

TRAVAUX PRATIQUES D'IMMUNOLOGIE

Licence des Sciences du Vivant L3

Université PARIS V

Année 2008-09

9h30
Bâtiment de l'Horloge
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
4, avenue de l'Observatoire

Dr Y. Colin
Dr V. Dangles-Marie
Dr. L. Aldaz-Carroll

I) PRESENTATION GENERALE	3
II) ORGANISATION DES TP	3
III) Les techniques immunologiques basées sur l'interaction Ag/Ac	4
A- Techniques sans marquage :	5
1- Réactions de précipitation	5
2- Réactions d'agglutination immunologique	10
3- Réaction impliquant le complément	11
4- Réactions de neutralisation	12
B- Techniques avec marquage :	13
1- Immunofluorescence	13
2- Radio-Immunologie – Enzymologie	16
C- Sensibilité des tests	19
D- Application en TP (fiches nécessaires pour les TP !)	20
IV) Bioassay sur cellules WEHI	23

I) PRESENTATION GENERALE DES TRAVAUX PRATIQUES

L'étude du système immunitaire nécessite l'utilisation d'un grand nombre de techniques et procédés dont certains sont empruntés à d'autres disciplines telles la biochimie, la génétique moléculaire par exemple. Toutefois, l'immunologie a aussi développé ses propres techniques et outils, basés en particulier sur les anticorps, dont les applications sont très importantes en biologie.

L'objectif de ces travaux pratiques est double :

- 1) donner un aperçu des techniques immunologiques basées sur la réaction antigène-anticorps, en prenant des exemples concrets d'application humaine.
- 2) Illustrer l'analyse de la réponse cellulaire par la mesure de cytokines produites.

II) ORGANISATION DES TRAVAUX PRATIQUES

Les travaux pratiques se déroulent sur une journée :

Dans un premier temps, les différentes techniques d'immunoanalyse seront présentées afin de pouvoir réaliser ensuite les différentes expériences.

Trois réactions d'immunoanalyse applicables en diagnostic :

- 1) Test hémolytique qui explore l'activité du complément
- 2) Réaction d'hémagglutination passive (exemple : sérodiagnostic de la syphilis)
- 3) Réaction de neutralisation d'une activité enzymatique (exemple : dosage des antistreptolysines dans le sérum)

Un test utilisé pour l'analyse de la réponse cellulaire T :

Test fonctionnel de dosage de TNF grâce à un test cellulaire fonctionnel

Les résultats sont interprétés dans la journée, un compte-rendu par binôme sera remis à la fin de la séance.

III) TECHNIQUES D'IMMUNOANALYSE

La spécificité de la réaction Ag-Ac permet :

- la recherche, l'identification ou le dosage de toute molécule capable d'induire la production d'anticorps
- la recherche, l'identification ou le dosage d'anticorps grâce à l'antigène correspondant.

Liaison Ag-Ac ---> ***réaction équilibrée***
réaction réversible.

Lors de la réaction Ag-Ac, deux cas peuvent se présenter :

- on peut observer la survenue de phénomènes secondaires, physiques ou biologiques, inconstants mais ***visibles*** d'où différents types de technique:
 - **Précipitation**
 - **Agglutination immunologique**
 - **Techniques du complément**
 - **Neutralisation**
- l'union des molécules d'Ag au Fab des anticorps, est un phénomène constant mais ***invisible***.

Cette union peut être mise en évidence par le marquage de l'Ag ou de l'Ac ce sont les techniques dites de marquage :

- **Immunofluorescence**
- **Radio-immunologie**
- **Immuno-enzymologie**

A) TECHNIQUES SANS MARQUAGE

PRECIPITATION

1- Généralités

La réaction de précipitation en milieu liquide est l'illustration classique de la réaction antigène-anticorps.

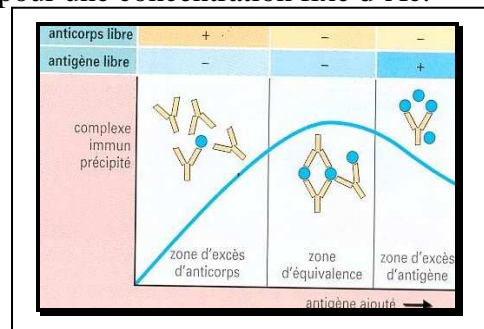
Restriction : Ag et l'Ac tous les deux en *phase soluble*
Ac précipitants.

2- Etude de la courbe de précipitation

Des concentrations croissantes d'Ag sont ajoutées pour une concentration fixe d'Ac.

Trois zones sont à distinguer :

- zone d'excès d'Ac,
- zone d'équivalence** (*précipité maximum*),
- zone d'excès d'Ag



3- Mécanisme

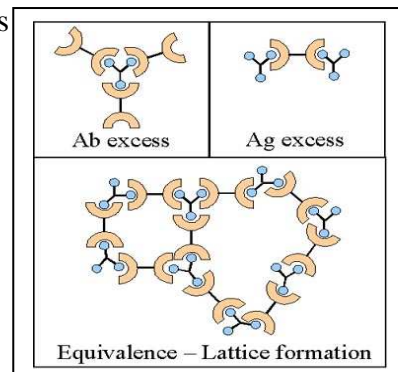
La théorie du réseau (MARRACK)

= formation d'un réseau tridimensionnel et multimoléculaire insoluble

= union d'Ag multivalents avec des Ac au moins bivalents

Importance des différents paramètres :

pH, température, force ionique



4- Précipitation en milieu liquide

4.1 Réactions qualitatives

Ring test

4.2 Réactions quantitatives

Immunonéphélométrie laser

= Mesure de la diffusion de la lumière sous un angle différent de zéro (par rapport à l'axe de propagation de la lumière incidente)

Les particules dispersant la lumière sont des complexes immuns précipités en milieu liquide. Il existe donc une relation entre l'intensité de la lumière mesurée par néphélométrie et la quantité de précipité Ag-Ac.

Le dosage d'un Ag s'effectue par précipitation avec l'immunsérum spécifique et par référence à une courbe d'étalonnage préétablie avec des solutions d'Ag de concentrations croissantes connues. (→ Dosage de nombreuses protéines du sérum IgG, IgM, IgA, protéines du complément, ApoA et B...)

Le test est **peu sensible** (seuil 0,5mg/ml). Une variante permet de baisser le seuil de détection en utilisant des microparticules (latex par ex) sur lesquelles sont fixés des Ac (dosage des IgE).

5- Précipitation en milieu gélifié

Analyse qualitative de mélanges d'Ag, Immunodosage d'un Ag.

- Les solutions d'Ag et d'Ac diffusent dans le milieu gélifié à partir de réservoirs--> gradients réguliers de concentrations décroissantes
- A l'équivalence, précipitation du complexe Ag-Ac, le précipité retenu dans les mailles du gel sera lavé et éventuellement coloré.

5.1 Les gels

Gelose (polyosides d'algue marine)

Agarose

Gel de polyacrylamide

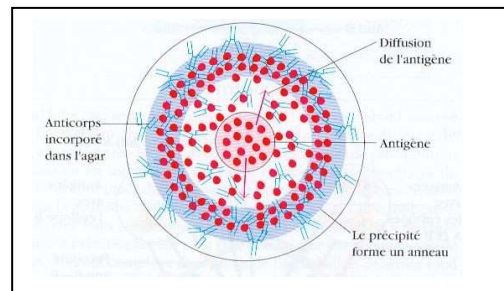
5.2 Les méthodes

5.2.1 Immunodiffusion simple

L'Ac est inclus dans la gélose à concentration constante

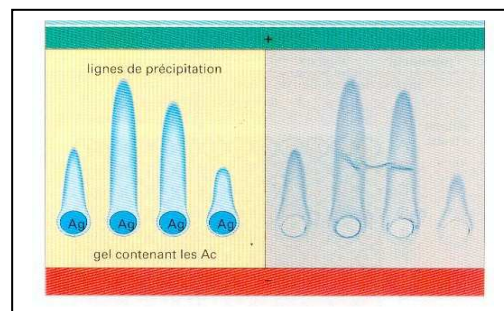
a) Immunodiffusion radiale

= Technique de MANCINI



b) Electroimmunodiffusion

= Technique de LAURELL



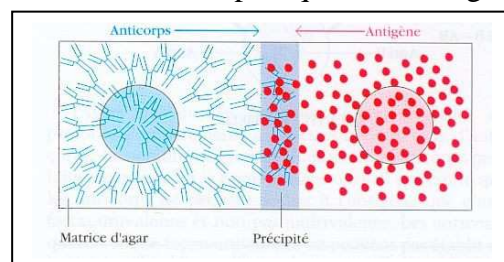
5.2.2 Double immunodiffusion :

Ac et Ag migrent l'un vers l'autre à partir de réservoirs pratiqués dans un gel

a) Diffusion spontanée

Technique d'OUCHTERLONY

--> arcs de précipitation



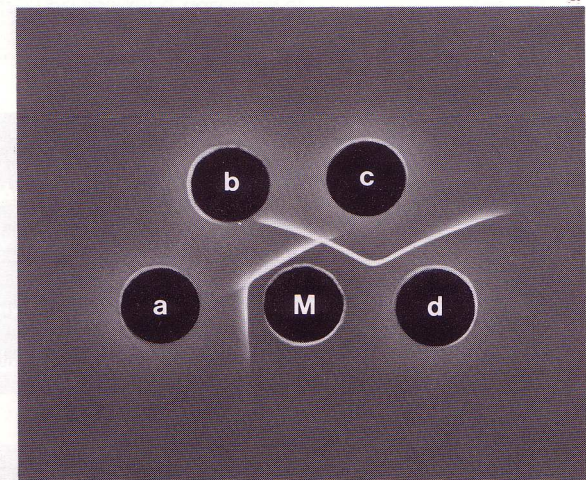
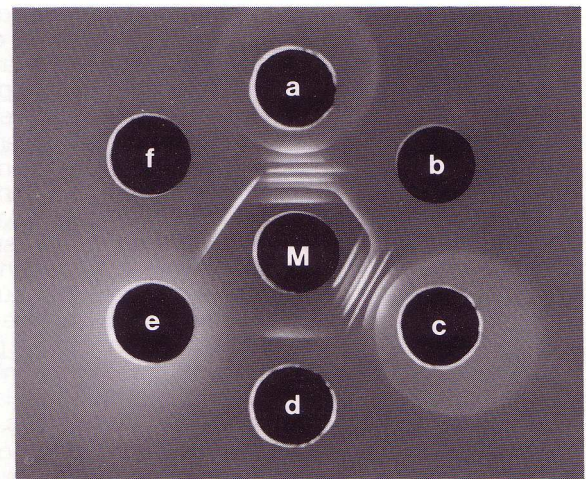
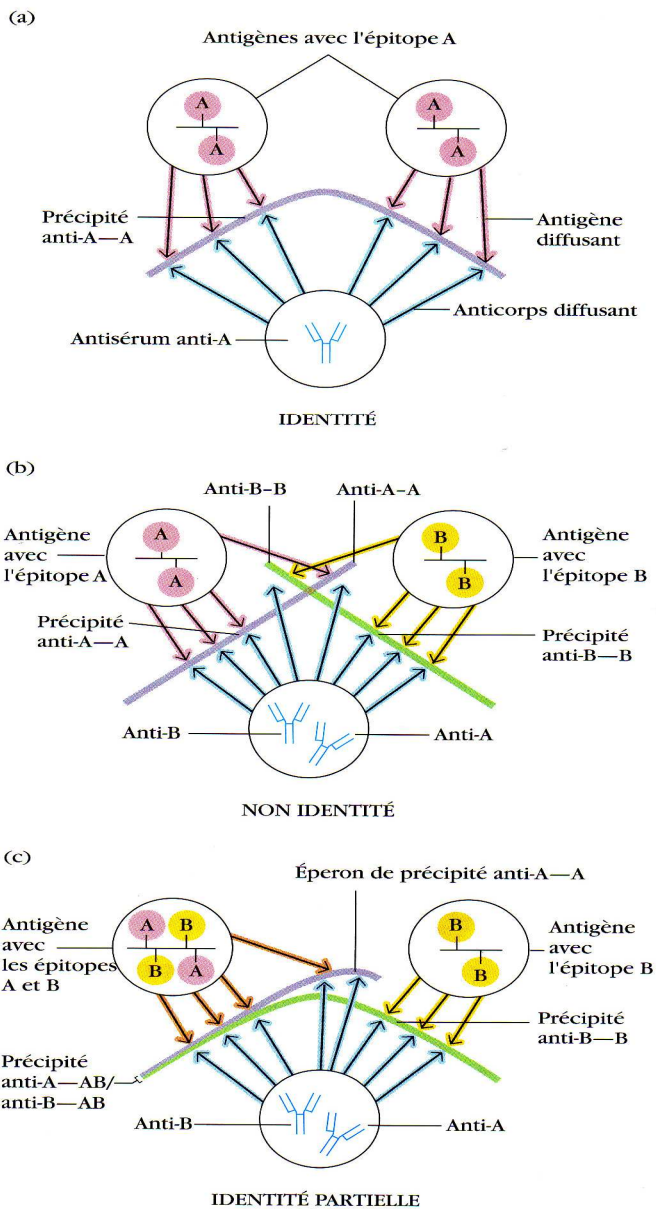


Fig. 4 - Ouchterlony, réaction d'identité antigénique.

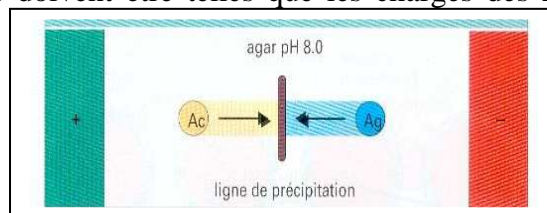
- a) M - sérum anti-humain de cheval
 a - sérum humain
 b - hémopexirine 1 mg/ml
 c - sérum humain
 d - sérum bovin
 e - sérum de souris
 f - C₃ 2 mg/ml.
- b) M - sérum anti-humain de lapin
 a - IgA 1 mg/ml
 b - IgG 1 mg/ml
 c - albumine 0,1 mg/ml
 d - sérum anti-albumine de lapin.

b) Electro-immunodiffusion

= migration accélérée et orientée par un champ électrique

• Electrosynérèse

Les conditions doivent être telles que les charges des Ac et des Ag soient de sens contraire.



- **Immunoélectrophorèse**

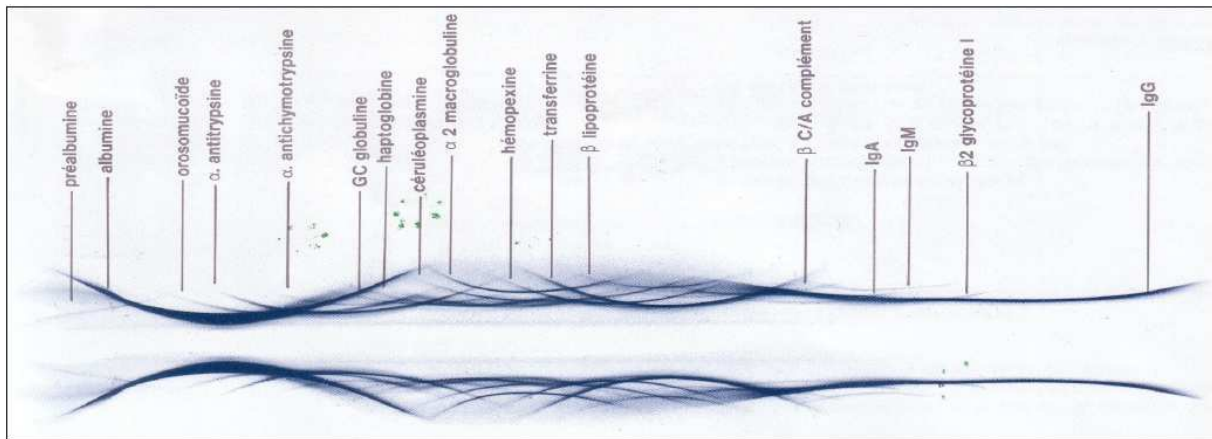
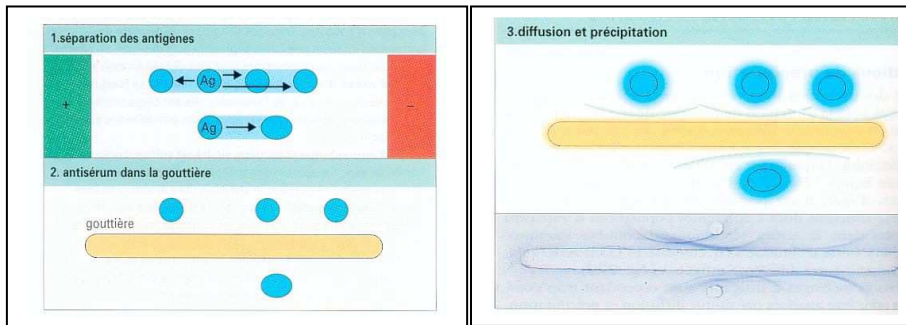
1^{er} tps : séparation électrophorétique des protéines du sérum à étudier

2^{ème} tps : double diffusion selon un axe perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique, contre un immunsérum poly ou monospécifique

--> un arc de précipitation par système Ag-Ac.

3^{ème} tps : lavage et coloration par colorant des protéines ou photographie

--> identification d'Ig monoclonale (suspectée par la présence d'un pic homogène à l'électrophorèse) grâce à des antisérums spécifiques des chaînes lourdes et des chaînes légères.



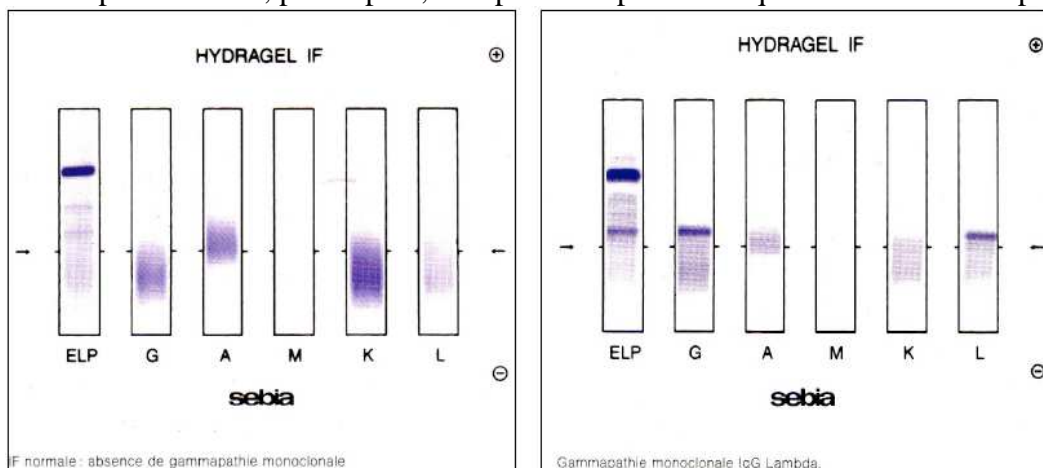
- **Immunofixation.**

1^{er} tps : Séparation électrophorétique des protéines

2^{ème} tps : Incubation de la piste électrophorétique avec des antisérums spécifiques des chaînes lourdes et des chaînes légères.--> précipitation des complexes Ag-Ac

3^{ème} tps : Lavage puis coloration de ces complexes Ag-Ac par un colorant des protéines

N .B. : plus sensible, plus rapide, interprétation plus aisée que l'immunoélectrophorèse

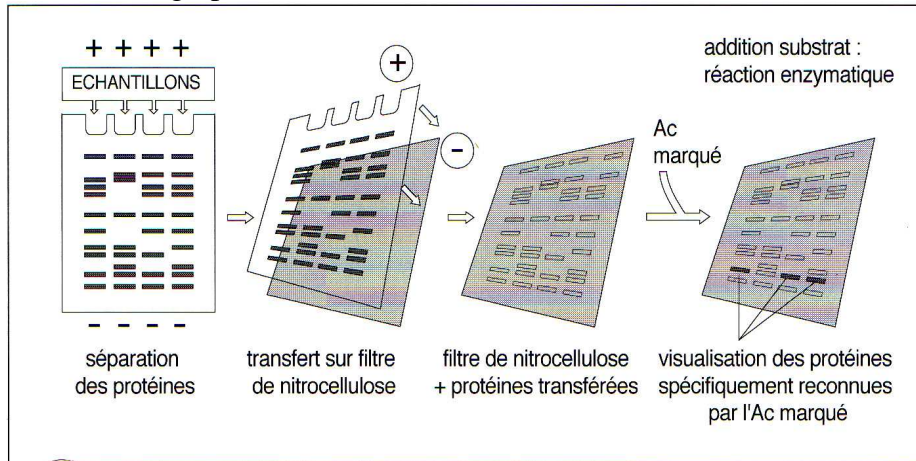


- **Immunotransfert ou Immunoempreinte ou Western blot**

1^{er} tps : séparation électrophorétique des protéines en gel de polyacrylamide

2^{ème} tps : transfert électrique de ces protéines sur une feuille de nitrocellulose

3^{ème} tps : révélation immunologique : des sérums contenant des Ac sont appliqués sur la nitrocellulose / lavage / les Ac, fixés sur les bandes protéiniques sont révélés par une anti-globuline marquée par une enzyme (on ajoute son substrat= réaction colorée) ou par un radioélément (autoradiographie).



Cette méthode permet :

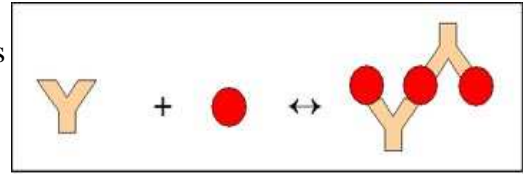
- de déterminer la masse moléculaire d'un Ag.
- de mettre en évidence dans un sérum des Ac dirigés contre différentes protéines (virales par ex : application, anticorps anti HIV).

AGGLUTINATION IMMUNOLOGIQUE

Agglutination immunologique = réunion en amas de particules à la suite d'une réaction Ag-Ac (suspension homogène de particules puis agrégats visibles à l'oeil nu).

Restriction : Ag **particulaire**

Hémagglutination : repose sur la capacité de l'anticorps à agréger les GR grâce à la présence d'antigène à leur surface.



1- Théorie de l'agglutination

Réaction complexe qui met en jeu des modifications des charges électriques à la surface des particules empêchant leur agglutination spontanée.

2- Conditions expérimentales

Anticorps agglutinants : IgM surtout (10 à 100 fois plus que IgG)

Densité des sites antigéniques : relations entre agglutinabilité et densité en sites antigéniques

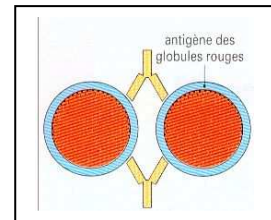
Facteurs expérimentaux : température, pH (6 à 8), force ionique.

3- Agglutination directe

L'antigène est situé sur la face externe de la particule, sur une membrane cellulaire ou bactérienne, directement accessible par l'anticorps.

→ détermination des groupes sanguins

→ agglutination de bactéries (typage des salmonelles etc...)



4- Agglutination artificielle

Utilisation d'artifices techniques permettant de favoriser l'agglutination ou permettant la détection d'anticorps non agglutinants.

4.1 Substances macromoléculaires

Albumine, polyvinylpyrrolidone, dextran

4.2 Enzymes protéolytiques

Papaïne, pepsine, broméline

4.3 Antiglobuline

Permet de déceler des anticorps anti-globules rouges non agglutinants

= **Test de Coombs**

direct : (*test globulaire*) étude des hématies du patient pour rechercher une immunisation in vivo (Ac fixés sur ses hématies)

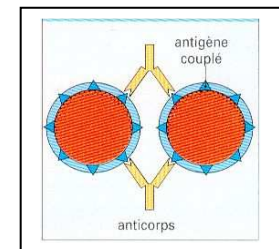
→ mal. hémolytique du nouveau né, mal. hémolytique autoimmune

indirect : (*test sérique*) détection d'Ac libres anti-globules rouges dans le sérum du patient

1) contact sérum + panel de GR à 37°, lavage

2) + antiglobuline--> agglut. si positif

→ recherche d'agglutinines irrégulières



5- Agglutination passive

L'antigène soluble est fixé sur une particule neutre servant uniquement de support.

5.1 Particules :

- hématies (humaines groupe O, mouton, dinde) formolées = stables plusieurs mois à 4°C

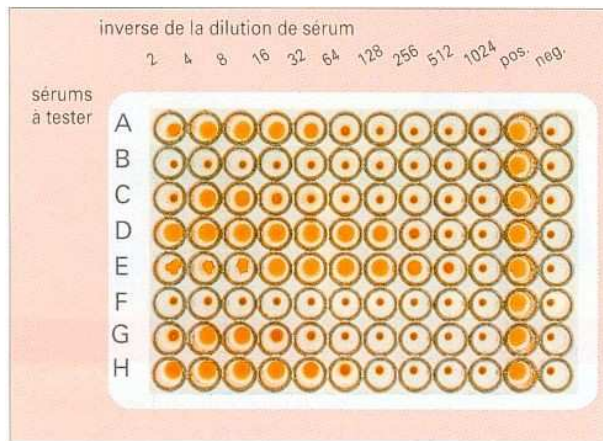
- particules de latex (inertes et calibrées)

5.2 Fixation de l'antigène sur les particules:

Selon les particules et l'Ag à fixer : simple contact ou fixation chimique ou fixation immunologique

6- Modalités techniques des réactions d'agglutination :

Réaction sur lame, en tubes, en microplaque, étude quantitative.



TECHNIQUES UTILISANT LE COMPLEMENT

1- Etude du complément

1.1 Réaction d'hémolyse

Basée principalement sur la réaction d'immuno-hémolyse = le complément se fixe sur les complexes Ag-Ac et provoque la lyse de la membrane cellulaire des hématies

1.2 Le système hémolytique

= globules rouges de mouton / sérum de lapin anti-globules rouges de mouton

Mises en présence de complément (présent dans un liquide biologique à étudier) ces hématies sensibilisées vont être lysées--> libération de l'hémoglobine et lecture photométrique

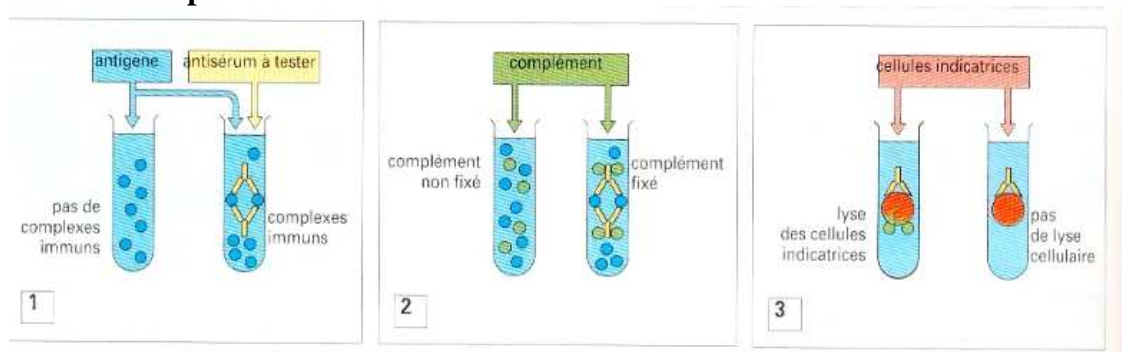
Relation entre le degré d'hémolyse et quantité de complément présent dans le liquide

1.3 Applications

Dosage du complément (et de ces composants) dans un liquide biologique.

2- Réaction de fixation du complément

2.1 Principe



2.2 Applications

- Sérodiagnostics d'infections bactériennes, virales, parasitaires par recherche et titrage d'Ac spécifiques présents à des concentrations inférieures à 1 µg/ml.
- Détection des Ag d'histocompatibilité de classe I et II (groupage HLA) par la réaction de **microlymphocytotoxicité**
 - les lymphocytes sont mis en contact avec une "batterie" d'Ac anti-HLA de spécificité connue, pré-déposés dans les puits d'une plaque,
 - après incubation on ajoute du sérum de lapin (= source de complément)
 - les lymphocytes sont lysés dans les puits où les Ac se sont fixés sur les Ag HLA (visualisée par la pénétration d'un colorant normalement exclu des cellules vivantes).

REACTIONS DE NEUTRALISATION

Les Ag solubles macromoléculaires ou cellulaires sont aussi étudiés par le biais de leurs fonctions qui peuvent être inhibées par liaison avec leurs Ac spécifiques.

1- Neutralisation d'enzymes

Un Ac peut inhiber l'activité enzymatique d'une protéine quand le site enzymatique est identique ou proche du site antigénique.

Ceci est mis à profit pour la mise en évidence de certains Ac en bactériologie.

2- Neutralisation de toxines

Les Ac anti-toxines neutralisent spécifiquement les effets biologiques des toxines.

3- Neutralisation des virus

Les Ac anti-virus peuvent neutraliser certaines propriétés des virus (neutralisation d'effets cytopathogènes sur des cultures cellulaires, inhibition de l'action hémagglutinante de certains virus sur certaines hématies. Ces observations peuvent permettre la détection et le dosage de certains Ac antiviraux dans le sérum.

B) TECHNIQUES DE MARQUAGE

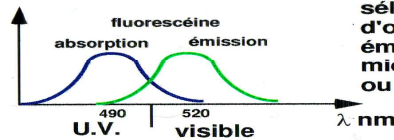
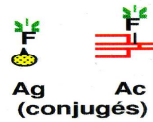
La réaction antigène-anticorps est rendue visible par un marquage préalable de l'antigène, de l'anticorps ou d'une antiglobuline (anti-Ig ou anti-C).

Différents marqueurs sont utilisés :

- corps fluorescents: immunofluorescence (IF)
- enzymes: immuno-enzymologie (EIA)
- éléments radioactifs: radio-immunologie (RIA)

Fluorochromes

Isiothiocyanate de fluorescéine (FITC)
rhodamine
phycoérythrine

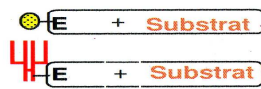


sélection d'une longueur d'onde du spectre d'émission (lecture par microscopie UV ou fluorimétrie)



Enzymes

péroxydase
β-galactosidase
phosphatase alcaline



Dosage photométrique du produit coloré de la réaction enzymatique

Radioisotopes

¹²⁵I



Compteur de radioactivité
Autoradiographie

Marquage des antigènes et des anticorps

Dans les réactions utilisant un marquage, le problème est de pouvoir distinguer le corps marqué qui a réagi dans la réaction Ag-Ac, de celui qui est resté libre.

En fonction de la modification ou non de l'activité du marqueur enzymatique lors de la réaction Ag-Ac, on a les deux schémas réactionnels:

- dans les *techniques en phase homogène*, l'activité du marqueur est modifiée par la réaction Ag-Ac (extinction du signal) et permet de révéler directement le développement de la réaction Ag-Ac. L'Ac = réactif liant et révélateur de la formation du complexe spécifique d'où une étape de séparation inutile.

- dans les *techniques en phase hétérogène*, le comportement du marqueur est inchangé par la réaction Ag-Ac ; une étape de séparation est obligatoire entre les complexes Ag-Ac marqués formés d'une part et l'Ag ou l'Ac marqué resté libre d'autre part, avant la lecture du signal fixé.

IMMUNOFLUORESCENCE

Méthode qui utilise un marquage par un corps fluorescent pour déceler une réaction Ag-Ac. On marque l'anticorps ou l'antigène ou encore un réactif réagissant avec le complexe Ag-Ac.

1- Principes fondamentaux

1.1 La fluorescence

= Phénomène physique : absorption d'un rayonnement par une molécule et émission d'une lumière de plus faible énergie.

1.2 Les fluorochromes

Fluorescéine (Isothiocyanate de), Rhodamine, Phycoérythrine

1.3 Microscope à fluorescence

Source lumineuse : lampe à vapeur de Hg

Filtres d'excitation

Miroir séparateur dichroïque

Filtre d'arrêt

2- Le système immunologique

2.1 Antigènes

Coupes d'organes, frottis de micro-organismes ou cellules, suspension de cellules

2.2 Conjugaison au fluorochrome

de l'anticorps ou immunoglobuline, de l'antigène

3 - Méthodes :

3.1 Immunofluorescence directe

La réaction se fait en *un temps* : le réactif, antigène ou anticorps, marqué avec le fluorochrome permet de déceler l'anticorps ou l'antigène correspondant.

3.2 Immunofluorescence indirecte

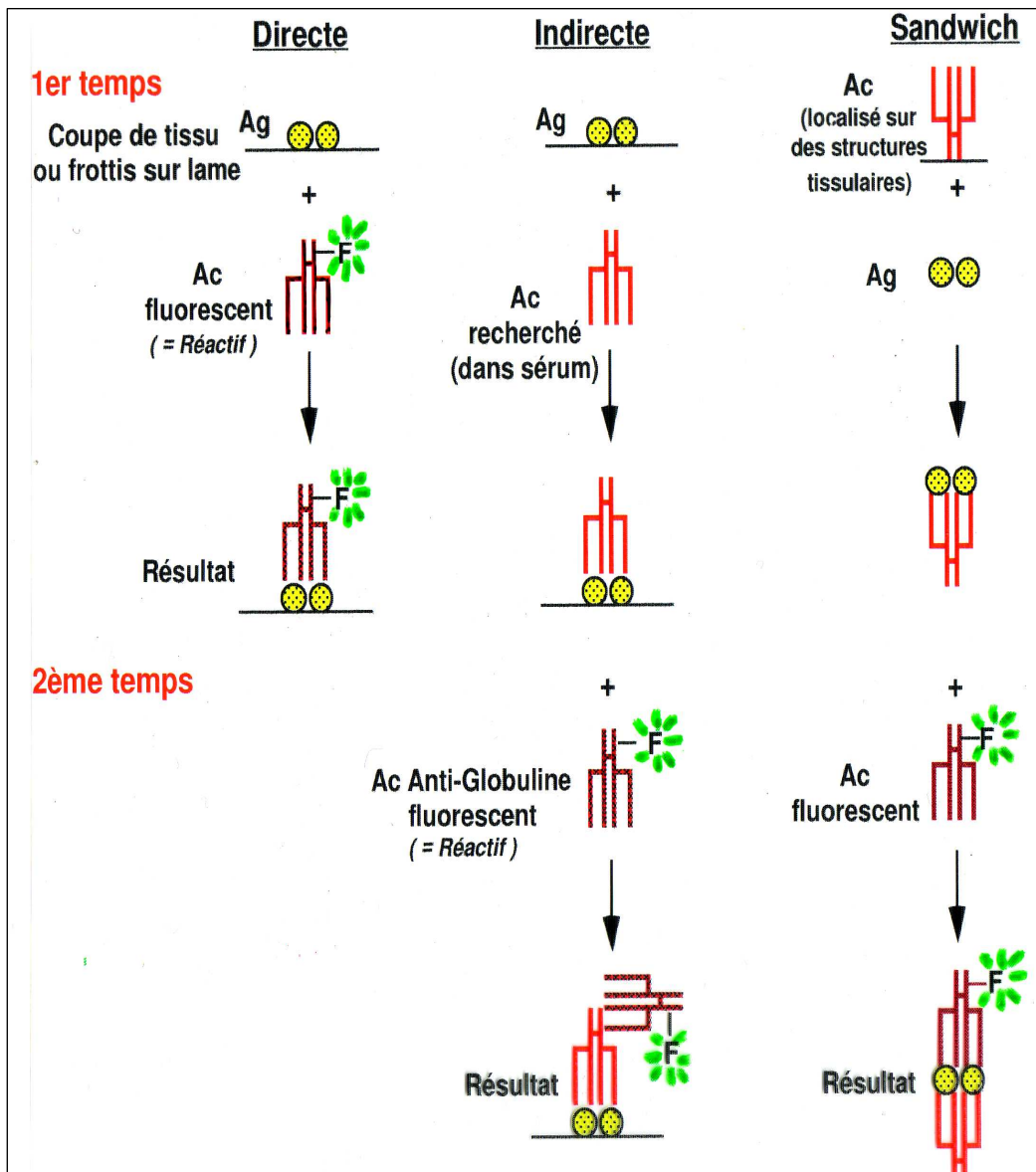
Méthode en *deux temps* :

1er temps - on fait agir un anticorps non marqué qui se fixe spécifiquement sur l'antigène

2ème temps - après lavage pour éliminer le premier réactif en excès, on fait agir une antiglobuline fluorescente révélatrice de la fixation de l'anticorps du premier temps (= deux réactions Ag-Ac successives).

→ Mise en évidence de l'antigène,

→ Mise en évidence d'Ac dans le sérum.



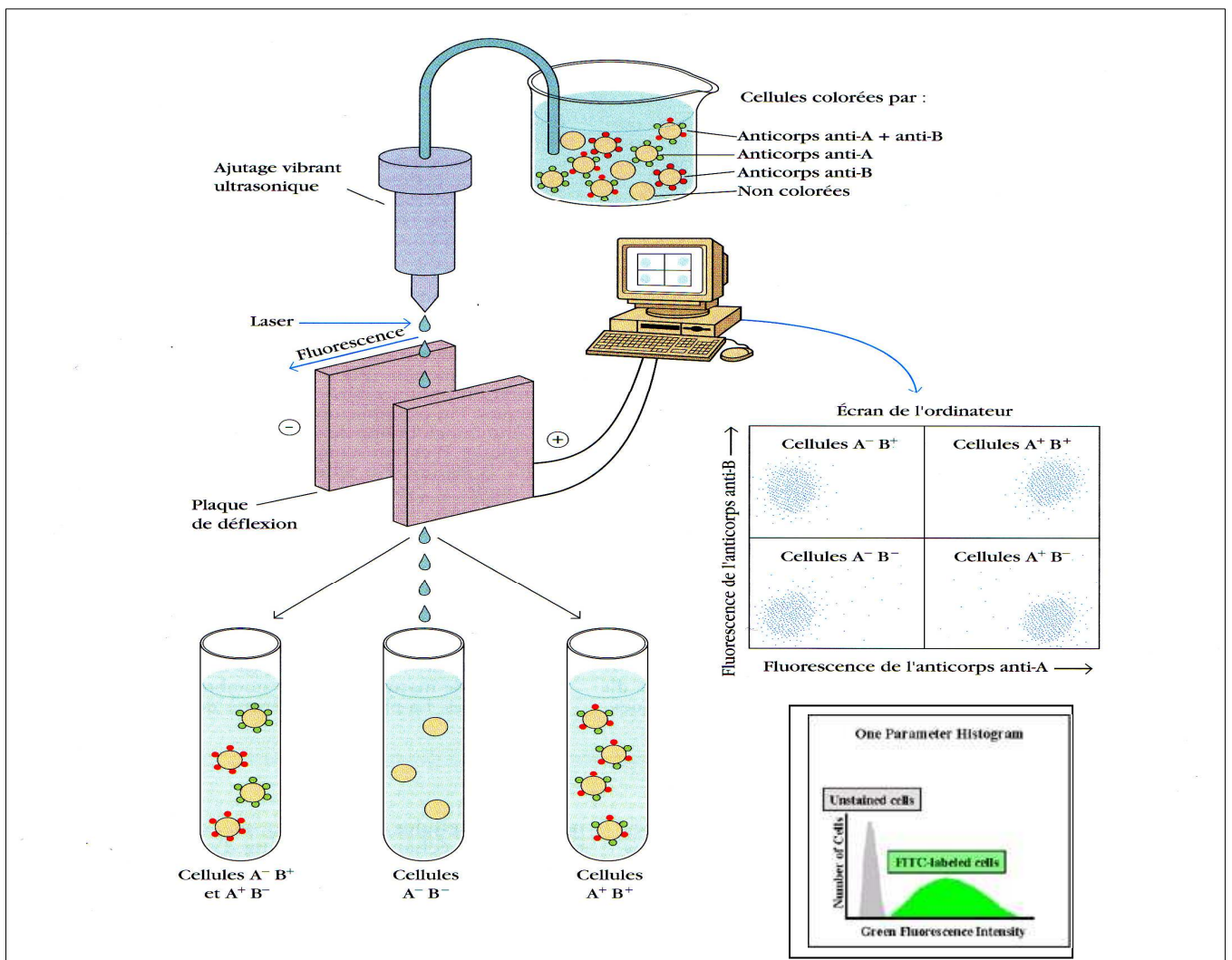
3.3 Cytométrie de flux

Numération de cellules exprimant des Ag au sein d'une suspension hétérogène:

Les cellules de l'échantillon sont marquées avec des réactifs fluorescents qui se fixent spécifiquement à des molécules de la surface cellulaire (ex : anti-CD4, anti-CD8...)

Les cellules sont entraînées dans une veine liquide. Chaque cellule passe devant un faisceau laser. Le système mesure la diffusion de la lumière aux petits angles, à angle droit et les intensités de fluorescence pour trois longueurs d'ondes différentes. Grâce à des filtres et des photomultiplicateurs, l'appareil enregistre l'intensité de fluorescence de chaque cellule passant devant la source laser.

Les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes. Permet une analyse multiparamétrique en déterminant pour chaque cellule, la taille, la granulosité, l'intensité de fluorescence avec différents fluorochromes.



RADIO-IMMUNOLOGIE - IMMUNOENZYMOLOGIE

1- Principe

Met à profit le signal émis par les molécules marquées par un radio-isotope : **RIA** = Radio Immuno Assay ou une enzyme : **ELISA** = Enzyme Immuno Sorbent Assay.

Permet la mise en évidence et le dosage de substances présentes en très faible quantité dans les milieux complexes, en associant l'utilisation de la spécificité très stricte de la combinaison Ag-Ac mise en jeu dans la réaction et l'introduction d'un signal très sensible marquant cette combinaison.

Radio-immunologie → révélation du complexe Ag-Ac radioactif par un compteur
Immuno-enzymologie → révélation du complexe Ag-Ac marqué par l'enzyme par mise en présence du substrat spécifique de cette enzyme.

2- Système immunologique

1.1 L'antigène

Liquide biologique, haptène

Coupes de tissus, cellules.

1.2 L'anticorps

Sérums, Ig poly ou monoclonales, anti-globulines.

3- Les marqueurs (= traceurs)

3.1 Radio-isotope

Choix du radio-isotope

Activité spécifique élevée

Période suffisamment longue

Détection facile du rayonnement émis

Stabilité des molécules marquées

Principaux radio-isotopes utilisés en biologie médicale.

^{125}I I/2 vie de 60 jours (le plus utilisé)

Rayonnement gamma

^3H I/2 vie de 12 ans

Rayonnement beta

3.2 Enzyme

Critères de choix de l'enzyme et de son substrat

pureté, bonne conservation, révélation simple et rapide, absence dans le milieu biologique étudié, degré de transformation important.

Principales enzymes utilisées

Les enzymes : peroxydase de raifort, phosphatase alcaline d'E. coli, béta-galactosidase d'E.coli, etc.....

Lecture du signal enzymatique

Substrat choisi suivant la nature de l'enzyme utilisé, le produit de la réaction est mesuré par spectrophotométrie ou par colorimétrie,

3.3 Autres marqueurs

Marqueurs luminescents qui émettent de la lumière après une excitation photonique de longueur d'onde appropriée :

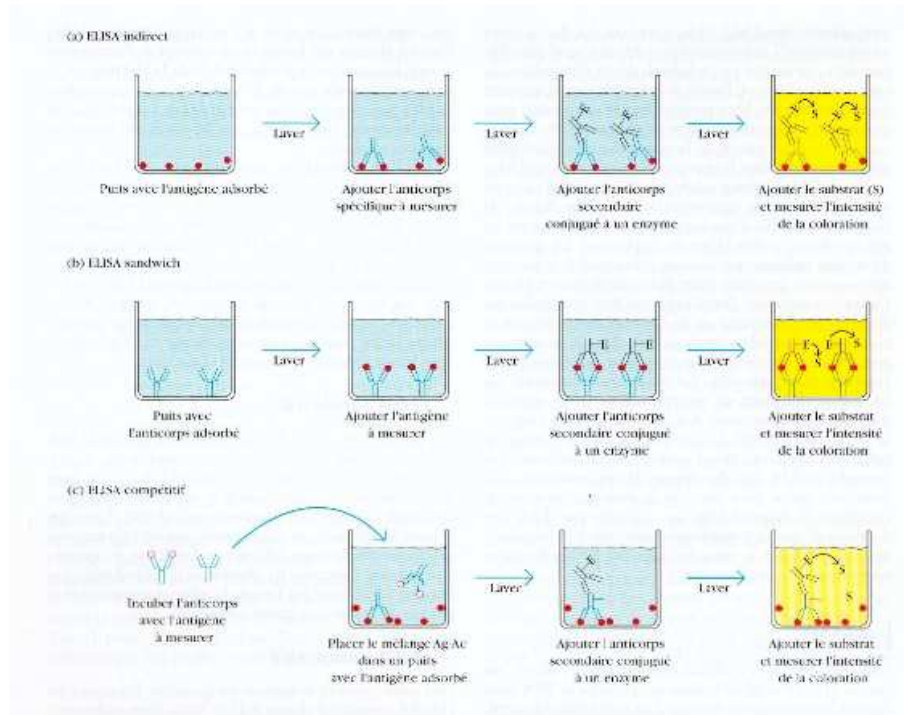
- Fluorescéine, rhodamine, ombelliférone
- détection par fluorimétrie, luminescence.

4- Expression des résultats

Dosage d'Ag : courbe d'étalonnage (5 ou 6 étalons)

Dosage d'Ac : notion de seuil de positivité (présence ou absence de l'Ac) ou référence à une courbe établie avec un sérum étalon international.

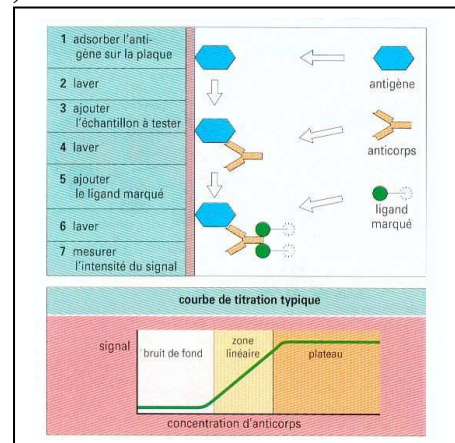
5- Méthodes



5.1 Analyse par méthode indirecte (*ELISA indirect*)

Permet le dosage d'anticorps.

- l'échantillon contenant l'Ac primaire (Ac1) est déposé dans un puits où est adsorbé l'antigène, avec lequel il réagit,
- après lavage, la présence de l'Ac1 est détectée en ajoutant un Ac secondaire (Ac2) anti-isotype conjugué à un enzyme,
- l'Ac2 libre est éliminé par lavage, et un substrat de l'enzyme est ajouté
- la quantité de produit coloré est mesurée par un lecteur spectrophotométrique approprié.

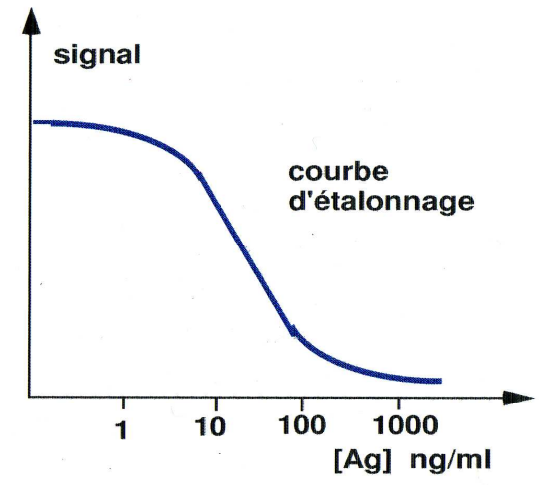
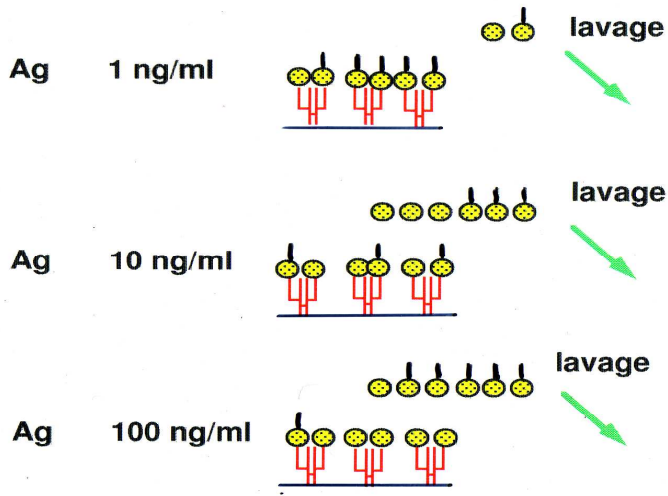


5.2 Analyse par compétition

On dispose :

- d'un liquide biologique contenant une substance X à doser qui constitue l'antigène "froid" (Ag°) en quantité inconnue;
- de l'anticorps spécifique anti-X en quantité fixe et limitée fixé sur un support solide (tube ou plaque de polystyrène par ex)
- d'un traceur constitué de l'antigène marqué (Ag^*) identique à l'antigène X à doser, en quantité fixe et très faible.
- Compétition entre l'Ag marqué et l'Ag non marqué à doser : les complexes Ag° -Ac et Ag^* -Ac se forment selon la loi d'action de masse
- Lavage pour éliminer les réactifs non fixés et séparer phase libre et liée du marqueur
- Mesure du signal final fixé sur le support qui est inverse de la quantité d'Ag à doser fixé, par référence à une courbe d'étalonnage
- en phase solide, Ac est fixé sur un support solide ; un simple lavage suffit pour séparer phase libre et liée du marqueur.

Principe : Quantité fixe d'Ag marqué ●
 Quantité fixe d'Ac spécifique U
 Ag à doser non marqué (quantité variable, inconnue) ●
 Lavage
 Mesure du signal fixé



5.3 Analyse immunométrique

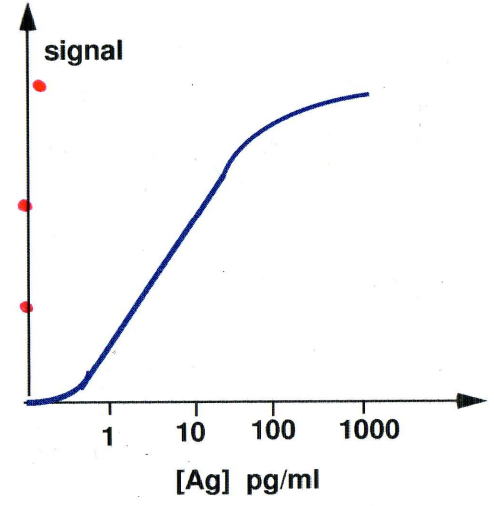
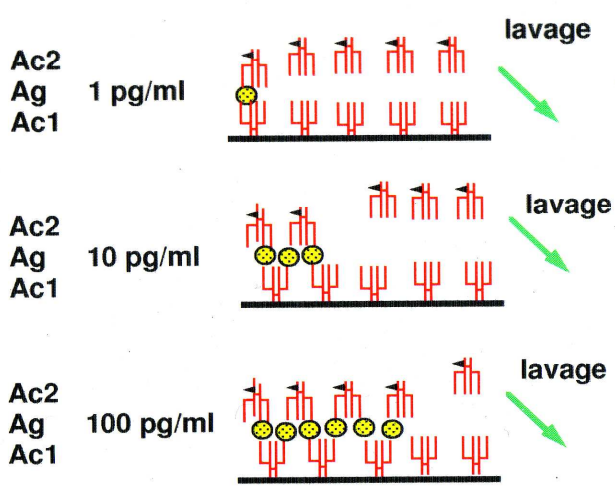
On met en jeu un excès d'anticorps.

Basée sur protocole dit "sandwich" ou "à deux sites"

La réaction sera totale (et non à l'équilibre). Ce sont les molécules d'anticorps qui sont marquées (sauf exception).

Après des lavages, le signal fixé est mesuré, il est proportionnel à la concentration d'Ag à doser par référence à une courbe d'étalonnage.

Principe : Ac1 en excès adsorbé sur support U
 Ag à doser ●
 Lavage
 Addition en excès d'un 2ème Ac2 marqué U
 Lavage
 Lecture du signal



C) SENSIBILITE DES TESTS

TABLEAU 6.3 Sensibilité
des divers dosages immunologiques

Dosage	Sensibilité* (μg Anticorps/mL)
Réaction de précipitation en milieu liquide	20-200
Réactions de précipitation en gels	
Immunodiffusion radiale de Mancini	10-50
Immunodiffusion double d'Ouchterlony	20-200
Immunoélectrophorèse	20-200
Électrophorèse en fusée	2
Réactions d'agglutination	
Directes	0,3
Agglutination passive	0,006-0,06
Inhibition de l'agglutination	0,006-0,06
Dosage radio-immunologique	0,0006-0,006
ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	< 0,0001-0,01
ELISA utilisant la chimioluminescence	< 0,0001-0,01
Immunofluorescence	1,0
Cytométrie en flux	0,06-0,006

* La sensibilité dépend de l'affinité de l'anticorps, ainsi que de la densité et de la distribution de l'épitope.

Source : Adapté de NR Rose et al., eds., 1986 et 1997, eds., *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

D) Application en TP

1- ETUDE DU COMPLEMENT SERIQUE

Détermination du CH50 (complément hémolytique 50%)

= test hémolytique qui explore l'activité fonctionnelle de la voie classique et de la voie finale commune.

L'unité CH50 est la plus petite quantité de sérum capable d'entraîner la lyse de 50% d'un nombre donné de globules rouges de mouton, sensibilisés de façon optimale par des hétéro-anticorps spécifiques, dans un système où sont maintenus constants le volume réactionnel, la température, la concentration ionique et le temps de réaction.

Réactifs

- Tampon VCM (Véronal, Magnésium, Calcium) pH 7.2
- Hématies de mouton à 1% dans tampon (GRM)
- Sérum de lapin anti-globules rouges de mouton à 0,5% (= « sérum hémolytique » = SH)
- Sérum à étudier dilué au 1/10

Réaction

1. Identifier le premier tube avec vos initiales
2. Mélanger à parties égales les globules rouges de mouton et le sérum hémolytique, incuber 15 minutes à l'étuve à 37°C.
3. Les globules rouges sont ainsi « sensibilisés » c'est - à- dire recouverts d'anticorps spécifiques.
4. Répartir les différents réactifs dans 8 tubes à hémolyse selon le tableau suivant :

<i>tubes</i>	1	2	3	4	5	6	7	8
Sérum 1/10 (ml)	0,02	0,05	0,08	0,1	0,15	0,2		
Tampon (ml)	1,98	1,95	1,92	1,9	1,85	1,8	2	2,5 eau dist.
GRM+ SH (ml)	1	1	1	1	1	1	1	0,5

Témoin GR sens	Témoin Hémolyse 50% des GR
-------------------	----------------------------------

5. Mettre les tubes à l'étuve à 37°C pendant 1 heure
6. Laisser les tubes à 4°C jusqu'au lendemain

Lecture

Comparer la couleur du surnageant avec celle du témoin 50%.

2- AGGLUTINATION PASSIVE

Hémagglutination passive = agglutination d'hématies sensibilisées

TPHA (= *Treponema Pallidum* hemagglutination Assay) = sérodiagnostic de la syphilis

L'antigène est un extrait de *Treponema pallidum* fixé sur des hématies de mouton tannées et formolées. Lorsque cet antigène particulaire est mis en présence d'un sérum contenant l'anticorps anti-tréponémique homologue on observe l'agglutination des hématies par formation d'immun complexes (hématies sensibilisées - Ac)

Les agglutination non spécifiques sont détectées en mettant parallèlement le sérum à étudier en contact avec des hématies de même origine mais non sensibilisées.

Réactifs

- 2 sérums à étudier
- Tampon de dilution des sérums (dont les composants permettent d'adsorber les agglutinines naturelles anti-GR de mouton)
- Suspension d'hématies de mouton sensibilisées avec l'Ag tréponémique
- Suspension d'hématies de mouton non sensibilisées
- Microplaque à cupules fond en U

Mode opératoire


(Pour chaque sérum utiliser 3 cupules)


1. Diluer le sérum à étudier dans le tampon (cupule 1) comme indiqué sur le tableau
2. Distribuer 25 µl de cette dilution dans les cupules 2 et 3
3. Ajouter 75 µl de suspension d'hématies sensibilisées dans la cupule 2 et 75 µl de suspension d'hématies non sensibilisées dans la cupule 3.

cupule	1	2	3
Tampon	200 µl		
Sérum µl	25 µl		
		25 µl	25 µl
Hématies sensibilisées		75 µl	
Hématies non sens.			75 µl

4. Laisser la plaque sur la paillasse à l'abri de toutes vibrations pendant au moins 2 heures (recouverte d'un feuillet de plastique).
5. La lecture peut se faire le lendemain (garder à 4°C).

Lecture

Les hématies agglutinées forment un voile au fond de la cupule  = réaction positive donc présence d'Ac anti-tréponème dans le sérum.

Les hématies non agglutinées sédimentent en formant un point au fond de la cupule  = réaction négative donc absence d'Ac.

La cupule contenant «sérum + hématies non sens.» (= témoin sérum) ne doit pas présenter d'agglutination.

3- NEUTRALISATION IMMUNOLOGIQUE

Exemple : Neutralisation d'une activité enzymatique

Les enzymes sont, de part leur nature protéique, de bons antigènes.

Il est fréquent que des sites, proches du site d'action enzymatique, soient reconnus comme antigéniques. La fixation de l'anticorps correspondant interfère alors avec le fonctionnement enzymatique, masquant plus ou moins complètement le site enzymatique et empêchant l'accès du substrat à ce site. Il y a ainsi **neutralisation de l'action enzymatique** de la molécule par l'anticorps dirigé contre cette enzyme.

Application : dosage des antistreptolysines dans un sérum (ASLO)

La streptolysine extraite de certaines souches de streptocoques a la propriété d'hémolyser les hématies de lapin. Cet effet biologique est neutralisé par les anticorps antistreptolysine présents dans le sérum de patients développant un syndrome post-streptococcique A, C ou G. Ceci permet donc la détection et le dosage de ces anticorps en utilisant une streptolysine titrée.

Réactifs

- Sérum à étudier dilué au 1/5
- Tampon ASLO
- Streptolysine titrée
- Suspension d'hématies de lapin

Mode opératoire

- **Microméthode**

La réaction s'effectue en plaque de microtitration
Les volumes sont exprimés en **microlitres (µl)**

Préparer, en même temps, dans des cupules, à la suite de votre réaction, les témoins indispensables à la bonne interprétation de cette réaction.

1. Répartir 25 µl de tampon dans les cupules 2 à 6.
2. Déposer 25 µl de sérum dilué au 1/5 dans les cupules 1 et 2 ; mélanger le contenu de la cupule 2 par aspirations et refoulements (ATTENTION – NE PAS FAIRE DE BULLES !)
3. Reprendre 25 µl du mélange et le déposer dans la cupule 3 et ainsi de suite jusqu'à la cupule 6.
4. Ajouter 25 µl de streptolysine dans chaque cupule.
5. Laisser 10 minutes à la température du laboratoire.
6. Ajouter 25 µl de suspension d'hématies de lapin dans chaque cupule (**au préalable bien remettre en suspension les hématies dans le tube**)
7. Mettre la plaque 10 minutes à l'étuve à 37°C recouverte d'un feuillet plastique.
8. Laisser la plaque sur la paillasse jusqu'à l'après-midi.

cupules	1	2	3	4	5	6
Tampon		25	25	25	25	25
sérum au 1/5	25	25	25	25	25	25
streptolysine	25	25	25	25	25	25
Agiter et laisser 10 minutes à température du laboratoire						
GR de lapin	25	25	25	25	25	25
mettre la plaque 10' à l'étuve à 37° C (recouverte d'un feuillet plastique)						

Lecture

Noter la cupule contenant la plus grande dilution du sérum présentant une hémolyse nulle des GR de lapin (cupule dont le surnageant est incolore avec un culot d'hématies sédimentées). Dans cette cupule, la streptolysine est entièrement neutralisée par les anticorps anti-streptolysine présents dans le sérum.

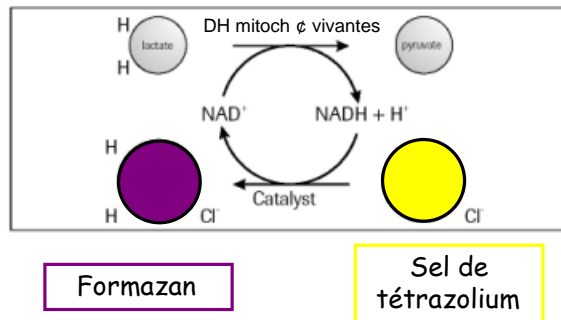
IV) Bioassay sur cellules WEHI

Ce test permet de mesurer la quantité de TNF (Tumor Necrosis Factor) libéré dans le surnageant de culture de cellules immunocompétentes après leur activation (exemple : lymphocyte T CD8+ ayant reconnu leur cellule cible).

Le TNF provoque la lyse de cellules de fibrosarcome murin, hypersensibles au TNF (**cellules Wehi**) : lorsque les surnageants de culture de cellules sont mis en présence de cellules Wehi, celles-ci sont lysées de façon proportionnelle à la dose de TNF présente dans les surnageants.

La lyse des cellules est mesurée par un test colorimétrique au MTT-tétrazolium : les déshydrogénases (DH) des cellules vivantes transforment le MTT (colorant jaune soluble) en un produit violet insoluble, le formazan qui peut être quantifié par mesure de l'absorbance.

Principe du test colorimétrique à base de MTT.

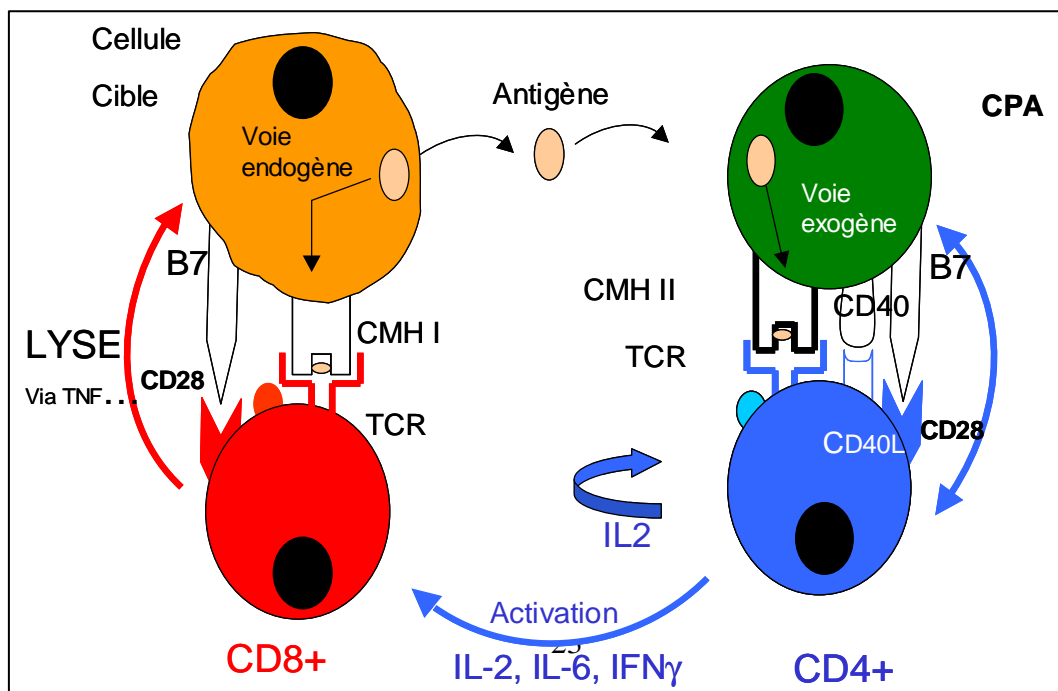


Principe du dosage :

1. 30,000 cellules Wehi sont déposées par puits en microplaque fond plat dans 50 μ l de milieu + actinomycine D (un anti-mitotique).
2. Deux heures après, 50 μ l de surnageant ou de gamme sont ajoutés.
3. Les plaques sont incubées pendant 20h à 37°C.
4. 50 μ l de MTT à 2,5 mg/ml dans du PBS sont ajoutés pendant 4h à 37°C.
5. 100 μ l de solution de lyse sont ajoutés.
6. La lecture de l'absorbance est réalisée après 3h à 550 nm

Le % de cellules mortes est : $1 - (\text{Absorbance}_{\text{ech}} / \text{Absorbance}_{\text{milieu seul}})$

RAPPEL : Schéma général de présentation de l'Ag aux lymphocytes T

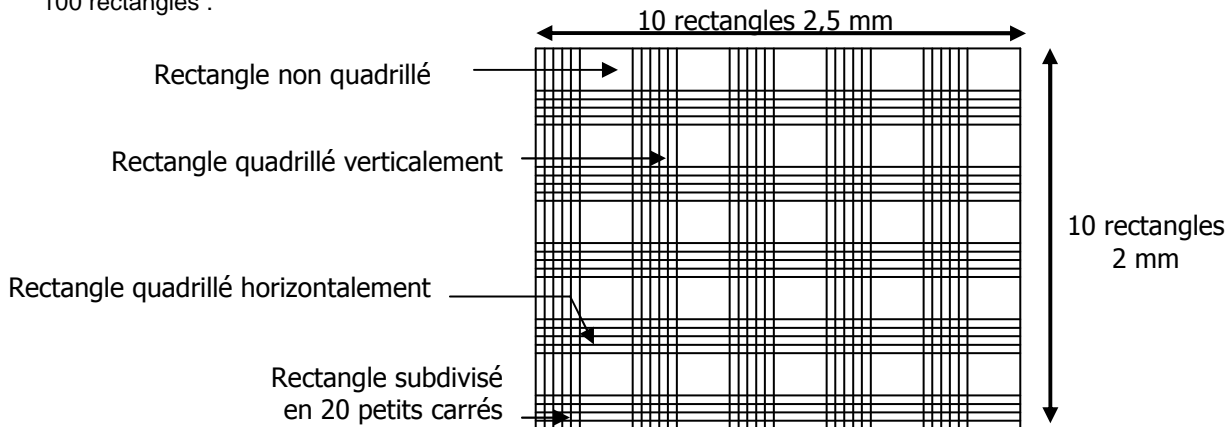


OBJECTIF : détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis

La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en **nombre de cellules par millilitre**.

La numération cellulaire est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (ou cellule de numération) : lame porte objet dans laquelle est creusée une **chambre de comptage de volume connu**. Il s'agit donc d'une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage.

La cellule de Malassez, cellule de numération la plus courante, possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :



Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage. Le volume de comptage est déterminé par :

- la surface du quadrillage gravé sur la lame (cf mesure)
- la profondeur de la chambre (0,2 mm).

Réactifs

- suspension cellulaire
- cellule de Malassez

Mode opératoire

1. Remplissage de la cellule de numération

- **Humecter les deux plateaux latéraux.** Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance. Placer la cellule de comptage sur une surface plane.

- **Homogénéiser la suspension cellulaire**, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plateforme centrale quadrillée.

→ Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles.

- Après utilisation, rincer la lame porte-objet et la lamelle avec de l'eau distillée et essuyer avec du papier (sans frotter, en particulier au niveau du quadrillage).

2. Numération

- **Observer à l'objectif x10** pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer). **Observer ensuite à l'objectif x40** pour réaliser le comptage.

- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

Remarque : pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

3. Calculer la concentration cellulaire (en cellules/ml)