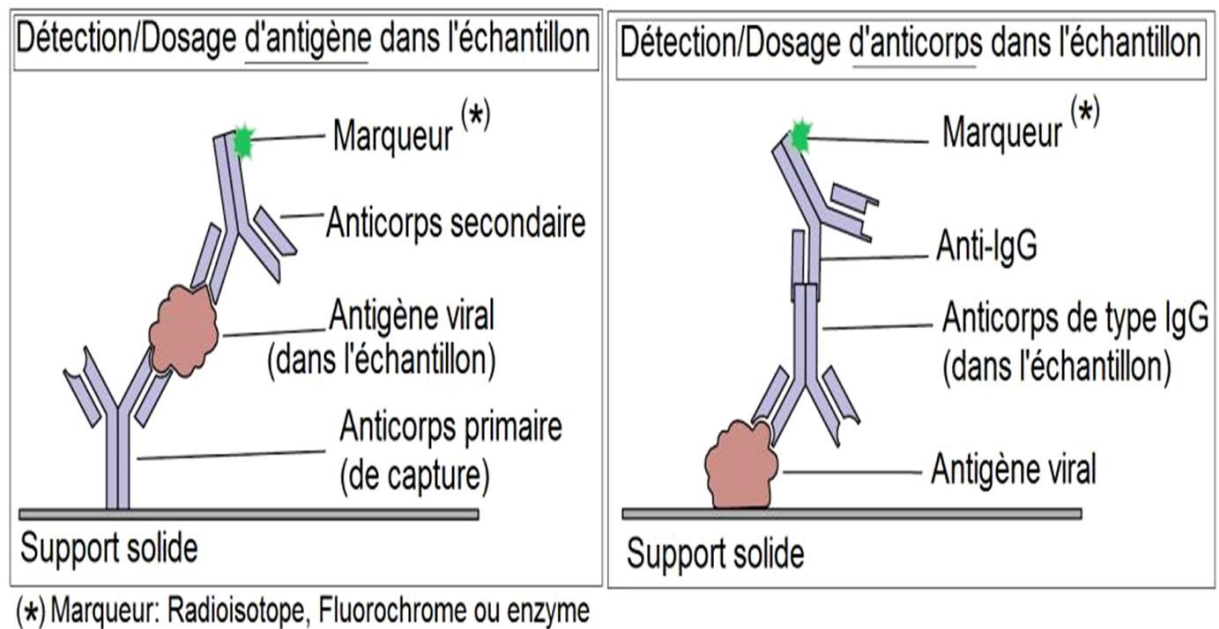


Figure 20.Principe des techniques d'immunomarquage

### 1.ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

L'immunoenzymologie, plus connue sous le nom d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Dans cette réaction, l'antigène ou l'anticorps est marqué avec une enzyme, qui permet de transformer un substrat incolore en produit coloré. Le temps de réalisation varie de moins d'une heure à plusieurs heures. La lecture est réalisée au moyen d'un spectrophotomètre.

## ➤ Les principales étapes du Test ELISA

Le test comporte quatre étapes principales :

**a-Fixation de l'antigène :** L'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.

**b- Fixation de l'anticorps à doser :** On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d'anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non

**c- Fixation de l'anticorps de détection :** On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anticorps anti Ig qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.

**d-Révélation :** On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

### 1.1. Les types d'ELISA

#### 1.1.1.ELISA direct

Dans un dosage ELISA direct, l'antigène est lié au fond du puits de la microplaque, puis il est lié par un anticorps qui lui est spécifique et également conjugué à une enzyme ou à une autre molécule qui permet la détection.

#### 1.1.2.ELISA de type sandwich

Pour le dosage ELISA de type sandwich, deux anticorps spécifiques à deux épitopes différents sur l'antigène cible sont utilisés. L'anticorps de capture est lié au fond du puits de la microplaque et se fixe à un épitope de l'antigène. L'anticorps de détection se lie à l'antigène à un épitope différent et est conjugué à une enzyme qui permet la détection. (Si l'anticorps de détection n'est pas conjugué, alors un anticorps de détection conjugué à une enzyme secondaire est requis) (figure 21).

#### 1.1.3.ELISA indirect

Dans un test ELISA indirect, l'antigène est lié au fond du puits de la microplaque, puis un anticorps spécifique à l'antigène est ajouté. Un anticorps secondaire, conjugué à une enzyme ou à une autre molécule de détection est ensuite lié au premier anticorps (figure 22).

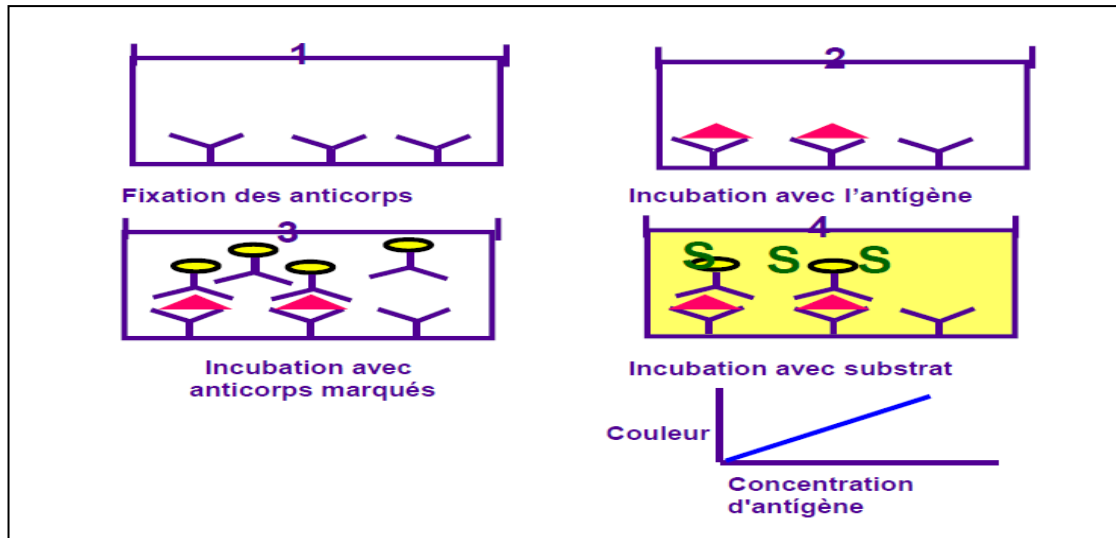


Figure 21. ELISA type SANDWICH

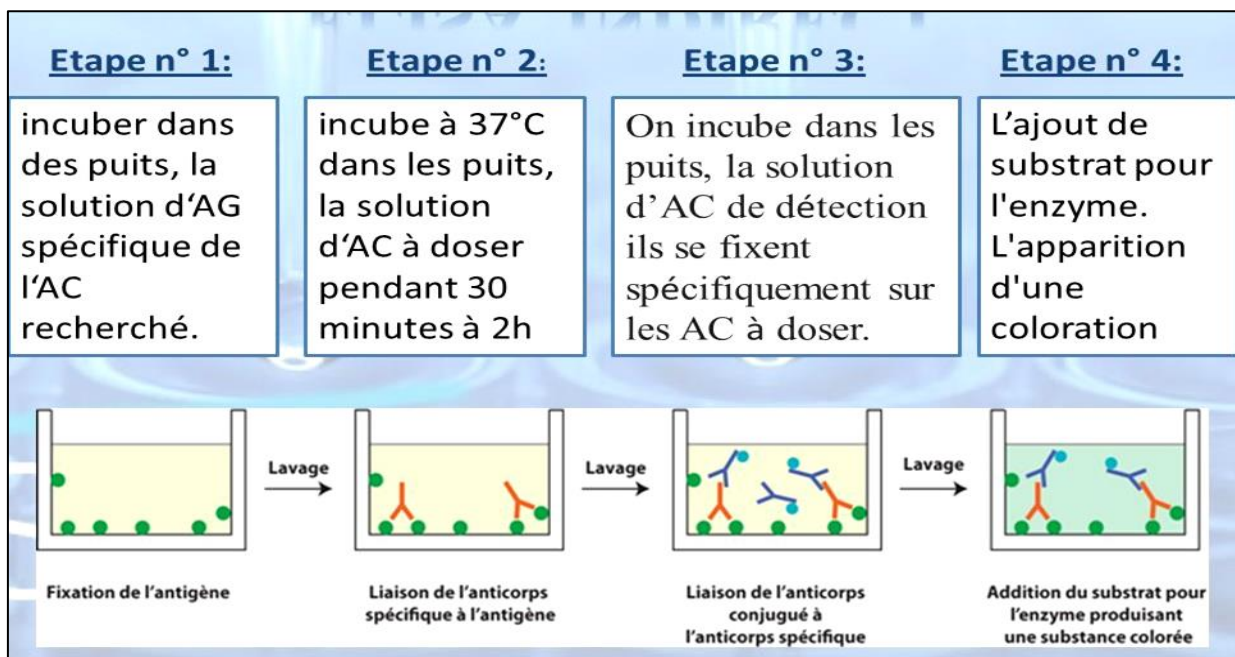


Figure 22. Les principales étapes du Test ELISA indirect

### 1.1.4.ELISA compétitif

Dans un ELISA compétitif, un antigène de référence est lié au fond des puits de la microplaque. L'échantillon plus l'anticorps sont ajoutés aux puits, et si un antigène est présent dans l'échantillon, il est en compétition avec l'antigène de référence pour se lier à l'anticorps. La substance non liée est éliminée. Plus la quantité d'antigène est importante dans l'échantillon, plus la quantité d'anticorps liée par l'antigène de référence au fond des puits est faible, et plus le signal est faible.

## **2.L'immunofluorescence**

Technique utilisant des réactifs marqués par des fluorochromes (l'antigène ou l'anticorps est marqué avec un fluorochrome). Le temps de réalisation d'une technique d'immunofluorescence est de moins de 2 heures. La lecture nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence ou d'un cytomètre en flux.

### **➤ Principe de L'immunofluorescence**

Dans cette technique, un colorant fluorescent est fixé de façon covalente à l'anticorps spécifique et permet la détection directe de l'antigène à analyser. On peut en outre utiliser des Ac anti-Ig fluorescents pour détecter des anticorps fixés sur l'antigène tissulaire on parle alors dans ce cas d'immunofluorescence indirecte (figure 23).

#### **2.1.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.

#### **2.2.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.

## **3.La radioimmunologie (RIA)**

Technique utilisant des réactifs radiomarqués connue aussi sous le nom de RIA (Radio-Immuno-Assay) basée sur l'utilisation d'un marqueur radioactif (AC ou Ag marqué par un isotope). Cette technique est de moins en moins utilisée en raison de la nécessité d'un agrément pour les biologistes utilisateurs et en raison du problème des déchets radioactifs

### **3.1. Principe de la RIA**

La RIA classique repose sur le principe d'une liaison compétitive ,mettons en présence une certaine quantité d'anticorps spécifique d'un antigène donnée et cette même antigène préalablement marqué par radio isotope (figure 24) .

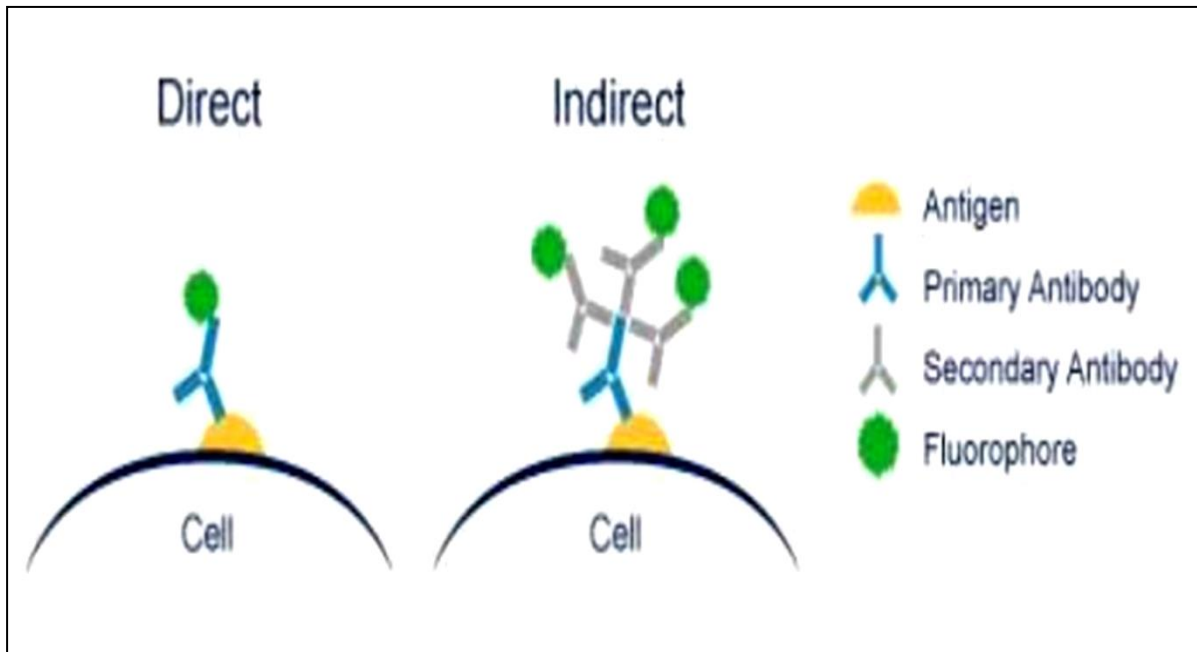


Figure 23. Principe de L'immunofluorescence



Figure 24 Principe de la RIA

## Chapitre 4: Vaccination et sérothérapie/Technique des anticorps monoclonaux

### 1.La vaccination :

Immunisation active avec un agent infectieux (ou un de ses dérivés) . Conférer une protection spécifique durable vis-à-vis de l'agent infectieux

#### ➤ Historique

**XVIII<sup>e</sup> siècle** : Angleterre : inoculation de la variole (procédé venu d'Orient)

**1800** : invention de la vaccine par le docteur Edward Jenner (maladie des vaches : immunité croisée contre la variole)

**1882** : Louis Pasteur popularise la «vaccination» vaccin : virus atténués ou tués à des fins prophylactiques des maladies

**1896** : «vaccin contre le croup» (sérum antidiphtérique)

**1921** : première administration de BCG à des nourrissons exposés à la tuberculose

**1931-32** : Premier grand procès médical : décès de centaines d'enfants du au BCG (contamination par des souches virulentes) Abandon par les USA du BCG

**1936** : vaccin contre la diphtérie

**1940** Vaccin contre le tétanos

**1948** Vaccin contre la fièvre typhoïde

**1949** En France, BCG obligatoire

**1954** : ligue nationale contre l'obligation des vaccinations

**1950** Par la suite, découverte des autres vaccins....

### 2.Propriétés d'un vaccin :

#### 2.1.Antigénicité

La préparation vaccinale : Antigène Partie du pathogène (épitope) capable d'induire une réponse immunitaire protectrice, dans la plupart des cas : Non identifié . Vaccin préparé de façon empirique.

#### 2.2.Immunogénicité

Capacité de l'antigène (épitope) d'induire des effecteurs immunitaires adaptés à l'agent pathogène . Anticorps, lymphocytes T cytotoxiques Les caractéristiques de l'immunogénicité sont fonction de : **nature (protéique ou polysaccharidique), dose administrée, protocole d'immunisation (nombre, espacement des doses), adjonction ou non d'adjuvants.**

### **2.3.Efficacité**

- Capacité de protéger contre l'agent infectieux correspondant :
- Niveau de protection,
- Durée de protection,
- Évaluation : Individuel : dosage des anticorps spécifiques, IDR /Collectif : fréq. de l'infection (incidence) en comparant une population vaccinée et une non vaccinée,
- Différentes efficacités : En général, un vaccin vivant induit une meilleure protection car il crée une immunité semblable à la maladie . Certains agents ont plusieurs variétés antigéniques = difficulté à obtenir un vaccin efficace contre toutes les variétés .
- Dérive antigénique : modification dans le temps de l'antigène pathogène .
- Réactivité de l'hôte : variation individuel de la réaction immunitaire immaturité immunologique (très jeune enfant) interférence entre les Ac maternels et les vaccins,
- Augmenter l'efficacité d'un vaccin : . Addition d'adjuvant (potentialise la réponse immunitaire) .
- Fractionnement des doses principe des rappels propriétés de la réaction anamnétique (stimulation de la mémoire

### **2.4.Innocuité :**

Evaluation de l'innocuité : préalable obligatoire à toute vaccination . Synd. Grippal, Guillain Barré, encéphalite.... La plupart du temps, manifestations minimales : Réaction locale (douleur, érythème,...) Accidents graves ; Accidents d'hypersensibilité : «allergie» ex : encéphalite post-vaccin rougeole ; Accidents dus à un déficit immunitaire avec les vaccins vivants.

## **4.Les principaux types de vaccins :**

### **4.1.Vaccins vivants de faible virulence**

L'agent pathogène, vivant : Capable de survivre et de se multiplier, provoque donc une maladie, mais limitée et subclinique. L'efficacité persiste très longtemps semble être un facteur de durée et d'efficacité (immunité cellulaire++).

### **4.2.Vaccins inactivés**

L'agent pathogène est inactivé totalement (chaleur, irradiation, formol,...) , conserve intact ses propriétés antigéniques , multiplication impossible.

### **4.3.Extraits (ou produits) de micro-organismes Anatoxine**

Exotoxine sécrétée par l'agent pathogène ; Inactivation de la toxicité , maintient de la structure antigénique. Extraits chimiques de bactéries ; pas de toxicité propre .

## 5.Séro-thérapies

Utilisation des propriétés immunitaires du sérum dans la prévention ou le traitement des maladies par l'immunisation artificielle passive d'origine animale ou humaine en neutralisant les microorganisme , Toxine , Venin.

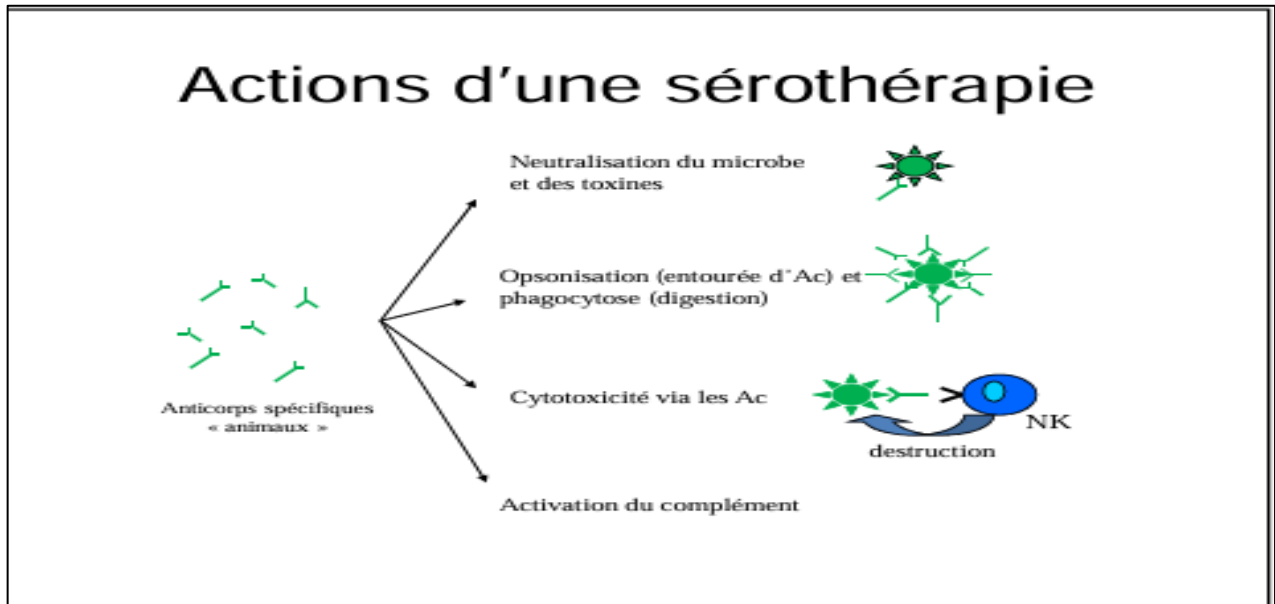


Figure 25. Actions d'une Séro-thérapies

### 5.1. Mode d'administration

L'administration se fait par injections sous-cutanées ou intramusculaires .Elle doit être effectuée avant l'apparition des signes de la maladie, ou en tous cas le plus tôt possible après l'exposition au microbe ou au venin. C'est le cas en particulier des sérums antivenimeux.

L'action du sérum est de courte durée puisque ces anticorps sont peu à peu détruits par l'organisme. C'est pour cela qu'on effectue souvent par la suite une vaccination.

#### ➤ Sérum d'origine animal

Quelques exemples de sérums d'origine animale inscrits au codex :

- Sérums antitoxine (antibotulique, antidiphthérique, antitétanique).
- Sérums antimicrobiens (antiméningocoque, antipneumocoque).

## ➤ **Gammaglobulines**

Il existe les gammaglobulines ordinaires ou standards préparés à partir de sérum, et les gammaglobulines spécifiques préparés à partir de sujets hyperimmunisés ou convalescents.

### **6. Production d'anticorps monoclonaux :**

Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des anticorps qui ont une seule spécificité choisie et qui sont habituellement sécrétés de façon continue par des hybridomes rendus «immortels». L'hybridome est un hybride artificiel construit à partir d'une cellule lymphoïde productrice d'anticorps et d'une cellule myélomateuse (immortelle). La technique des hybridomes mise au point par Köhler et Milstein en 1975 est un outil de production de grandes quantités d'anticorps hautement spécifiques qui a eu des répercussions considérables sur les méthodes de diagnostic et de thérapie ainsi que sur l'ensemble de la recherche biomédicale. Ainsi, les antisérums monoclonaux sont caractérisés par :

- une seule classe, voire une seule sous-classe d'immunoglobuline
- un seul isotype de chaîne légère, soit kappa, soit lamda
- un seul allotype de chaîne lourde et de chaîne légère, si il existe un polymorphisme allélique
- une spécificité anticorps unique, se liant à un seul épitope
- d'affinité unique

#### **6.1.Étapes de la production :**

La production des AcM passe par l'immunisation (in vivo) de cellules lymphoïdes sécrétant des anticorps, puis la sélection (in vitro) d'un hybridome producteur d'anticorps et en fin, par la multiplication de clones de l'hybridome (soit in vitro, soit in vivo).

**a/**La première étape se fait généralement à l'aide d'un ou de plusieurs rats ou souris (âgées de 6 à 8 semaines). L'antigène est généralement, mais pas toujours, injecté à l'animal conjointement avec un adjuvant dont la fonction est d'accroître la réponse immunitaire. En général, le délai minimal entre les doses de rappel d'immunogène doit être de 7 à 10 jours sauf dans le cas d'un protocole d'immunisation rapide sans adjuvant.

**b/** On doit effectuer les saignées d'essai 3 jours après le dernier rappel pour vérifier qu'il y a une réponse appropriée contre l'antigène et qu'il y a production des anticorps spécifiques. La plupart des tests immunologiques servant à déterminer s'il y a production des anticorps désirés nécessitent moins de 10 $\mu$ l de sérum murin. Après avoir confirmé l'existence de la réponse recherchée, on doit administrer un autre rappel à la souris, puis l'euthanasier 3 jours plus tard

et prélever sa rate; on isole alors les cellules lymphoïdes de cet organe et, dans certains cas, des ganglions lymphatiques.

**c/** Par l'ajout de polyéthylène glycol qui favorise la fusion des membranes, on fait fusionner les cellules lymphoïdes avec des cellules myélomateuses parentales cultivées *in vitro*. Seule une petite partie des cellules se fusionnent avec succès. Une autre méthode appelée électrofusion permet grâce à l'action physique d'un courant électrique de haute intensité pendant une période très courte de fusionner les cellules.

**d/** Le mélange formé par les 2 types de cellules non fusionnées et les nouvelles cellules hybrides est placé sur un milieu de culture sélectif contenant du HAT, un mélange d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine. L'aminoptérine contenue dans le HAT est une toxine puissante qui bloque l'une des voies métaboliques. La cellule peut contourner ce blocage si elle est en présence des métabolites intermédiaires que sont l'hypoxanthine et la thymidine. Les cellules de la rate croissent sur le HAT parce qu'elles peuvent utiliser cette voie métabolique de rechange, mais les cellules myélomateuses ont une déficience (HGPRT<sup>-</sup> : Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyl transférase) qui les en empêche et elles finissent donc par mourir. Les cellules de la rate meurent naturellement au bout d'1 à 2 semaines de culture, mais les cellules fusionnées survivent parce qu'elles ont acquis à la fois l'immortalité des cellules myélomateuses et la voie métabolique de rechange des cellules de la rate. Certaines cellules fusionnées héritent également de la capacité de production d'anticorps des cellules de la rate.

**e/** Par des procédures de dosage immunologique, on trie les hybridomes qui sécrètent l'anticorps recherché. Si le résultat est positif, on clone les cultures en étalant les cellules pour en placer une seule dans chaque cupule. On obtient ainsi un clone issu d'une même cellule d'origine immortelle et productrice d'anticorps.

**f/** Les hybridomes ainsi sélectionnés sont souvent clonés 2 ou 3 fois *in vitro* pour assurer la production de cultures d'hybridomes véritablement monoclonaux dont les anticorps ont une spécificité unique.

**g/** On peut multiplier les hybridomes ainsi clonés soit en continuant de les cultiver *in vitro*, soit *in vivo*. Il est possible de produire des AcM par injection d'hybridomes dans la cavité abdominale de plusieurs espèces de rongeurs. La multiplication subséquente des hybridomes dans le liquide ascitique permet de produire facilement des AcM de façon économique. Une autre méthode possible de production d'AcM, qui n'est cependant pas employée

régulièrement, est l'extraction d'anticorps recombinants à partir du lait d'animaux génétiquement modifiés. En effet, l'expression des AcM semble être beaucoup plus importante dans le lait des souris et des chèvres transgéniques que dans les systèmes de culture cellulaire. Les méthodes les plus récentes de production d'AcM, par exemple les techniques d'expression des phages et l'expression sous forme de protéines recombinantes, ne nécessitent pas l'utilisation d'animaux.

## **6.2. Applications et utilisations des anticorps monoclonaux :**

- **Fondamentales :** La production d'anticorps monoclonaux a permis des études fines de structure d'Ig pures. Définir l'aspect d'une fonction, déterminer une carte épitopique, ou encore de rechercher des épitopes non déterminés sur une protéine.

- **Diagnostiques :** en tant que sondes moléculaires : identification (type cellulaire, pathogènes, molécules), analyses quantitatives (ELISA), localisation (tissus) aussi bien dans le domaine humain que vétérinaire.

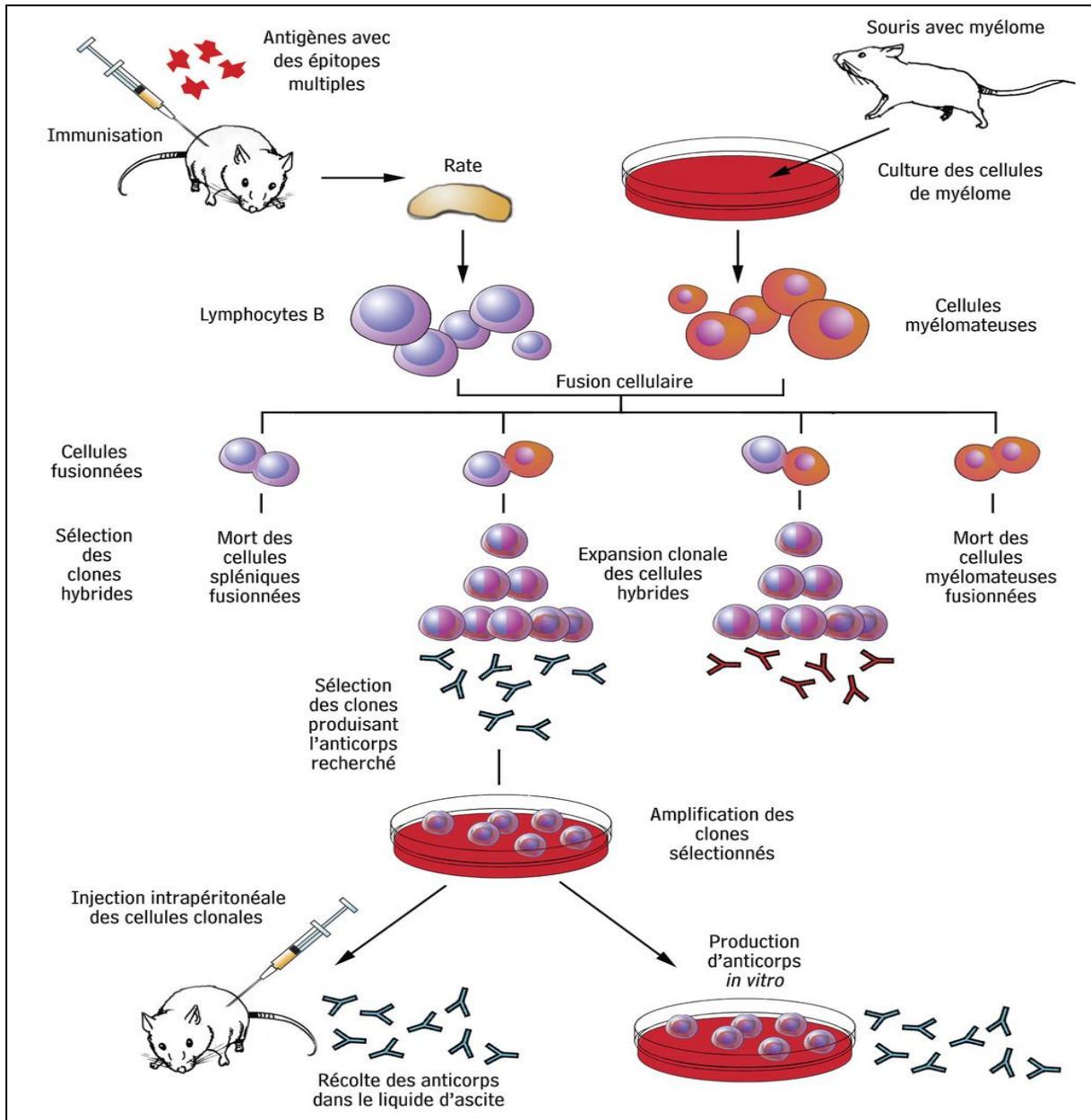
- **Agro-alimentaires :** recherche d'éléments néfastes pour la santé dans le domaine alimentaire ou encore l'intervention dans la sélection de semences dans le domaine agricole.

- **Thérapeutiques :** en tant que vecteur spécifique de toxines ou de drogue anti-cancéreuses, dans la prévention de rejet de greffe, traitement des maladies auto-immunes.

- **Autre Ac monoclonal humanisé utilisé en clinique :** Omalizumab (xolair®) qui est une IgG1 dirigée contre l'IgE humaine, utilisée dans le traitement de l'allergie (prévient l'interaction des IgE avec les récepteurs FcεR1).

- Dans le cas d'anticorps chimère, les régions constantes des chaînes lourdes et légères des Ig murines sont remplacées par des régions constantes humaines.

- Dans le cas d'anticorps humanisés, les régions hypervariables d'une Ig humaines sont remplacées par celles d'origine murine



**Figure 26. Production d'anticorps monoclonaux**

# Chapitre 5 : Diagnostic des pathologies affectant les système immunitaire

## 1. Dysfonctionnement du système immunitaire

C'est un dérèglement du système immunitaire. Dans ce cas, certaines réponses immunitaires ont des conséquences pathologiques pour l'organisme. On distingue :

- Le dysfonctionnement par excès : allergies et maladies auto-immunes.
- Le dysfonctionnement par défaut : déficit immunitaire ou immunodéficience.

### 1.1. Dysfonctionnement par excès

#### 1.1.1. Les allergies :

C'est une réaction exagérée ou hypersensibilité vis à vis de certains antigènes appelés allergènes qui n'ont le plus souvent, aucune toxicité propre. Ces allergènes sont de nature très variées. Les allergies se présentent par des réactions inflammatoires : œdème, boutons ; rougeur... On distingue deux types d'allergies :

- **Hypersensibilité immédiate à médiation humorale** : troubles apparues quelques minutes après contact, elle est due à un excès de sécrétion d'Ig E et de certains médiateurs comme l'histamine, à une insuffisance probable de LTs.
- **Hypersensibilité retardée à médiation cellulaire** : réaction cutanée survenant après des contacts répétés de la peau avec certaines substances chimiques contenues dans des objets de la vie courante. La réaction inflammatoire se présente après 24 à 48 heures.

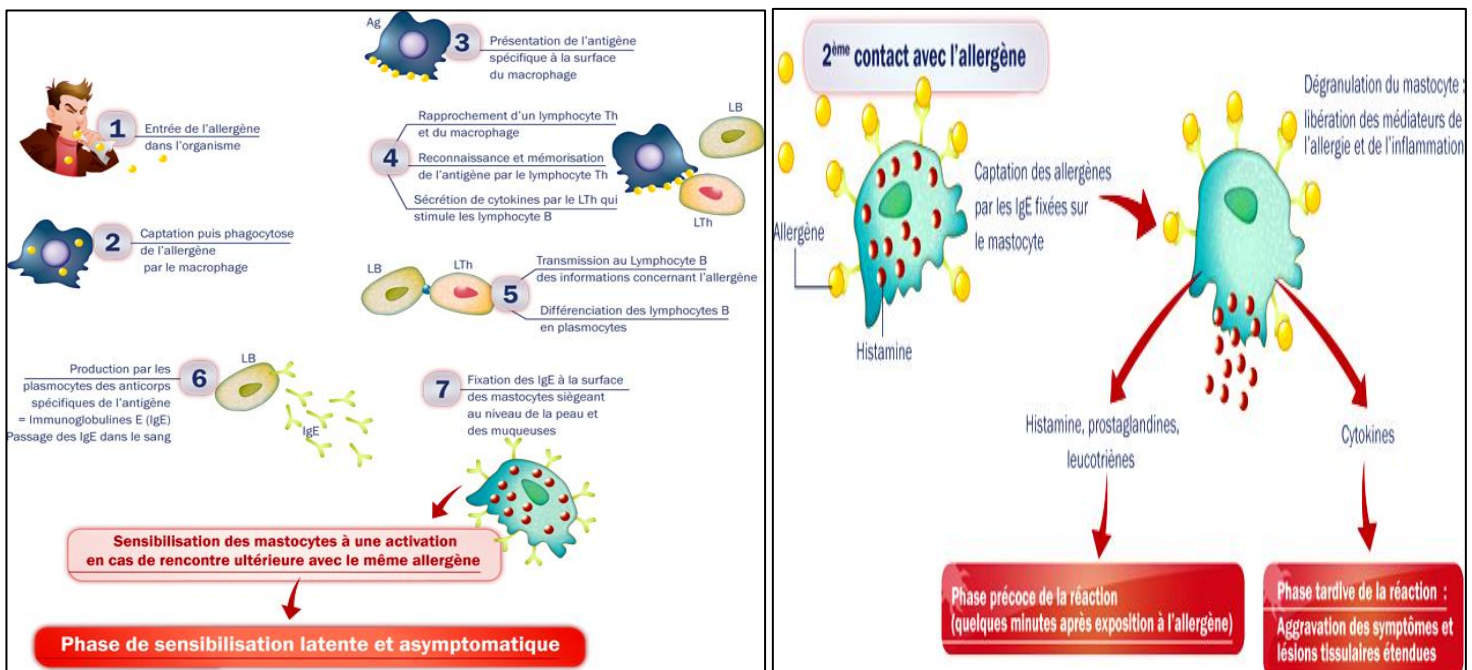


Figure 27. Mécanisme de l'allergie

### 1.1.2. Maladies auto-immunes

Le système immunitaire du malade présente une agressivité vis à vis de ses propres composants c'est-à-dire les défenses immunitaires sont dirigées contre des molécules du « soi ». Il y a production d'auto-anticorps dont le cible est un organe ou une molécule déterminée. Les organes atteints sont envahis de plasmocytes, LTc et phagocytes. Tous les organes peuvent être la cible du système immunitaire (Tableau).

**Tableau 2. Différents types de maladies auto-immunes**

Maladie	Cible	Conséquences
Diabète juvénile	Pancréas (cellule à insuline)	Hyperglycémie
Maladie de Basedow	Récepteurs de l'hormone stimulant la thyroïde	Hyperthyroïdie
Myasthénie	Récepteurs de l'acétylcholine	Faiblesse musculaire, paralysie
Anémie hémolytique	Globules rouges	Destruction des hématies
Gastrite atrophique	Estomac	Atrophie de l'organe
Sclérose en plaque	Myéline des centres nerveux	Troubles du système nerveux
Polyarthrite rhumatoïde	Immunoglobulines	Rhumatismes articulaires
Lupus érythémateux	ADN des cellules	Érythème facial (rougeur), lésion multiples (rein ...)

## 1.2. Dysfonctionnement par défaut

### 1.2.1. Déficits immunitaires

C'est une insuffisance d'une ou plusieurs fonctions du système immunitaire entraînant des manifestations pathologiques. On distingue :

- Déficits congénitaux ou déficits primaires.
- Déficits acquis ou déficits secondaires.

#### a/Déficits congénitaux ou primaires

Certains enfants naissent dépourvus de défenses immunitaires ; ils ne peuvent pas lutter contre les infections microbiennes, ils meurent bien avant l'âge de un an sauf si on les isole très tôt dans des enceintes ou « bulles » stériles afin d'éviter tout risque de contamination. Ces

déficits affectent aussi bien l'immunité humorale que l'immunité cellulaire ou les deux à la fois :

- Le déficit de l'immunité humorale est caractérisé par une diminution de nombre de Lymphocyte B et plasmocytes donc d'un défaut de production d'anticorps.
- Le déficit de l'immunité cellulaire est caractérisé par un déficit de Lymphocytes T.

### **b/Déficits acquis ou secondaires**

Ils résultent de maladies, de carences alimentaires, de divers traitements médicaux, des infections virales aiguës conduisant à une baisse des défenses immunitaires : cas du SIDA

### **1.3.Transplantation d'organes**

La transplantation consiste en l'ablation de cellules, de tissus ou d'organes vivants et en état de fonctionnement puis en leur réinsertion dans le même organisme ou en leur transfert au sein d'un organisme différent.

Le type de transplantation le plus fréquent est la transfusion sanguine ; La transfusion sanguine est utilisée pour traiter des millions de personnes chaque année. Plus généralement, la transplantation fait référence au transfert d'organes (greffe d'organe solide) ou de tissus.

-Les transplantations peuvent impliquer ;

- Les propres tissus de la personne
- Les tissus d'un vrai jumeau, dont les gènes correspondent exactement à ceux de la personne
- Les tissus de quelqu'un dont les gènes ne correspondent pas exactement à ceux de la personne
- Dans de rares cas, des tissus d'une espèce différente (par ex., porc)

-Les tissus transplantés peuvent être:

- Des cellules, comme dans la greffe de cellules souches.
- Une partie d'un organe, comme dans certaines transplantations hépatiques ou transplantations pulmonaires.
- Des organes entiers, comme dans la transplantation cardiaque ou la transplantation rénale.
- Plusieurs tissus (greffes composites).

#### **1.3.1.Rejet de greffe**

Le système immunitaire attaque normalement les tissus étrangers, y compris les greffons. Cette réaction est appelée rejet. Un rejet est déclenché lorsque le système immunitaire considère certaines molécules situées à la surface d'une cellule comme étrangères. Ces molécules situées à la surface des cellules sont dénommées antigènes.

Dans la transplantation d'organe, toutefois, de nombreux antigènes sont impliqués. On les appelle antigènes leucocytaires humains (HLA) ou complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ils sont présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme.

➤ **Suppression du système immunitaire**

Le rejet peut généralement être contrôlé par des médicaments appelés immunosuppresseurs, qui suppriment le système immunitaire ainsi que la capacité de l'organisme à reconnaître et détruire des substances étrangères. Grâce aux immunosuppresseurs, l'organe transplanté a plus de chances de survivre

## Conclusion générale

La réaction antigène - anticorps (Ag-Ac) est due à l'interaction entre les épitopes de l'antigène et les paratopes de l'anticorps. La réaction Ag-Ac a deux grands types d'applications :-La détection et le dosage des antigènes (par des méthodes dont il faut vérifier la spécificité, la reproductibilité et la sensibilité)-La détection et le titrage des anticorps (vis-à-vis d'un Ag ou d'un mélange d'Ag).

La présence d'un anticorps spécifique peut être mesurée par plusieurs méthodes différentes. Certaines d'entre elles mesurent la fixation directe de l'anticorps (Ac) sur l'antigène (Ag). Ces techniques sont basées sur des interactions primaires alors que d'autres détectent les changements physiques de l'antigène induit après la fixation de l'antigène et sont donc basées sur des interactions secondaires. Quoi qu'il en soit, ces deux types de tests peuvent être employés pour mesurer le titre et la spécificité des anticorps produits au cours de la réponse immunitaire.

## Références bibliographiques

Abas A. K., Lichman A. H. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique (2013). 4e édition Elsevier Masson, 290p. Chatenoud L., et Bach J. F. Immunologie (2012). 6e édition Lavoisier, 467p

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.

Andrien Six. Introduction aux techniques immunologiques (immunochimie). Université Pierre et Marie curie. Phnom penh, 2009.

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

Béné, M., C., Drouet, C., Fisson, S., Seillès, E (2014)., Méthodes en immunologie : Des principes aux bonnes applications, , Elsevier Masson 62, ISBN : 978-2-294-74022-0, ISBN numérique : 978- 2- 294-74159-3, Issy-les-Moulineaux cedex, France.

Lgu ensat A., Sayah K., Abbad A. et Elou a i i ( 2015 ) . Réaction antigène-anticorps appliquée en techniques immunologiques. Faculté des sciences et techniques. Université Abdelmalek Essaadi - Tanger.

Male D., Brostoff J., Roth D. B., and Roitt I. (2006). Immunology. Elsevier Seventh Edition, 563p.

Touaitia R. (2020). Immunologie appliquée. Université Tébessa. Algérie. 23p. 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)

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

