

La réaction antigène - anticorps et ses applications

1. Généralités

1.1. Les antigènes

- antigène = toute substance capable de se lier spécifiquement à un anticorps ou TCR.
- immunogène = substance qui provoque une réponse immunitaire spécifique quand elle est introduite dans un organisme
- tous les immunogènes sont des antigènes mais pas l'inverse (ex : haptènes)
- pour rendre un haptène immunogène, il faut le fixer sur une protéine porteuse.
- épitope = structure reconnue, qui se lie au paratope de l'anticorps. Une protéine peut contenir plusieurs dizaines d'épitopes identiques, ou le plus souvent différents. Les épitopes peuvent être séquentiels (ils possèdent des AA à qui se suivent la structure primaire), ou conformationnel (les AA ne se suivent pas dans la structure primaire mais sont proches dans l'espace).

1.2. Les anticorps

- **isotypes** = définissent les classes et sous classes :
 - IgG (I, II, III, IV)
 - Ig A (I, II)
 - Ig M, Ig D, Ig E
 - Ig kappa, Ig lambda
- **structure** : différents domaines d'environ 110 AA. Les 2 chaînes L et H sont identiques 2 à 2.
- **domaines constants** : propriétés effectrices de l'anticorps :
 - fixation du complément (IgG et Ig M)
 - cytophilie : un récepteur pour le fragment percé des IgG sur les cellules
 - passage transplacentaire (IgG : immunisation passive du nouveau-né)
- **paratope** = structure qui se lie à l'épitope de l'antigène
- **sérum polyclonal** (= sérum et humain = immun serum = anticorps polyclonal) :
 - c'est un sérum qui contient un mélange d'anticorps provenant de LB différents.
 - obtention : on injecte un antigène avec 3 épitopes à un lapin ; il produit 3 LB différents reconnaissant les 3 épitopes ; différenciation en 3 plasmocytes différents et donc sécrétion de 3 anticorps. Ces anticorps reconnaissent le même antigène mais avec des spécificités, des affinités différentes selon les épitopes ; ils peuvent aussi avoir des isotypes différents.
- **anticorps monoclonal** : c'est un anticorps provenant d'un seul clone de LB stimulé
 - obtention : technique in-vitro d'hybridation lymphocytaire : immunisation d'une souris avec un antigène donc production de LB qui se différencient en plasmocytes. On récupère la rate de cette souris. On immortalise les cellules par fusion avec des cellules myéломateuses (cellule tumorale provenant de la moelle osseuse) = hybridomes. On sépare ces cellules.

L'anticorps monoclonal produit est homogène : il est de même isotype, même allotype, même idiotype (spécificité).

2. aspect théorique de la réaction antigène - anticorps

2.1. Caractéristiques de la liaison antigène - anticorps

- association de 2 molécules entre le paratope et l'épitope. Cette association nécessite une bonne complémentarité stérique entre les 2 sites réactifs.
- c'est une réaction exothermique, spécifique et réversible.
- la loi d'action de masse détermine la constante d'équilibre $K = \text{affinité intrinsèque}$.

2.2. Nature des liaisons

- faible énergie
- dépendent de la complémentarité entre le paratope et l'épitope
- non covalentes
- **forces de van der Waals :**
 - les plus faibles
 - dues au mouvement des électrons dans la molécule : formation de dipôles SS
- **forces électrostatiques = liaisons ioniques :**
 - entre 2 groupements ioniques
 - 2 à 5 kcal/mol
- **liaison hydrogène :**
 - entre atomes électropositifs et électronégatifs
 - faibles
- **liaisons hydrophobes :**
 - entre groupements polaires ou hydrophobes
 - faibles
- il y a donc des forces d'attraction et de répulsion entre le paratope et l'épitope. L'énergie de liaison est élevée entre le paratope et l'épitope car toutes ces liaisons sont de faible énergie mais sont très nombreuses.
- l'énergie dépend de la complémentarité entre les 2 sites.
- quand on mesure l'affinité d'un anticorps pour son antigène, on mesure la somme des forces attractives et répulsives.

2.3. Mesure de l'affinité intrinsèque d'un anticorps

- technique de dialyse à l'équilibre :
 - la différence de niveau à l'équilibre correspond à la quantité d'haptène liée à l'anticorps
- à partir des données expérimentales on fait la représentation de Scatchard qui donne l'affinité de l'anticorps ainsi que sa valence (nombre de paratopes par molécule)
 - lorsque la moitié des sites d'anticorps sont liés à l'haptène : $K = \text{affinité} = 1/[Ag]$.
 - + la valeur de K est grande, plus l'anticorps est affin et plus il détecte de faibles concentrations d'haptène.

2.4. Avidité

- $K =$ mesure théorique de l'affinité intrinsèque d'un paratope pour l'épitope.
- dans la réalité l'anticorps est au moins bivalent et les antigènes sont multivalents
- l'interaction de l'anticorps avec l'antigène au niveau d'un seul site augmente la probabilité de rencontre au niveau du 2ème site
- l'intensité des interactions = avidité = affinité fonctionnelle.
- la somme théorique entre les affinités intrinsèques de chaque site est très inférieure à l'affinité réelle.
- la multivalence augmente d'un facteur 10 puissance 3 pour 1 IgG et de 10 puissance 7 pour Ig M l'énergie de liaison pour un même épitope. Pour une affinité intrinsèque égale (10 puissance 4) l'Ig M est + avide que l'IgG.
- l'avidité conditionne la rapidité de formation d'un complexe antigène - anticorps. Elle dépend de l'affinité intrinsèque, de la valence de l'anticorps et de l'antigène, de conditions physicochimiques : température, pH, force ionique.
- au cours d'immunisations répétées, l'affinité et l'avidité des anticorps augmentent car il y a une sélection des anticorps ayant des paratopes de plus en plus complémentaires des épitopes.

2.5. Spécificité et réactions croisées

Cf. poly

- les réactions croisées s'observent si 2 antigènes différents ont des épitopes communs, ou si l'un des anticorps du sérum immun se lie à un épitope ayant une structure chimique proche de l'épitope original

2.6. Applications des réactions antigène - anticorps

2.6.1. Diagnostic des maladies infectieuses (bactéries, virus, parasites, champignons)

- diagnostic indirect = recherche d'anticorps spécifiques dans un sérum
- diagnostic direct = recherche de l'agent infectieux dans différents liquides biologiques ou sur des biopsies.

2.6.2. Diagnostic de pathologies affectant le système immunitaire

= déficit immunitaire, maladie auto-immunes (ex : polyarthrite rhumatoïde), hypersensibilité (= allergie), syndromes prolifératifs (ex : lymphomes)

2.6.3. Dosage quantitatif de molécules

Hormones, vitamines, protéines inflammatoires, médicaments etc. que

3. Les réactions de précipitation

3.1. Généralités

- c'est une réaction qui apparaît dans un milieu liquide ou gélifié entre un antigène soluble et 1 anticorps précipitant (Ig M, IgG).
- le précipité est dû à la formation d'un réseau macromoléculaire tridimensionnel
- l'anticorps doit être au moins bivalent (2 paratopes) : Fab ne donne pas de précipité ; seuls les sérums polyclonaux donnent des réactions de précipitation.
- l'antigène doit être au moins bivalent (2 épitopes) : un haptène ne donne pas de réactions (un seul épitope) ; mais si l'haptène est couplé à une protéine porteuse, ça marche.

3.2. Précipitation en milieu liquide : méthode de Heidelberger et Kendall (1929)

Cf. poly

- C'est la première technique ayant permis de quantifier une réponse en anticorps
- À partir de ces données expérimentales, on a déterminé une courbe de précipitation. Il en existe 2 types :
 - **courbe de type lapin** : 3 zones :
 - *zone 1* : excès d'anticorps. Les complexes immuns sont de petite taille. Il existe des anticorps libre dans le surnageant.
 - *zone 2* : zone d'équivalence. Tous les anticorps spécifiques sont complexés à l'antigène. Il n'existe pas d'anticorps libres ou d'antigènes libres dans le surnageant.
 - *Zone 3* : zone d'excès d'antigène. La taille des complexes immuns diminue et le précipité se redissout. Il existe des antigènes libres dans le surnageant.
 - **courbe de type cheval** : 3 zones + une prézone = prozone.

La prozone : dans les premiers tubes pas de précipité, car les anticorps ne sont pas précipitants. Cette prozone est due à des anticorps très affins qui ne précipitent pas. Il se forme des complexes immuns solubles.

NB : la prozone est observable pour toutes les réactions antigène-anticorps. Il faut donc faire attention pour éviter les faux négatifs.

3.3. immunonéphélémétrie et immunoturbidimétrie

- c'est une technique quantitative de dosage d'un Ag ou d'un Ac
- un des réactifs est à concentration constante : antigène constant pour un dosage d'anticorps et inversement.
- on obtient la concentration de la molécule à doser à partir d'une gamme d'étalonnage
- technique utilisable pour des molécules à des concentrations du mg/l.

Si la concentration d'anticorps correspond à celle d'antigène : apparition d'un trouble :

- turbidimétrie : mesure du rayonnement absorbé
- néphélémétrie : mesure du rayonnement diffusé (plus sensible).

3.4. Immuno-électrophorèse.

- technique qualitative en 2 temps.
- exemple : immuno-électrophorèse de protéines sériques
 - *1er temps* : séparation des protéines sous l'action du champ électrique. Les protéines sont séparées selon leur charge et et leur PM
 - *2ème temps* : révélation des protéines séparées par immuno-diffusion avec un sérum animal immunisé polyspécifique ou monospécifique.

Cf. schéma poly.

NB : application pour la recherche d'un déficit en anticorps.

4. Les réactions d'agglutination

4.1. Aspects théoriques

- interaction entre un anticorps agglutinant spécifique (IgM, IgG) et un antigène particulaire.
- on obtient des agglutinats visibles à l'oeil nu.
- ex : hématies en milieu isotonique et neutre.

La particule = globule rouge , chargé moins. Le potentiel zéta = la différence de potentiel entre la particule et le milieu. Ce potentiel = - 16 mV. Il permet aux hématies de rester en suspension. S'il est modifié (< 7 mV) les hématies s'agglutinent. Les anticorps spécifiques de l'antigène particulaire modifient l'état électrique de cette particule, le potentiel zéta augmente : agglutination.

- l'antigène et particulaire et multivalence
- l'anticorps est au moins bivalent (les IgM sont plus agglutinant que les IgG)
- **agglutination active** : l'antigène pour lequel on recherche les anticorps est déjà particulaire
- **agglutination passive** : l'antigène est solubles. on le fixe artificiellement sur une particule.
- agglutination directe si l'anticorps est directement agglutinant (IgM)
- agglutination indirecte si l'anticorps n'est pas agglutinant (certaines IgG) . On utilise alors un 2ème réactif = anticorps anti globulines qui provoque l'agglutination.

4.2. Exemple d'une agglutination directe et active : les groupes sanguins

Cf. poly

Épreuve de Beth-Vincent

Recherche des Ag portés par les hématies.

4.3. Exemple d'une agglutination indirecte

Recherche d'Ac non agglutinants (Ac anti Rh) = test de Coombs indirect.

Cf. poly

- Réaction en 2 temps :
 - Réactif = GR Rh+, en présence de sérum (si Ac anti Rh : fixation)
 - ajout d'une antiglobuline (anti IgG humaine) : si sérum + : agglutination.

4.4. Exemple d'une agglutination passive

Recherche d'Ac agglutinants anti-toxoplasme dans un sérum de malade

- 2 temps :
 - Ag soluble (toxoplasme) : fixation sur billes de latex (= "sensibilisation des billes de latex")
 - Ag particulaire + sérum anti Toxoplasme : agglutination

NB : les réactions d'agglutination sont plus sensibles que les réactions de précipitation.

5. Réactions utilisant des réactifs radiomarqués

- cela permet d'augmenter la sensibilité du dosage (ng/l)
- les molécules sont marquées par le tritium ou par ^{125}I

5.1. Dosage de radio immunologique en phase solide = en phase hétérogène.

- dosage d'un antigène soluble par une technique de compétition
- la réactions antigène-anticorps étant réversible, un antigène marqué combiné à son anticorps spécifique peut être déplacé de l'anticorps par un excès d'antigène libre non marqué.

Cf. poly

5.2. Dosage radioimmunométrique

- l'antigène soluble doit posséder 2 épitopes suffisamment éloignés sur la molécule
- ex : dosage de l'hormone de croissance dans sérum

Cf. poly

- plusieurs temps

6. Réactions utilisant des réactifs marquées par une enzyme

- ELISA
- EIA
 - on fixe sur l'anticorps 1 enzyme = anticorps marqué ou conjugué (l'enzyme est fixée au niveau du Fc) : peroxydase, phosphatase alcaline.
 - l'anticorps marqué est détecté par addition du substrat de l'enzyme. On obtient un produit coloré et on mesure la coloration.
 - applications très nombreuses : dosage qualitatif ou quantitatif d'un antigène ou d'un anticorps spécifique en solution.

6.1. ELISA indirect

Recherche ou dosage d'un anticorps spécifique

Cf. poly + TP

6.2. ELISA sandwich

Recherche ou dosage de l'antigène en solution

Cf. poly

Ex : dosage de l'EPO

6.3. Technique immunohistochimique ou immunocytochimique

- recherche d'un particulaire
- coupes de tissus ou de cellules fixées sur une lame

Cf. poly

- ex : mise en évidence d'antigènes viraux au niveau de coupes tissulaires

6.4. Le système de biotine - avidine

- système qui permet d'amplifier le signal enzymatique : augmentation du seuil de détection d'un antigène ou d'un anticorps
- biotine : vitamine H = petite molécule
- avidine : glycoprotéine extraite du blanc d'oeuf
- la biotine a une affinité élevée pour l'avidine.
- l'avidine possède 4 sites de fixation pour la biotine (interaction non covalente)
- on utilise des anticorps spécifiques marqués à la biotine (Ac biotinylés). Les anticorps sont des Ac anti isotypes
- on fixe sur l'avidine plusieurs enzymes ou plusieurs fluorochromes.

6.5. Technique d'immunotransfert = immunoempreinte.

= Western Blot

- cet éveil unique permettait la mise en évidence dans un sérum, de plusieurs anticorps spécifiques et différents véhicules vis-à-vis des différentes protéines d'un même antigène.
- technique qualitative
- plusieurs étapes : Cf. poly

Ex : recherche d'Ac anti VIH dans un sérum. Test de confirmation d'une infection au VIH.

7. Réactions utilisant des réactifs marqués par des fluorochromes

7.1. Les fluorochromes.

- molécules qui absorbent de l'énergie à une longueur d'onde λ_1 et qui la réémettent à $\lambda_2 > \lambda_1$.
- exemples :
 - isothiocyanate de fluorescéine (FITC) : fluo verte
 - rhodamine : fluo orangée
 - phycoérythrine (PE) : fluo rouge
- les molécules utilisées pour marquer des anticorps sont fixées par des liaisons covalentes

7.2. Immunofluorescence directe

- mise en évidence d'un antigène porté par une particule
- coupe de tissu, frottis ou cellules en suspension
- on utilise un Ac spécifique fluorescent
- Cf. schéma poly

7.3. Immunofluorescence indirecte

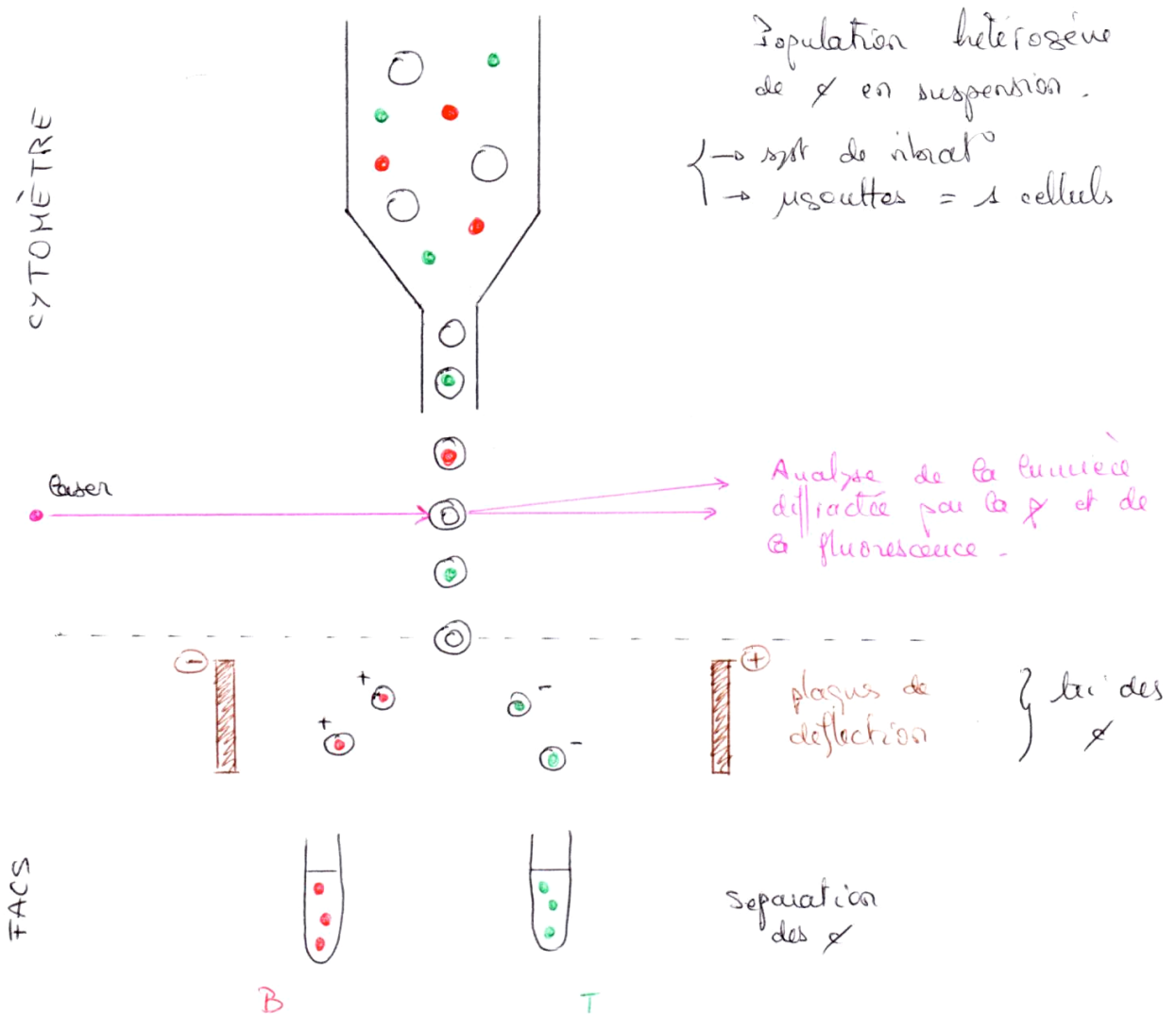
- mise en évidence soit d'un antigène porté par une particule, soit d'un anticorps spécifique dans un sérum
- dans cette technique le premier Ac spécifique de l'Ag n'est pas fluorescent. On utilise un 2ème Ac anti-isotype marqué par le fluorochrome.
- Cf. schéma poly

7.4. Double immunofluorescence

- mise en évidence de 2 Ag différents portés par une même cellule ou de cellules différentes
- utilisation de 2 Ac spécifiques de chaque Ag et marqués par des fluorochromes différents
- ex : dénombrement des LT de LB au niveau du sang périphérique
- Cf. poly.

7.5. Analyse de la fluorescence

- utilise un microscope optique équipé d'un système UV
- cytomètre de flux
- FACS = Fluorescence Activated Cell Sorter (pour trier des cellules et les séparer)



8. Réactions utilisant le complément (C')

- C' = 30 à 40 protéines sériques
- activation du C' par 2 voies principales :
 - **voie classique : spécifique.** Nécessite la formation d'un complexe immunitaire antigène-anticorps.
 - **voie alterne : non spécifique.** Activée par la paroi des micro-organismes.
- protéines du C' thermolabiles : inactivées par chauffage à 56° pendant 30 minutes
- C' non spécifique d'espèce
- dans les réactions antigène-anticorps utilisant le complément, on utilise la voie classique d'activation.
- Ac utilisés fixent le complément = IgM et IgG.
- dans ces réactions, le complément est utilisé comme réactif.

8.1. Réaction de cytolysse médiée par le complément

Ex : typage HLA (molécules de classe I ou II)

Cf. poly

8.2. Réaction de fixation du C'

Ex : recherche d'anticorps antigrippaux (IgM, IgG)

Cf. poly.