

FACULTE DE PHARMACIE DE LYON

I.S.P.B.

**TRAVAUX PRATIQUES
D'IMMUNOLOGIE**

3^{ème} ANNEE

C.M. VEYSSEYRE

Laboratoire d'Immunologie (Pr. J.P. Bringuier)

1993-1994

DATE	GROUPE 1	GROUPE 2	GROUPE 3	GROUPE 4	GROUPE 5	GROUPE 6	GROUPE 7	GROUPE 8
26.10.93	ED 1		ED 1					
27.10.93	EDP		EDP					
28.10.93					ED 1		ED 1	
29.10.93					EDP		EDP	
2.11.93		ED 1		ED 1				
3.11.93		EDP		EDP				
4.11.93						ED 1		ED 1
5.11.93						EDP		EDP
16.11.93		TP1		TP1				
17.11.93		TP2		TP2				
18.11.93						TP1		TP1
19.11.93						TP2		TP2
23.11.93	TP1		TP1					
24.11.93	TP2		TP2					
25.11.93					TP1		TP1	
26.11.93					TP2		TP2	
30.11.93		ED2		ED2				
1.12.93		ED3		ED3				
2.12.93						ED2		ED2
3.12.93						ED3		ED3
7.12.93	ED2		ED2					
8.12.93	ED3		ED3					
9.12.93					ED2		ED2	
10.12.93					ED3		ED3	
14.12.93		TPEAO		TPEAO				
15.12.93		ED4		ED4				
16.12.93						TPEAO		TPEAO
17.12.93						ED4		ED4
4.01.94	TPEAO		TPEAO					
5.01.94	ED4		ED4					
6.01.94					TPEAO		TPEAO	
7.01.94					ED4		ED4	
11.01.94	R			I	S			N
12.01.94		E	V			I	O	
13.01.94		E	V			I	O	
14.01.94	R			I	S			N

SOMMAIRE

LES REACTIONS Ag-Ac: LA THEORIE

GENERALITES
AGGLUTINATION
PRECIPITATION
NEUTRALISATION
FIXATION DU COMPLEMENT
IMMUNOFLUORESCENCE
RADIOIMMUNOLOGIE
IMMUNOENZYMOLOGIE

LES REACTIONS Ag-Ac: LA PRATIQUE

ETUDE DES Ig: PROTEINES SERIQUES

DOSAGE PONDERAL DES CLASSES
IDENTIFICATION D'UN Ig MONOCLONALE

ETUDE DES Ig: ANTICORPS

SEROLOGIES BACTERIENNES ET VIRALES:

Recherche des ASLO

Western-Blot HIV

SEROLOGIES AUTO-IMMUNES

Recherche des Facteurs Rhumatoïdes

Recherche des Ac antinucléaires

Recherches des Ac anti DNA

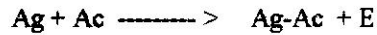
LEXIQUE

LES REACTIONS Ag-Ac: LA THEORIE

1-GENERALITES

*Caractéristiques des réactions Ag-Ac :

spécifiques - réversibles - exothermiques



$$K = \frac{(\text{Ag-Ac})}{(\text{Ag}) \cdot (\text{Ac})}$$

*Spécificité :

- épitope ----- > paratope
- exploration d'un Ag si Ac spécifique disponible
- exploration d'un Ac si Ag purifié disponible
- réaction croisée
- faux positifs
- Ac monoclonaux ou Ac polyclonaux
- valence des Ac
- Fab, F(a b)2, Fab'
- affinité, avidité

*Réversibilité :

- température, acidité
- élution

*Exothermie :

- forces d'attraction de faible énergie -- -> 10 Kcal / mol.
- forces électrostatiques (COO⁻ , NH3⁺)
- forces de Van Der Waals (mouvement d'e⁻ entre les molécules)
- forces hydrophobes (entre A.A. aromatiques)
- liaisons hydrogènes (H⁺, N⁻ et O⁻)
- Ac froids E > 30 Kcal / mol.
- Ac chauds E < 10 Kcal / mol.

*Classification :

- réactions in vivo
- réactions in vitro: ° observation directe du phénomène:
 - .agglutination
 - .précipitation

Technique	Concentration minimale de réactif décelable en mg par ml de sérum
Précipitation en milieu liquide	20
Précipitation en milieu gélifié :	
Diffusion simple	10
Diffusion double	3
Diffusion radiale	3
Immuno-électrophorèse	50
Hémolyse directe	1
Fixation du complément	0,1
Immunofluorescence	0,1
Hémagglutination directe passive	0,5 0,001
Agglutination bactérienne	0,01
Western blot	0,01
Dosage radio-immunologique	0,00001
Dosage immunoenzymologique	0,00001

hémolyse

° observation indirecte du phénomène grâce à un marqueur:

- . IF
- . RIA
- . ELA

* Choix :

- nature de l'Ag: soluble ou particulaire
- concentration des réactifs: sensibilité (), faux négatifs
- spécificité
- matériel
- coût
- série ou coup par coup
- facilité
- rapidité
- nature du prélèvement
- Ig recherchées

2- AGGLUTINATION

2-1 Généralités :

- * Ag : particule, 1/10 à 1/100 de μ , nombreux épitopes de surface, bactéries, hématies, parasites, globules blancs, plaquettes, les virus sont exclus
- * Ac : Ig M de préférence car valence la plus élevée
- * Formation d'un réseau tridimensionnel ---> agglutinats visibles
- * Réaction n'obéissant pas aux lois stoechiométriques des réactions chimiques ordinaires
- * Facteurs non immunologiques :
 - . force ionique du milieu réactionnel, 0,15 M NaCl
 - . présence de macromolécules
 - . température, agitation
 - . traitement par des enzymes de la surface des particules
- * Sensibilité : de 0,5 à 0,01 mg / ml
- * Méthodes :
 - . qualitatives sur lame
 - . semi quantitatives (dilution), en tubes ou en microplaques
- * Lecture : oeil, loupe, miroir grossissant, microscope
- * Témoins :

- . témoins réactifs / Ag, sérum
- . témoins positifs
- . témoins négatifs

* Applications :

- . mise en évidence, dosage d'Ag
- . mise en évidence, dosage d'Ac

2-2 Agglutination directe :

* Ag : directement particulaire

* Schéma

* Applications :

- . détermination d'Ag:

groupage ABO (Beth Vincent)

sérotypage bactérien E.coli, Salmonella

- . détermination d'Ac:

groupage ABO (Simonin)

sérologies bactériennes: Widal Felix, Wright

sérologies parasitaires: toxoplasmose

hétéroAc: Paul Bunnell Davidsohn (P.B.D.)

2-3 Agglutination passive et passive reverse :

* passive = conditionnée = indirecte

* Ag : soluble rendu particulaire artificiellement => passive

Ac : fixés artificiellement sur un support ==> reverse

* Supports :

- . Hématies : fragiles --> formolées

Ag de surface --> absorption des sérums testés

humaines O RH + ou -, de mouton, de dinde

- . Latex : particules calibrées sans Ag de surface

- . Autres : charbon, bentonite ...

* Mode de fixation = sensibilisation :

- . simple contact

- . acide tannique

- . benzidine bisdiazotée, glutaraldéhyde, chlorure de Cr

- . immunologique

* Témoins :

- . particules sensibilisées et non sensibilisées

- . sérums à tester

* Schémas

* Applications :

. détermination d'Ac:

Facteurs Rhumatoïdes - FR -: Waaler Rose
Singer Plotz

Sérologie syphilitique: TPHA, Kline, VDRL

Ac anti thyroïde

. détermination d'Ag:

Sérotypage des Streptocoques

Recherche des PDF

Recherche de la CRP

2-4 Inhibition de l'agglutination :

* Recherche d'un Ag soluble qui empêchera l'apparition d'un système agglutinant utilisé comme révélateur de la réaction

* Schéma

* Applications :

. Recherche des substances H, A, B, Lea, Leb dans la salive

. Recherche des allotypes Km, Gm, Am

. **Diagnostic de la grossesse:** HCG (hormone gonadotrophine chorionique) sérique ou urinaire

2-5 Agglutination artificielle :

* En milieu macromoléculaire :

. Albumine humaine ou bovine (BSA), dextran, Ficoll

. **Groupe Rhésus standard**

* Par traitement enzymatique des hématies :

. Papaine, broméline, trypsine ...

Recherche des Ac irréguliers

* Tests à l'antiglobuline :

. **Tests de Coombs:**

direct ---> Ac déjà fixés sur une cellule

indirect ---> Ac libres dans le sérum

schémas

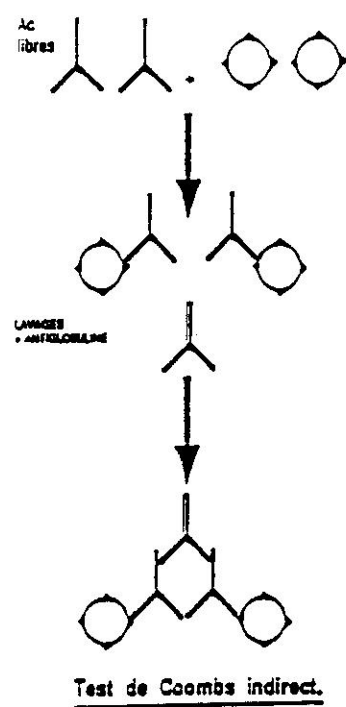
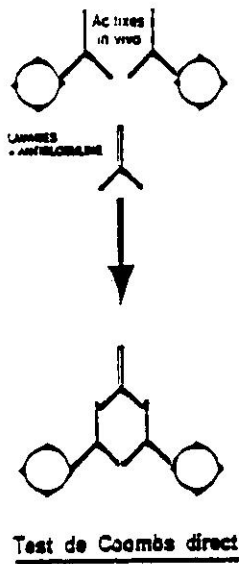
. Anti complément: anti C3d

. Applications: diagnostic des anémies hémolytiques auto immunes ou immuno allergiques

diagnostic d'une incompatibilité rhésus

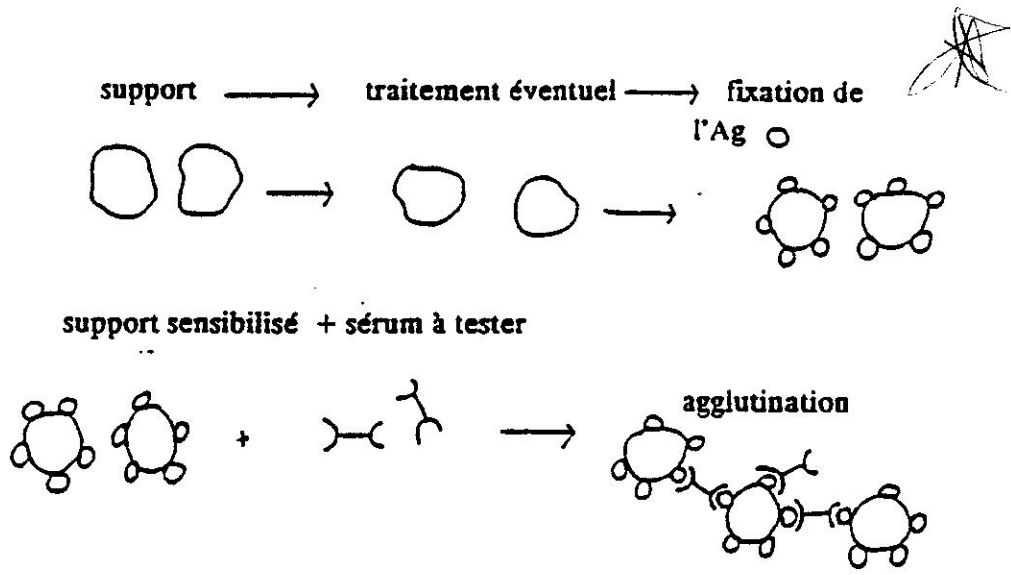
foeto-maternelle: Ac anti rhésus

. Recherche des Ac anti Lea, anti Jka, auto Ac anti P

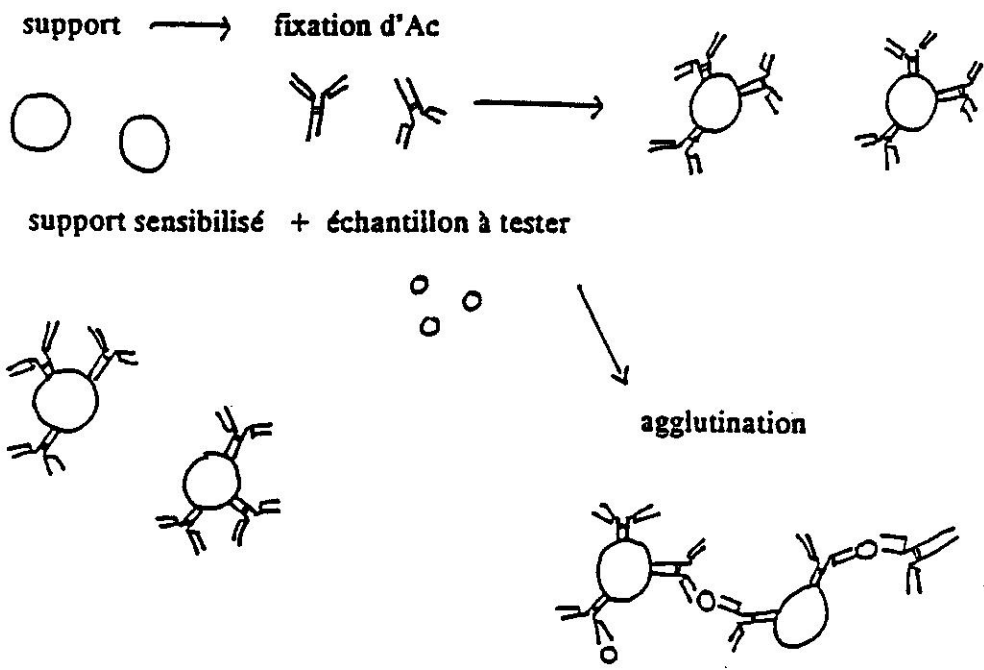


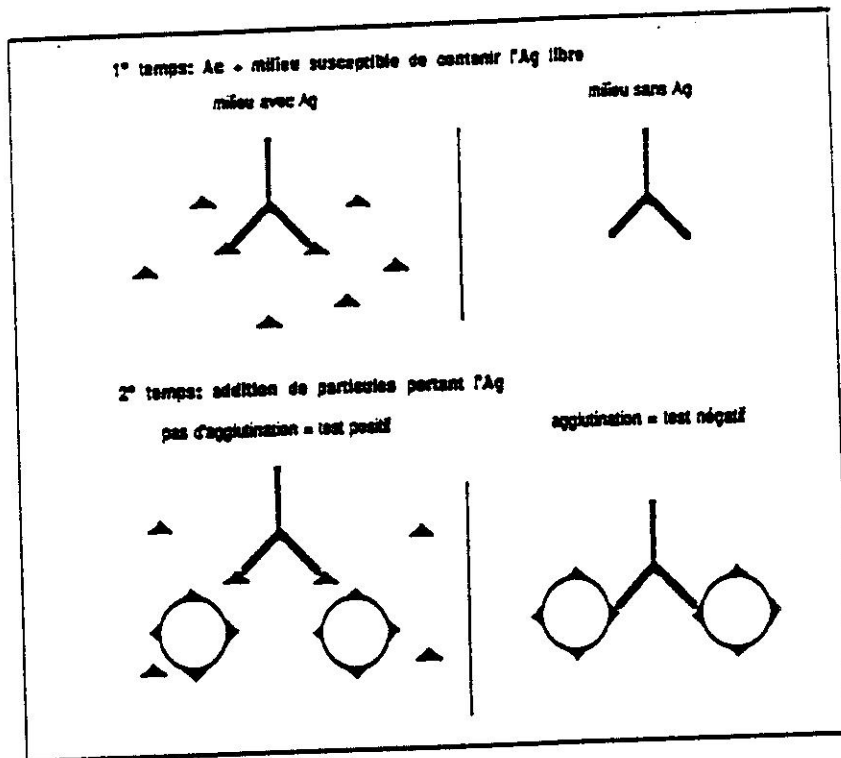
Mode de fixation	Support	Ag solubles
	GR	. Ag protéiques
		. Ag polysidiques
		. Haptènes
Absorption		
	Latex	.Ag protéiques
	Particules de charbon	.Ag cardio-lipidiques
Procédés chimiques:		
Acide tannique		
	GR	.Ag protéiques
Glutaraldéhyde		.Hormones
		.Acides nucléiques
Cr Cl2	Latex	.Haptènes
Immunologique	GR	.Ag protéiques

Réaction d'agglutination conditionnée pour la mise en évidence d'Ac.



Réaction d'agglutination conditionnée inverse - mise en évidence d'Ag.





Inhibition de l'agglutination Passive

2-6 Agglutination non immunologique :

- * Cas des virus possédant une hémagglutinine: Grippe, Rubéole, Adénovirus, Réovirus
- * Détergents, silice colloïdale ...
- * Sulfate de protamine, polybrène
- * Phytohémagglutinine, Concanavaline A

3-PRECIPITATION

3-1 Généralités :

- * Ag : solubles, multivalents, haptène seul non précipitant
- * Ac : au moins divalent, Ig G , Ig M, polyclonaux mieux que monoclonaux
- * Formation d'un réseau tridimensionnel progressivement => précipités visibles
- * Courbes de précipitation:
 - . n'obéit pas aux lois de la stoechiométrie, modulée par les proportions respectives des réactifs
 - . notion d'excès d'Ag, de zone d'équivalence, d'excès d'Ac
 - . notion de courbe lapin et de courbe cheval
 - . schéma
- * Facteurs non immunologiques:
 - . temps: jour, semaine
 - . température: 20°C, 4°C
 - . force ionique (0,15 M NaCl), pH entre 6 et 8,5
 - . adjuvant de précipitation: PEG 6kD à 4%, latex
- * Sensibilité: de 20 à 50 mg / ml en milieu gélifié
0,001 mg / ml en milieu liquide
- *Méthodes:
 - . milieu gélifié: étude qualitative ou quantitative
 - lecture à l'oeil, au densitomètre
 - mise en évidence d'Ag ou d'Ac
 - dosage d'Ag
 - . milieu liquide: étude quantitative
 - lecture au néphélémètre ou au turbidimètre
 - dosage d'Ag surtout, d'Ac peu

3-2 Précipitation en milieu gélifié :

3-2-1 Double diffusion :

- * milieu gélifié : agarose, agar-agar , 0,5 à 1%, taille des mailles telle que les molécules puissent diffuser facilement

* les deux réactifs - Ag et Ac - migrent en même temps dans le milieu gélifié, à partir de puits, création de gradients de concentration, stabilisation des zones de précipitation à l'équivalence

* Ouchterlony:

. schéma

. applications: comparaison de préparation d'Ag ou d'Ac
mise en évidence de certains auto Ac

* Electrosynérèse:

. schéma

. applications: mise en évidence d'Ag bactériens ou viraux
mise en évidence, dosage semi quantitatif d'Ac

* Immunoélectrophorèse:

. schéma

. applications: étude qualitative du sérum ou des urines

* Electrophorèse bidimensionnelle

. schéma

. applications: étude qualitative des liquides biologiques

3-2-2 Simple diffusion :

* Un des deux réactifs (l'Ac le plus souvent) est inclus dans le milieu gélifié sa concentration est constante et inférieure à l'équivalence, l'autre (l'Ag le plus souvent) migre à partir d'un puits. L'anneau de précipitation se stabilise à la zone d'équivalence et son diamètre est proportionnel à la concentration de l'Ag, une courbe d'étalonnage peut être établie donc étude qualitative possible

* Mancini:

. schéma

. applications: dosage de protéines sériques / Ig G, Ig A, IgM

* Laurell:

. schéma

. applications: comparables à celles du Mancini

3-2-3 Autres cas :

* Immunofixation:

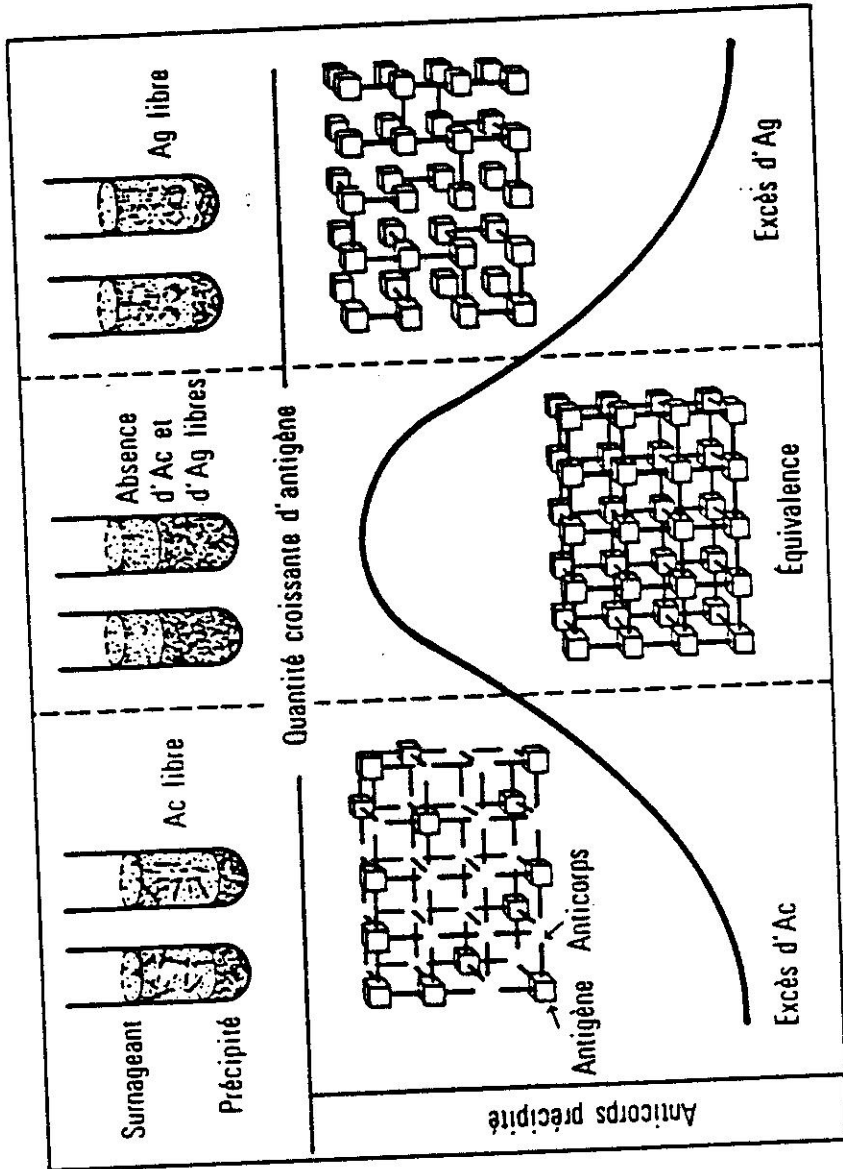
. schéma *S.T.P.*

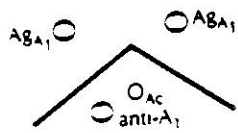
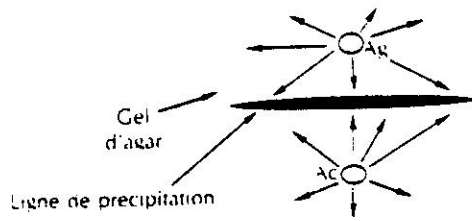
. applications: étude des Ig monoclonales, phénotypages de protéines

* Radioimmunoprécipitation (RIPA)

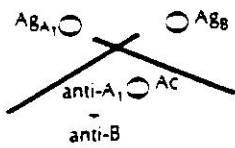
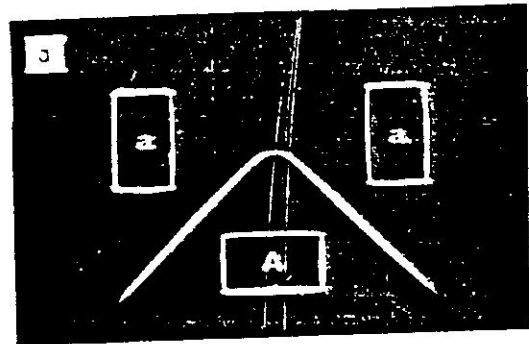
3-3 Précipitation en milieu liquide :

* diffusion de la lumière par des particules en suspension répond à des lois

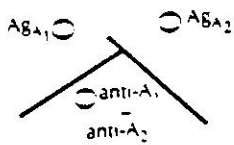
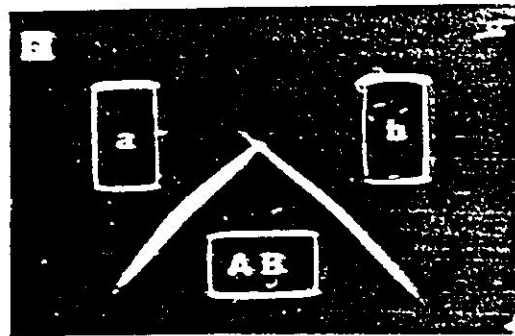




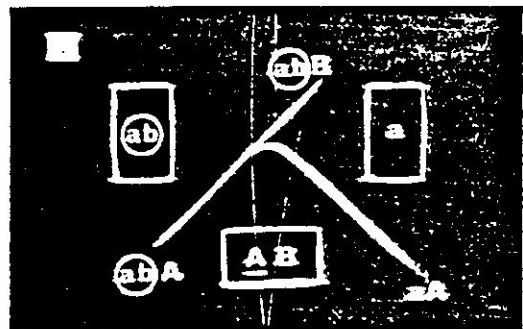
a)
Identité
totale



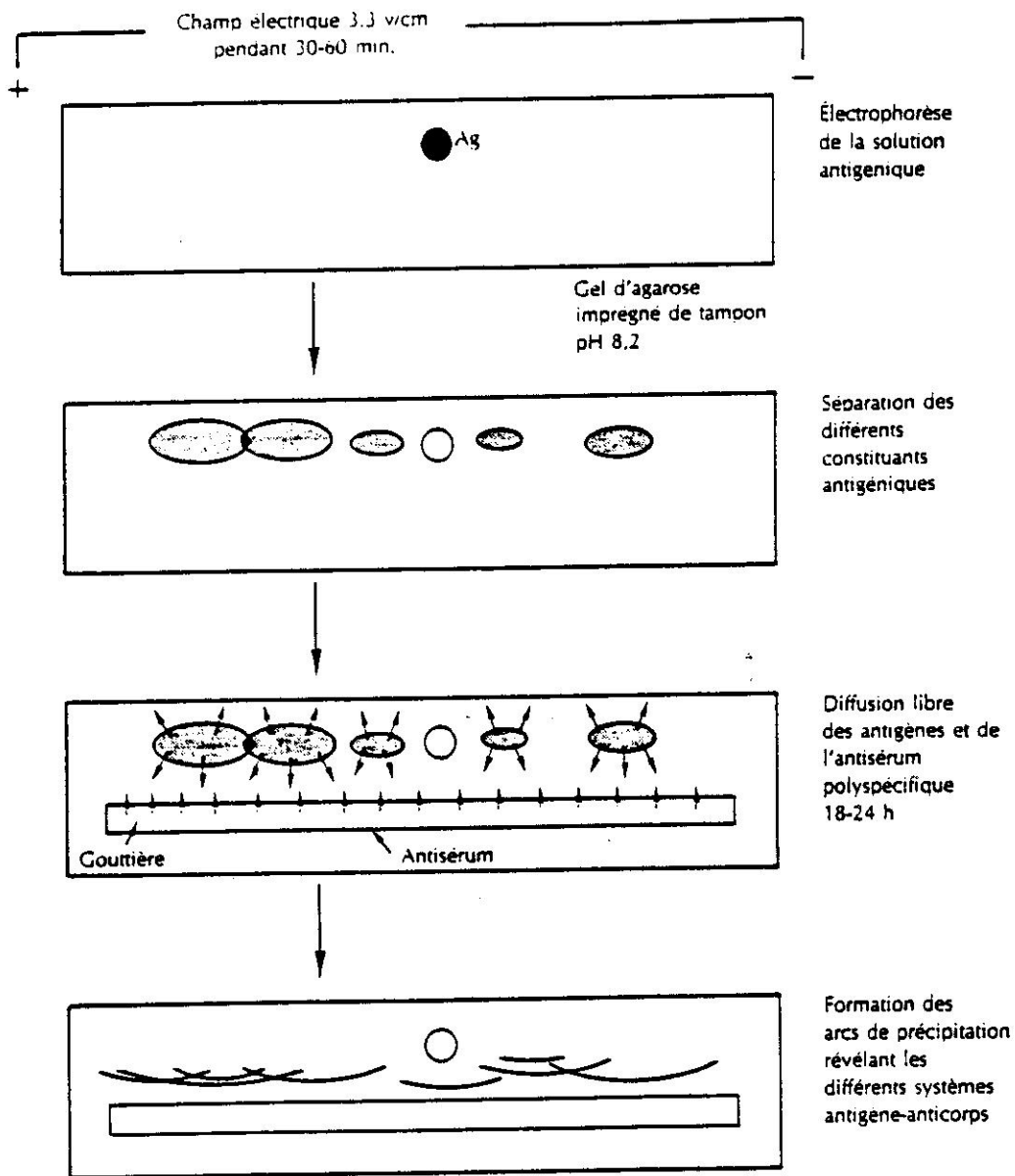
b)
Non-identité



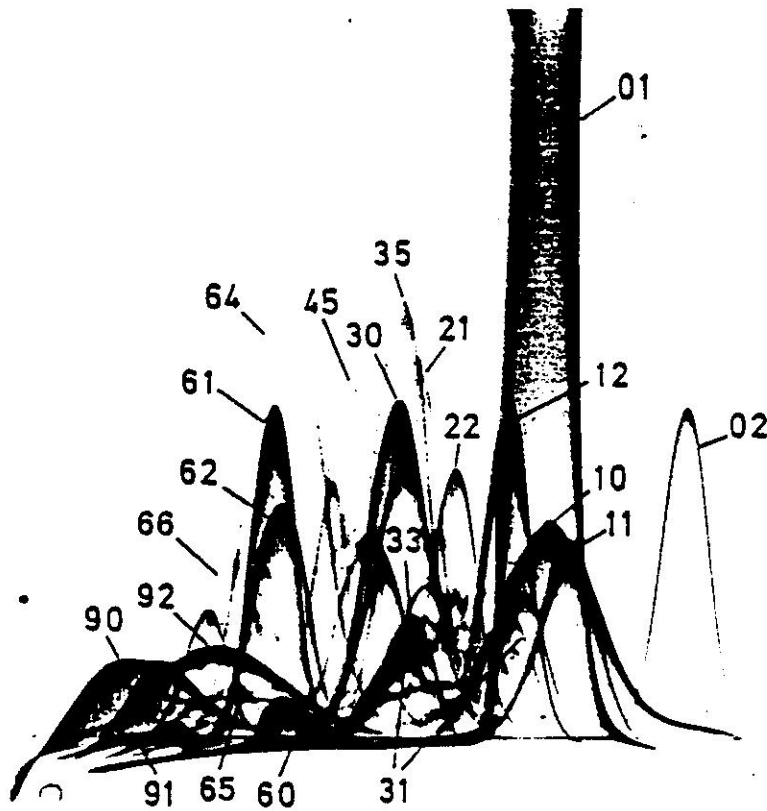
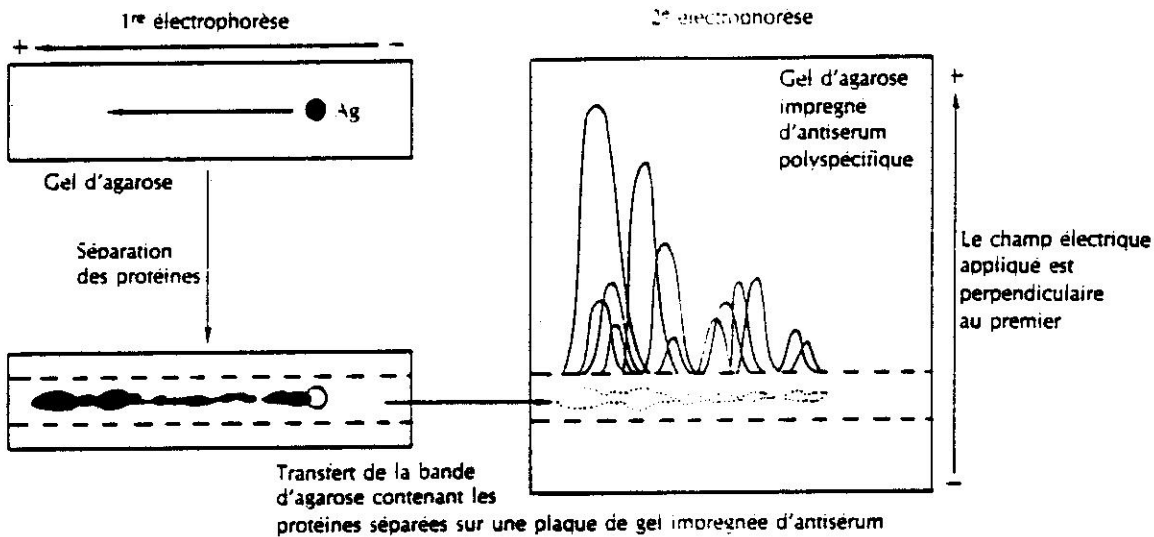
c)
Identité
partielle



Ouchterlony




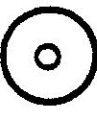
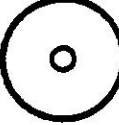
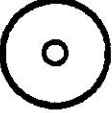
Immunoélectrophorèse



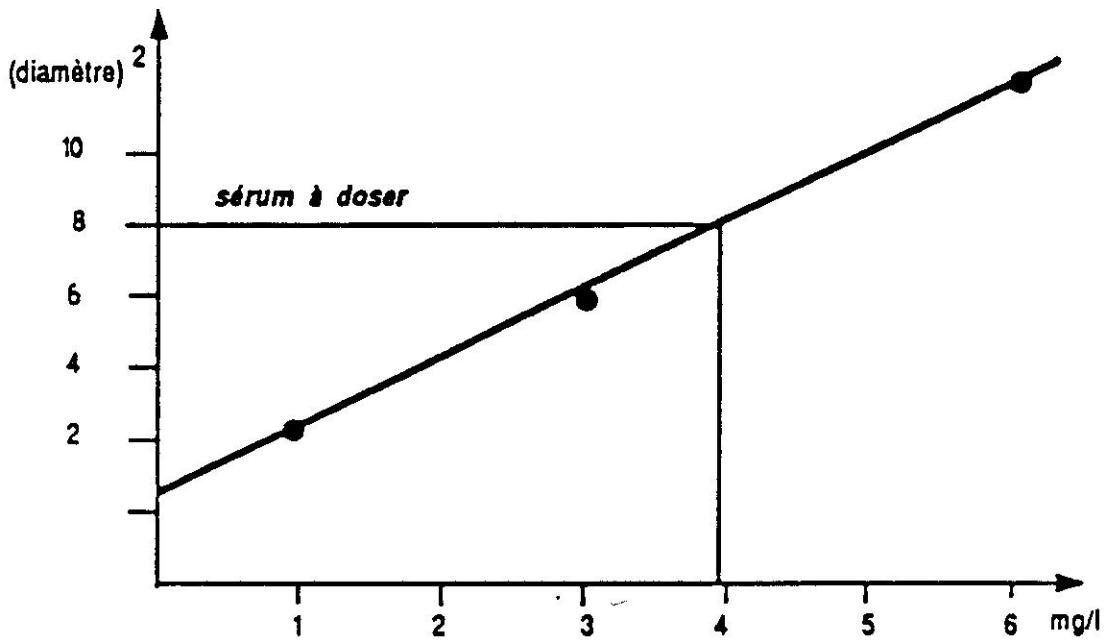
Electrophorèse bidimensionnelle.

FIG. 13.4. Crossed immunoelectrophoresis (macrotechnique) of 2.0 l human serum. The second-dimension gel contained 12.5 μ l cm^2 of a rabbit IgG against human serum proteins (Code A206, DAKO-Immunglobulins, Copenhagen). 01 = albumin; 02 = prealbumin; 10 = α_1 -lipoprotein; 11 = orosomucoid (α_1 -acid-glycoprotein); 12 = α_1 -antitrypsin; 21 = Gc-globulins; 22 = α_1 -antichymotrypsin; 30 = haptoglobin; 31 = ceruloplasmin; 33 = α_2 -macroglobulin; 35 = α_2 -HS-glycoprotein; 45 = antithrombin III; 60 = β -lipoprotein; 61 = transferrin; 62 = C3 complement (β_1 -A globulin); 64 = haemopexin; 65 = C4 complement (β_1 -E globulin); 66 = properdin factor B (glycine-rich- β -globulin); 90 = IgG; 91 = IgM; 92 = IgA.

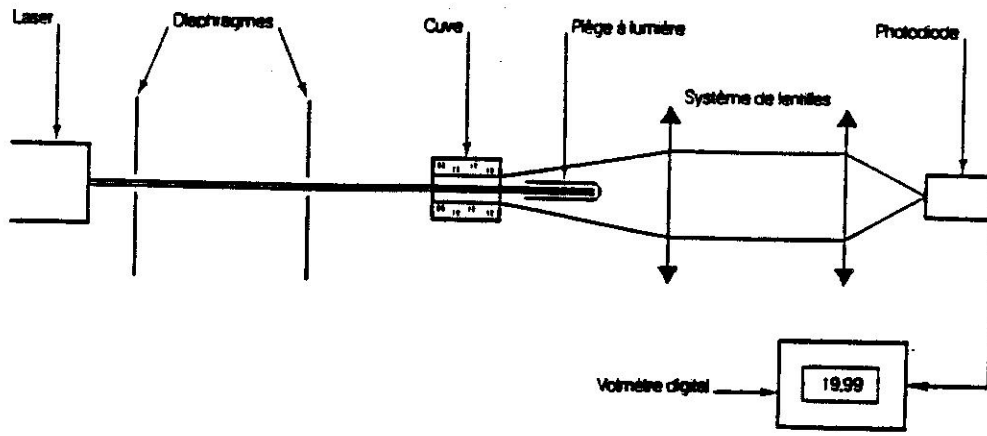
Taille des cercles de précipitation en fin de réaction.

				
	étalon n° 1	étalon n° 2	étalon n° 3	sérum à doser
concentration en Ag :	1 mg / l	3 mg / l	6 mg / l	?
(diamètre) ²	2	6	11,5	8

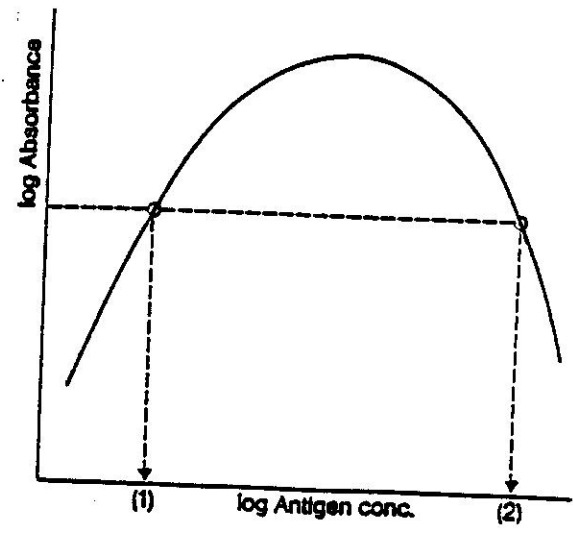
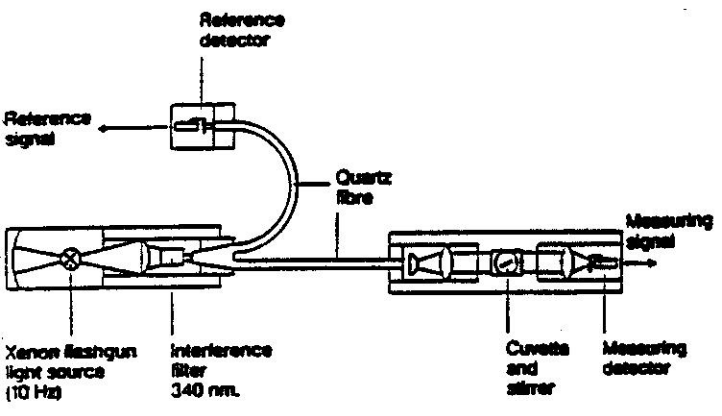
Droite d'étalonnage.



Mancini



Néphélogétrie



Turbidimétrie

physiques donc quantification possible. Angle d'observation sous lequel la lumière dispersée est mesurée et ceci par rapport à l'axe de propagation de la lumière incidente:

. diffusion de la lumière sous un angle différent de 0 (5 - 90°):

le néphélémètre mesure l'intensité de la lumière dispersée

. diffusion de la lumière sous un angle peu différent de 0:

le turbidimètre mesure l'intensité de la lumière transmise

- * Mesures en point final ou en cinétique
- * Réactifs : qualité néphélométrique ou turbidimétrique
- * Sensibilité : ordre du $\mu\text{g} / \text{ml}$
- * Utilisation d'adjuvant: PEG ou latex
- * Réalisation de courbes d'étalonnage ou utilisation de "code barre"
- * Néphélométrie :

. schéma

. applications: grandes séries car automatisation

dosage des protéines sériques

recherche d'Ac

- * Turbidimétrie :

. schéma

. applications: coup par coup ou petites séries

peu différentes de celles du néphélémètre

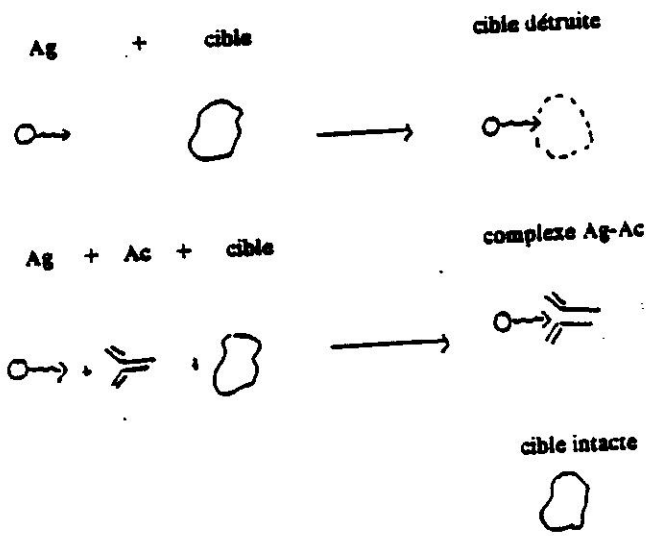
4 NEUTRALISATION

4-1 Généralités :

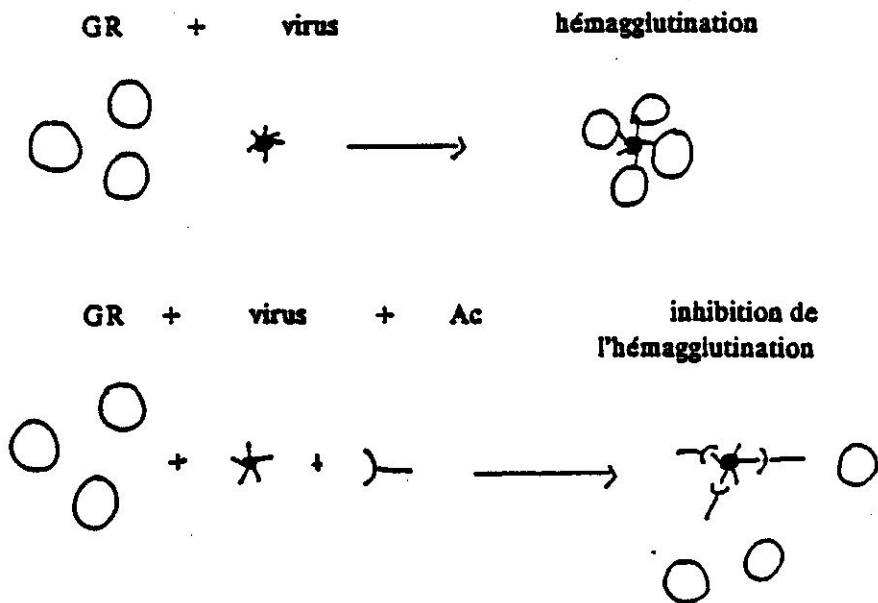
- * Ag : molécule douée d'une activité biologique - toxine, enzyme
ECP, pouvoir pathogène
- * Ac : Ig M ou Ig G
- * Neutralisation de l'activité biologique par les Ac, dits protecteurs
- * Possibilité d'inhibiteurs non spécifiques, nécessité de témoins
- * Schémas

4-2 Applications :

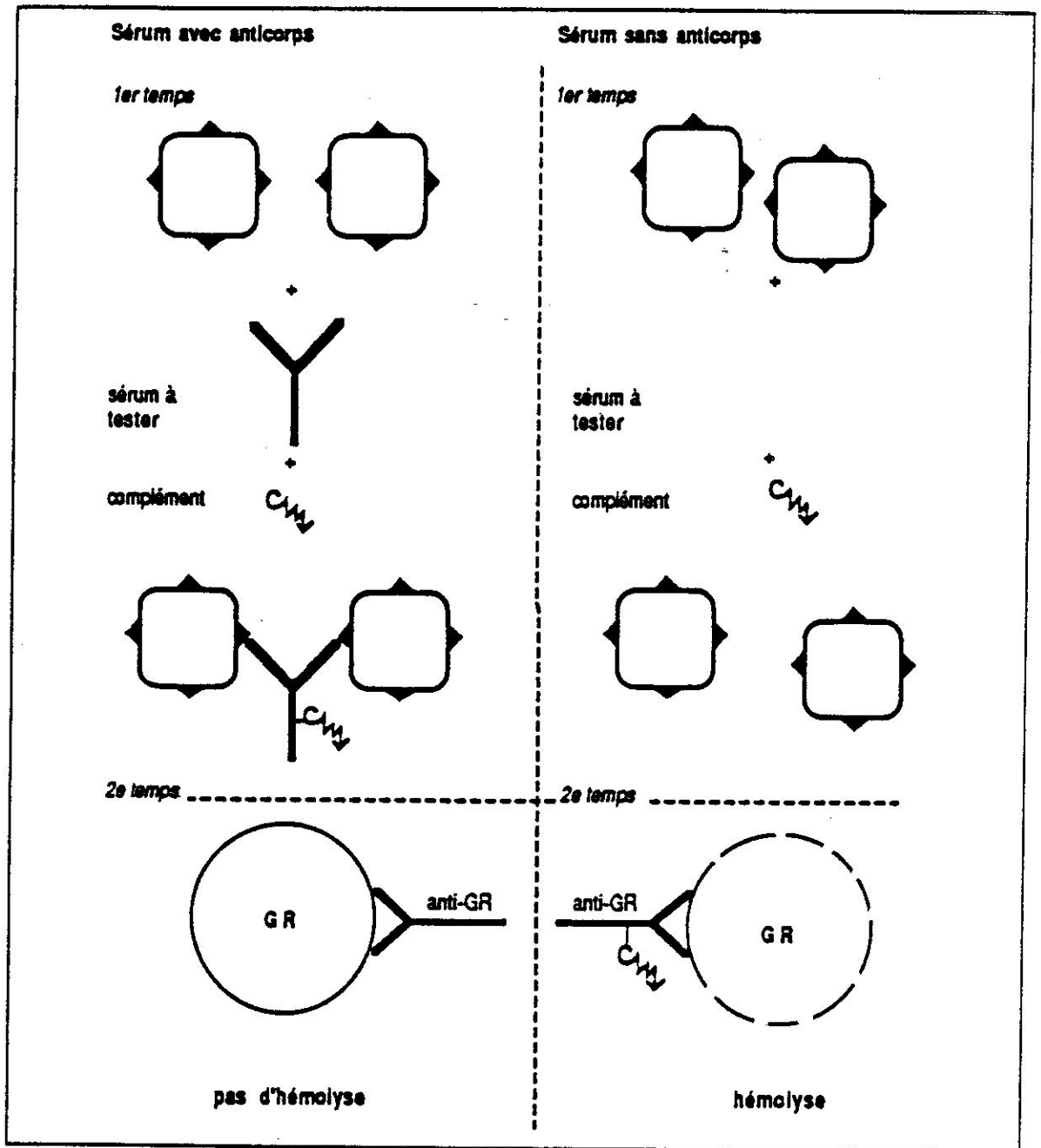
- * Sérologies bactériennes :
 - . Ac anti enzyme des Streptocoques (ASL, ASH, ASK, ...),
des Staphylocoques
 - . Ac anti toxine tétanique
- * Sérologies virales :
 - . Inhibition de l'hémagglutination virale (Grippe, Rubéole)
- * Identification virale :



Réaction de Neutralisation.



Inhibition de l'agglutination virale.



Réaction de fixation du Complément

- . Neutralisation d'ECP
- . Neutralisation de pouvoir pathogène

5- FIXATION DU COMPLEMENT

5-1 Généralités :

- * Ag : solubles ou particulaires
- * Ac : Ig G3, Ig G1, Ig G2, Ig M
- * Complément : cobaye
- * Couple révélateur : globules rouges de mouton (GRM), Ac de lapin anti GRM (SH)
- * Schéma

5-2 Applications :

- * Sérologies :
 - . virales
 - . parasitaires
 - . bactériennes
- * Réaction de cytotoxicité complément dépendante:
 - . typage HLA
 - . Ac anti HLA
- * Exploration du système complément
- * Exploration des CIC

6- IMMUNOFLUORESCENCE : IF

6-1 Généralités :

- * Ag : cellules, tissus, frottis de micro organismes ou de cellule
cellules vivantes
coupes d'organe, biopsies
- * Ac : pas de limites
- * Marqueurs :
 - . principe de la fluorescence: λ d'excitation < λ d'émission
 - . fluorescéine: FITC = isothiocyanate de fluorescéine, verte
 - . rhodamine: RITC = isothiocyanate de rhodamine, jaune-orange
TRITC = isothiocyanate de tetramethyl rhodamine
 - . rouge Texas, bromure d'ethidium, acridine orange
- * Conjugués : Ac^F, Ag^F, anti Ig^F, anti C^F
- * Lecture :
 - . microscopes (schémas)
 - . photographie

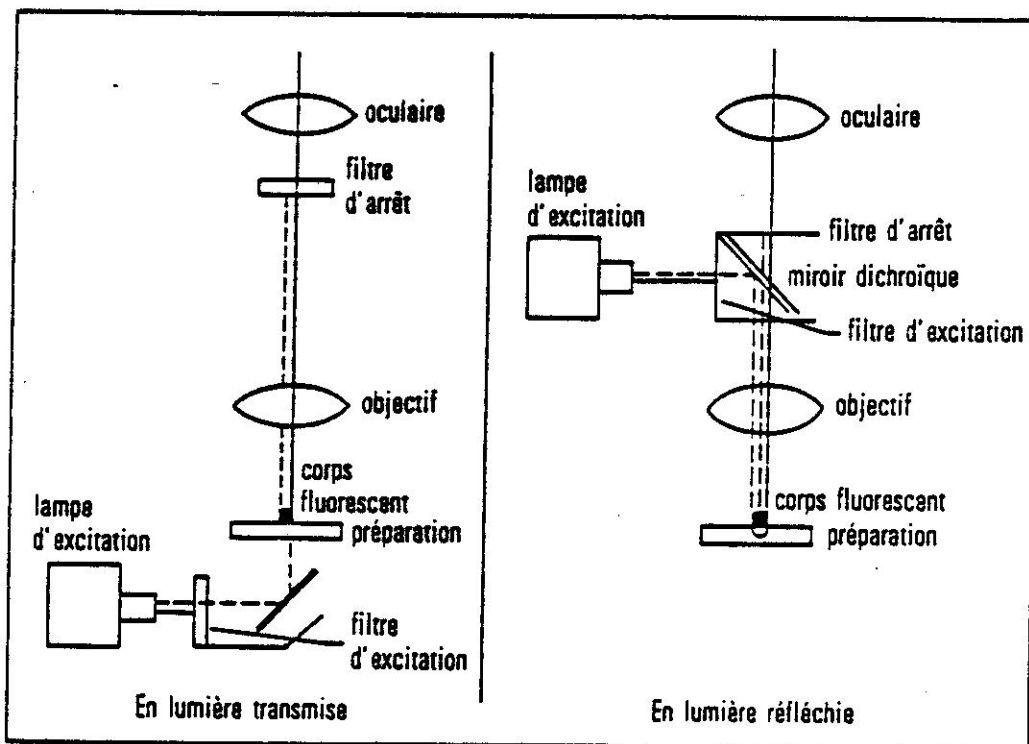
- . cytométrie de flux
- . fluorimétrie
- * Sensibilité : 0,1 mg /ml
- * Système d'amplification : Biotine-Avidine (4 molécules de biotine pour 1 d'avidine)
- * Expression des résultats : qualitatif ou semi-quantitatif, localisation
- * Témoins :
 - . faux positifs par auto fluorescence
 - . faux négatifs par complexes solubles si Ac nbx, ou si mauvaise fixation de l'Ag
- * Faisabilité
- * Méthodes :
 - . IF directe
 - . IF indirecte
- * Champs d'application :
 - . mise en évidence d'Ag, dosage
 - . mise en évidence d'Ac, dosage
 - . immunocytochimie

6-2 IF Directe :

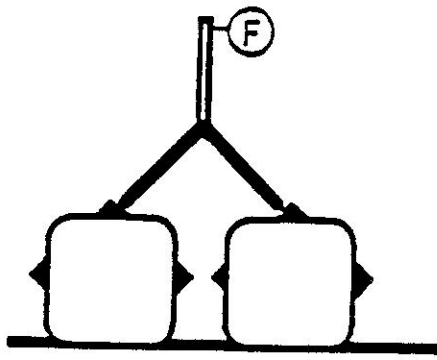
- * Schémas
- * Applications:
 - . mise en évidence d'Ag:
 - sur biopsies —> dépôts d'Ig, C
 - typages cellulaires
 - mise en évidence de bactéries, virus, parasites
 - . mise en évidence d'Ac: rare

6-3 IF Indirecte :

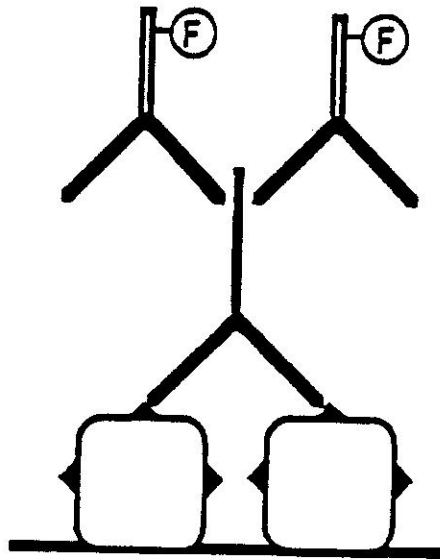
- * Schémas
- * Applications :
 - . sérologies bactériennes: Syphilis
 - . sérologies virales: EBV, Herpes
 - . sérologies parasitaires: Toxoplasmose
 - . sérologies auto immunes: ACAN, anti ribosomes, anti réticulum, anti mitochondries
 - . typages cellulaires / lymphocytaires
 - . mise en évidence d'Ag dans les tissus
 - . mise en évidence d'Ac dans les tissus



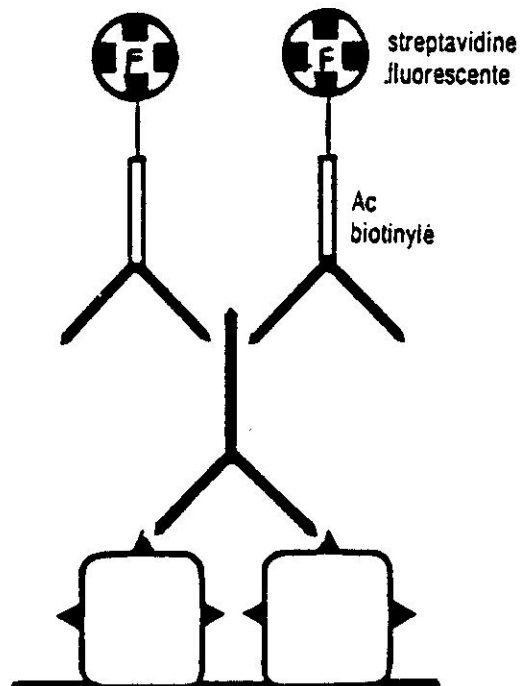
Microscopos à fluorescence.



IF Directe .



IF Indirecte



... système d'amplification.

6-4 Fluorimétrie :

- * Phase liquide: pas de séparation car différence entre l'intensité de la fluorescence du marqueur lié et celle du marqueur libre
- * Dosage d'hormones, médicaments

7- RADIOIMMUNOLOGIE

7-1 Généralités :

- * Ag : immunogènes, haptènes, purification, spécificité, Ag étalon
- * Ac : polyclonaux, monoclonaux, affinité
- * Marqueurs :
 - . ^{125}I : 1/2 vie de 60 j., γ (noyau excité émet en se désactivant un rayonnement magnétique γ)
 - . ^{131}I : 1/2 vie de 8j., γ
 - . ^3H (tritium): 1/2 vie de 12 ans, β^- (neutrons en sur nombre, un de ceux ci se transforme en proton + $1 e^-$)
 - . ^{35}S : 1/2 vie de 87 j., β^+ (protons en sur nombre, un de ceux ci se transforme en neutron + $1 e^+$ dit positon)
 - . ^{14}C : 1/2 vie de 5650 ans, β^-
 - . ^{32}P , ^{57}Co , ^{75}Se , ^{52}Cr
- * Conjugués : Ag^R, Ac^R, anti Ig^R
- * Lecture :
 - . compteurs gamma pour ^{125}I
 - . compteurs bêta à scintillation liquide pour ^3H
 - . auto radiographie
- * Sensibilité : ng, pg
- * Système d'amplification : Biotine-Avidine
- * Expression des résultats : qualitatif ou quantitatif (ng/ml, pg/ml, UI/ml)
- * Matériel, coût, maniabilité
- * Législation
- * Méthodes :
 - . séparation du marqueur libre du marqueur lié: précipitation des complexes par du PEG, du sulfate d'ammonium, par un double anticorps, par fixation d'un des éléments sur un support
 - . en phase liquide, en phase solide
 - . compétition, immunométrie
 - . autres
- * Champs d'application : tout ou presque tout

7-2 Techniques par compétition :

- * En phase liquide, schéma, DRI (Dosage Radio Immunologique), RIA (Radio Immuno Dosage), étape de séparation finale puis mesure la radioactivité soit du précipité soit du surnageant
- * En phase solide, schéma, RIST (Radio Immuno Sorbent Test), mesure de la radioactivité fixée sur le support
- * Utilisation s pour mise en évidence et dosage d'Ag ou d'Ac

7-3 Techniques immunométriques :

- * IRMA :Immuno Radio Metric Assay
- * En phase liquide, schémas, réaction à un site, étape de séparation, pour Ag ou Ac
- * En phase solide, schémas, réaction à deux sites ou Sandwich, pour Ag ou Ac

7-4 Techniques associées :

- * Southern Blot, étude des ADN
- * Northern Blot, étude des ARN
- * Western Blot, étude des spécificités Ag ou Ac
- * Technique de Faar
- * RIPA

7-5 Applications :

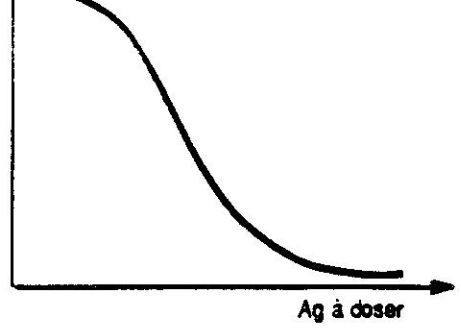
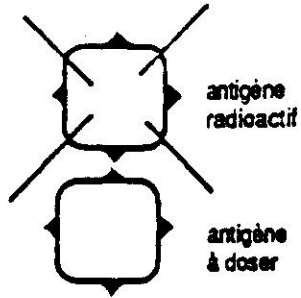
- * Ag :
 - . hormones
 - . marqueurs tumoraux
 - . protéines sériques
 - . vitamines
 - . Ag viraux, bactériens
 - . médicaments

- * Ac :
 - . Ig E spécifiques
 - . sérologies virales: hépatites, HIV
 - . sérologies bactériennes
 - . sérologies parasitaires
 - . sérologies auto immunes: anti ADN natif ...
- * Sondes nucléiques dites sondes chaudes
- * Images médicales

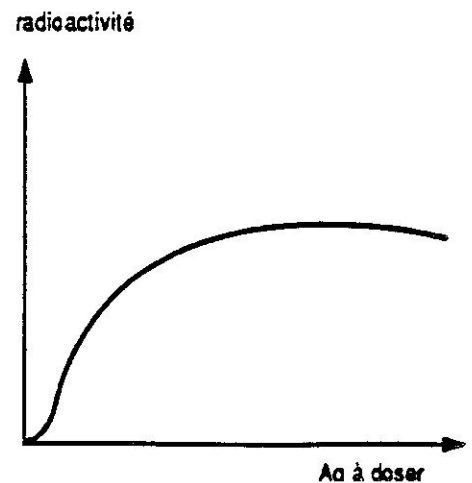
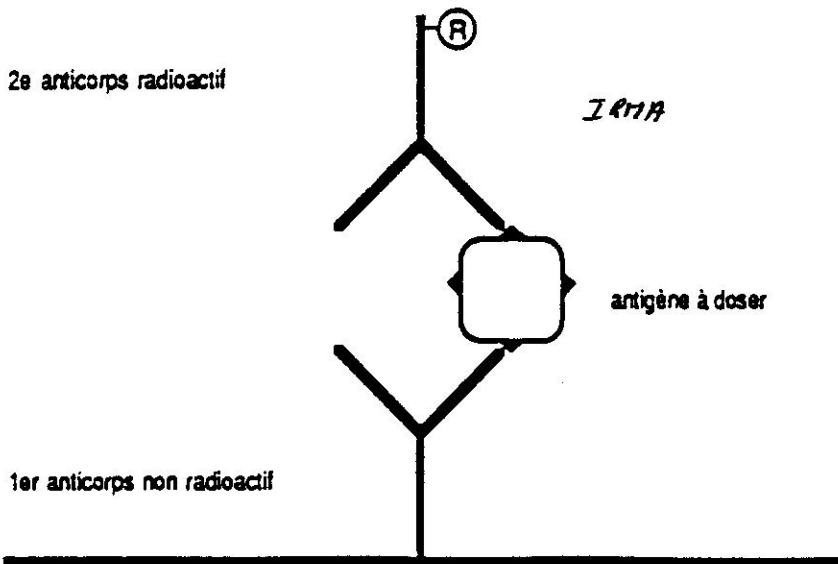
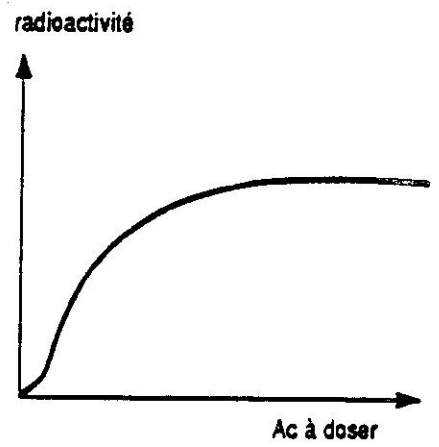
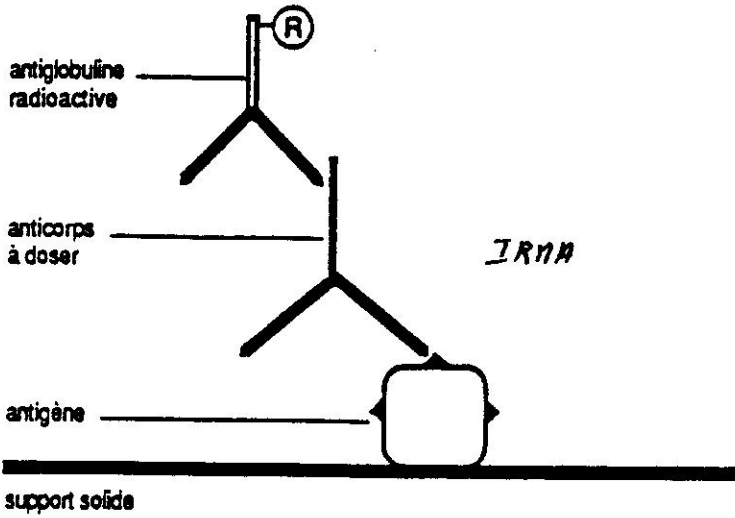
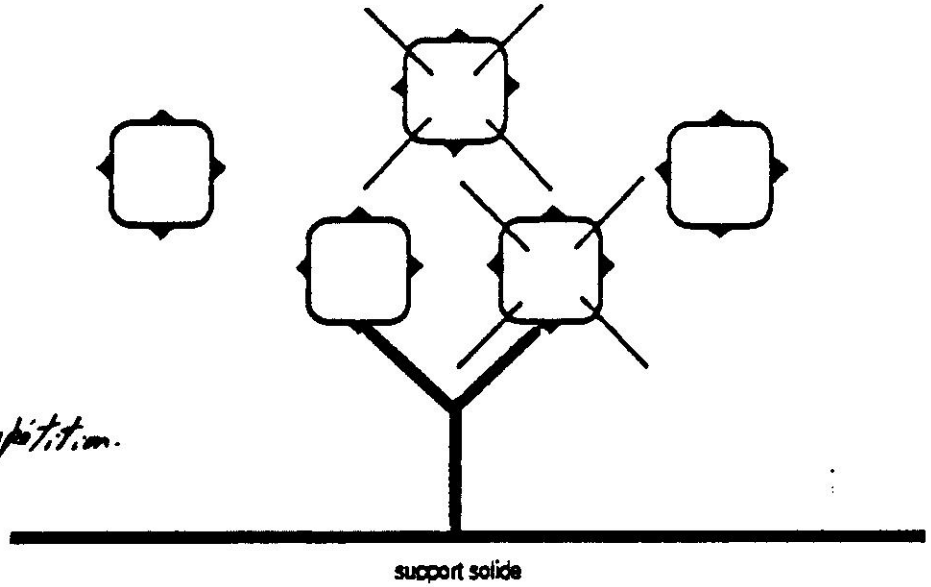
8-IMMUNOENZYMOLOGIE

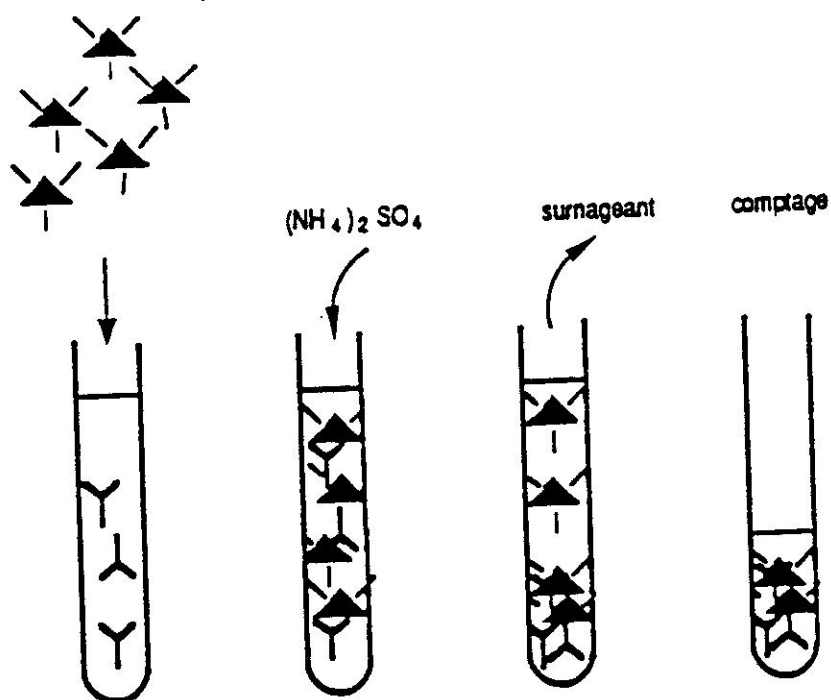
8-1 Généralités :

- * Ag : immunogènes, haptènes, purification, spécificité
- * Ac : polyclonaux, monoclonaux, affinité

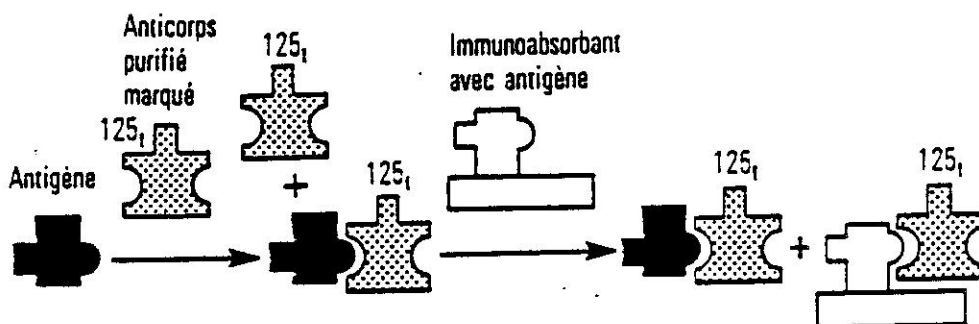


Technique par Compétition.

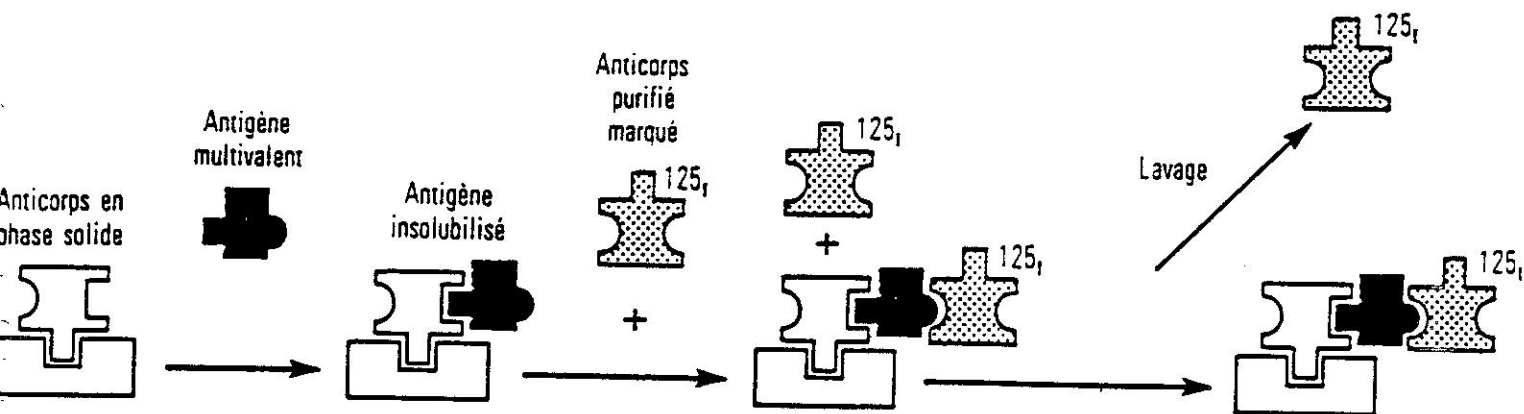




Technique de Faar.



IRMA



* Marqueurs :

- . peroxydase- tetraméthylbenzidine (TMB)- coloration bleue - 650nm
- TMB + acide - coloration jaune - 450 nm
- . phosphatase alcaline-p nitro phénylphosphate
- . acétylcholinestérase - acétyl β méthylthiocholine chromogène
- . glucose oxydase, β galactosidase, glucose 6 phosphatase
- . déshydrogénase

* Conjugués :

- . Ag^E, Ac^E, antiIg^E, anti C^E
- . fabrication
- . qualités

* Lecture :

- . spectrophotométrie
- . fluorimétrie
- . luminescence
- . oeil, densitomètre

* Sensibilité :

- . ng, pg

* Système d'amplification :

- . Biotine - Avidine
- . PAP: peroxydase - antiperoxydase

* Expression des résultats :

- . quantitatif: ng/ml, UI/ml
- . semi quantitatif: DO seuil
- . qualitatif

* Matériel, coût, maniabilité

* Méthodes :

- . phase hétérogène: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ELISA

- . phase homogène: Enzyme Multiplied Immunoassay Technique

EMIT

8-2 Phase hétérogène- ELISA :

8-2-1 Etapes de séparation:

- * Plaques de plastique, tubes, billes de latex de plastique, billes magnétiques

8-2-2 Cas des Ag:

- * Techniques par compétition: schéma 1
- * Techniques immunoenzymométriques: schéma 2

* Techniques sandwich: schéma 3

* Techniques avec amplification: schéma 4

8-2-3 Cas des Ac:

* Techniques par compétition: schéma 5

* Techniques indirectes avec Ag E : schéma 6

* Techniques indirectes avec anti Ig^E : schéma 7

* Techniques par capture: schéma 8

* Techniques avec amplification: schéma 9

* Techniques avec Complément: schéma 10

8-2-4 Techniques associées:

* Mise en évidence d'Ag insolubilisé:

ELIEDA, ELIFA

* Mise en évidence de spécificités Ac:

Western Blot 11

* Mise en évidence d'Acides nucléiques (sondes froides) : schéma 12

Southern Blot, Northern Blot

8-2-5 Applications:

* Dosages de protéines:

.Ig E, sous classes des Ig G

.Ag tumoraux

.Hormones

.Autres

* Sérologies bactériennes

* Sérologies virales

* Sérologies parasitaires

* Sérologies des maladies auto-immunes

* Immunocytochimie

* Sondes moléculaires

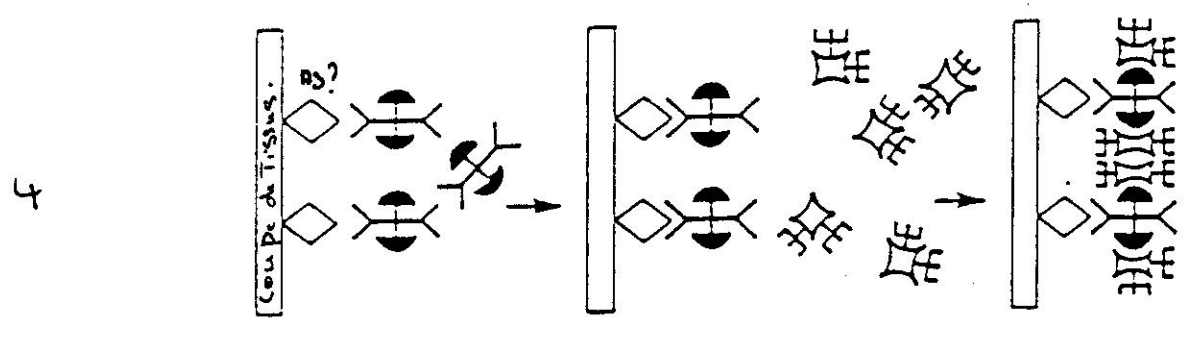
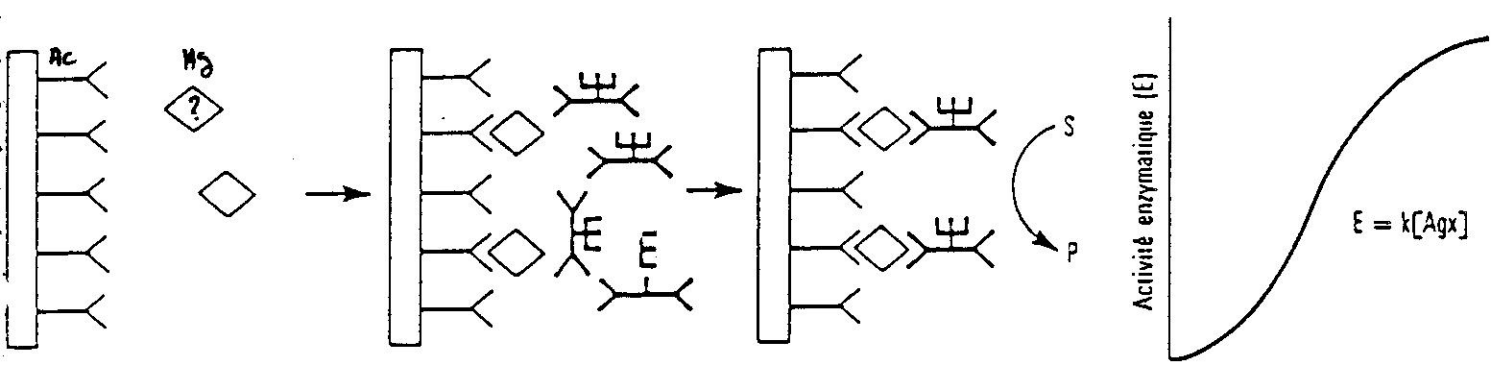
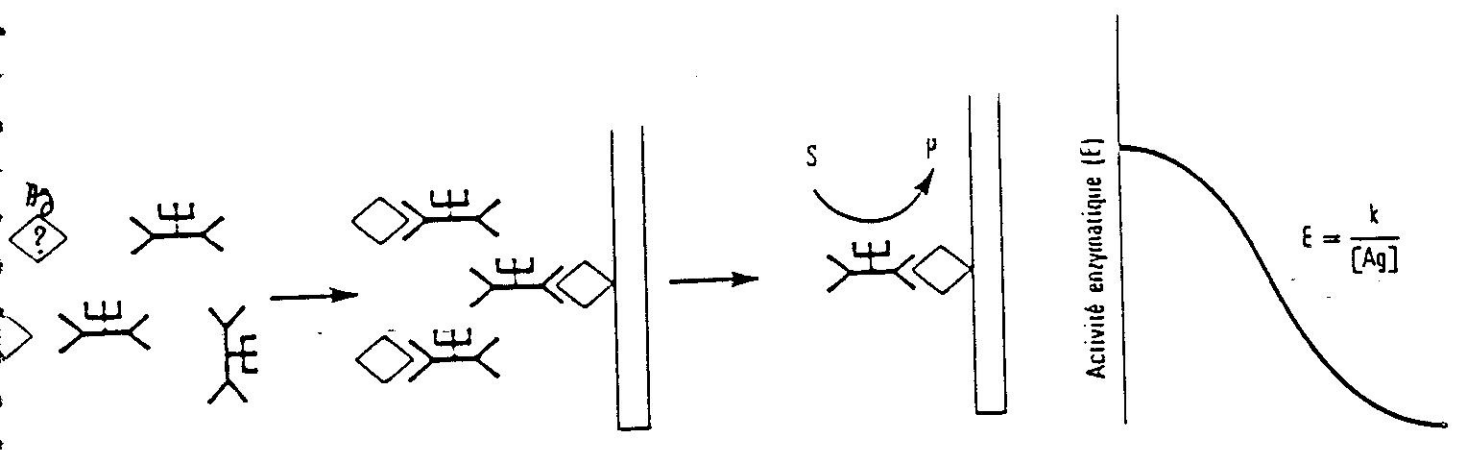
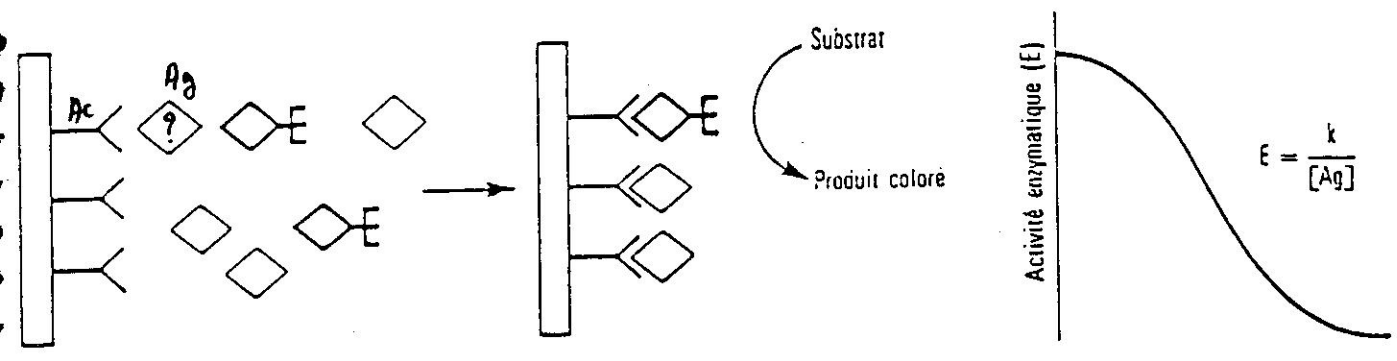
8-3 Phase homogène - EMIT :

* Principes : tableau

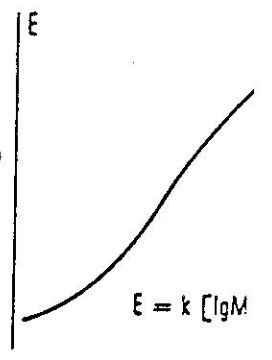
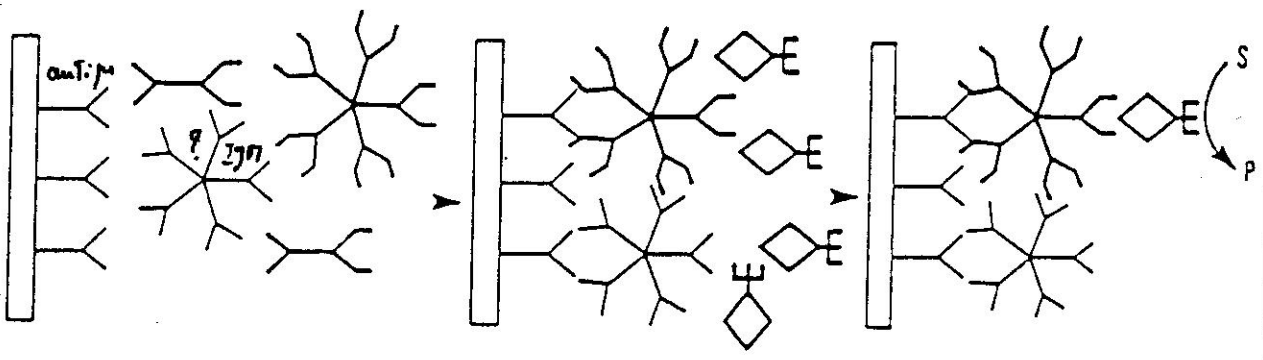
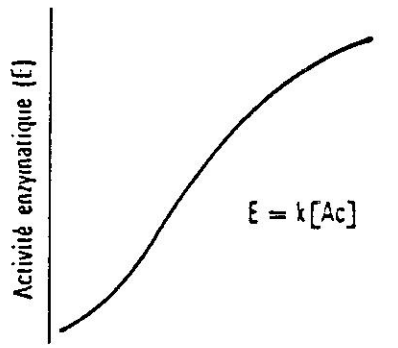
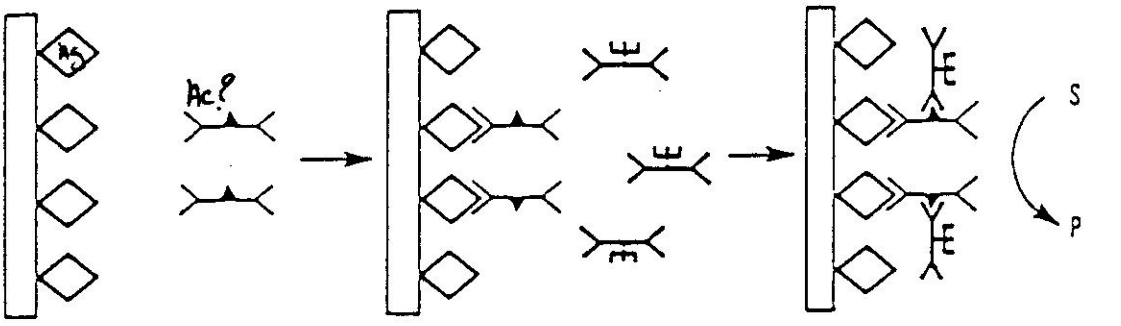
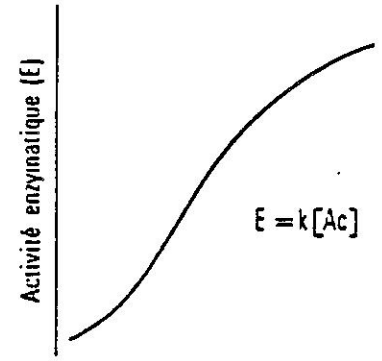
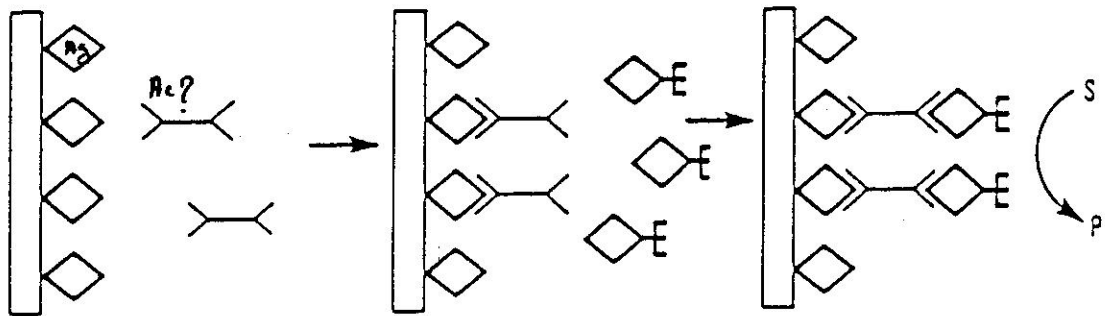
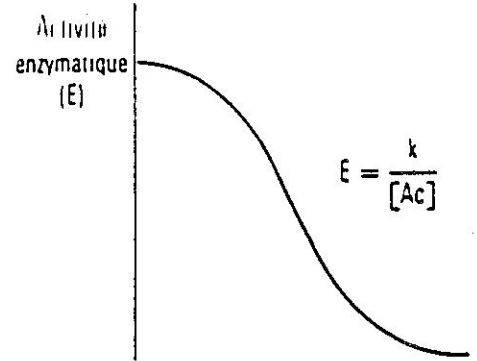
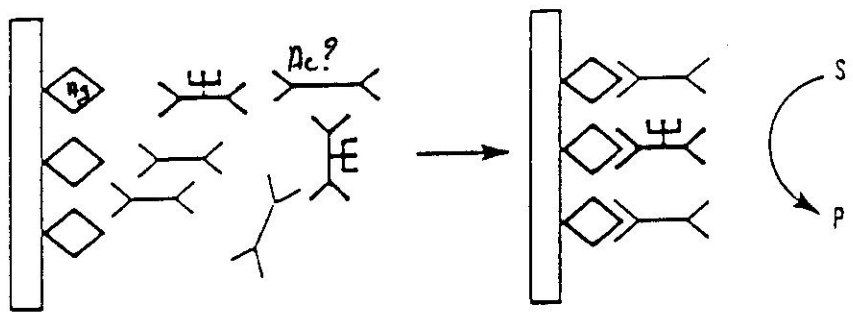
* Applications :

. médicaments

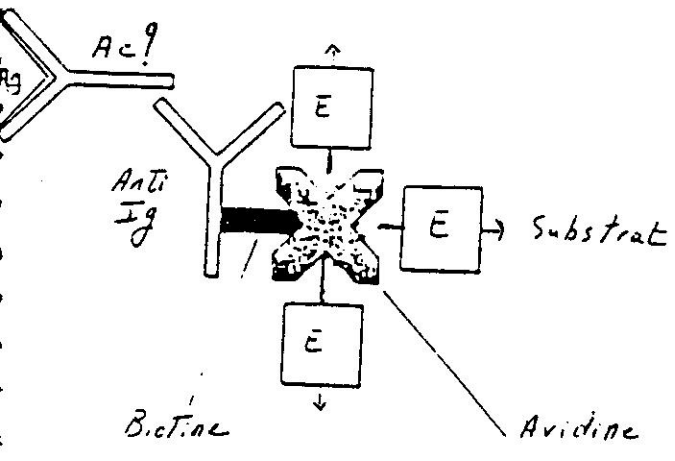
. stupéfiants



5

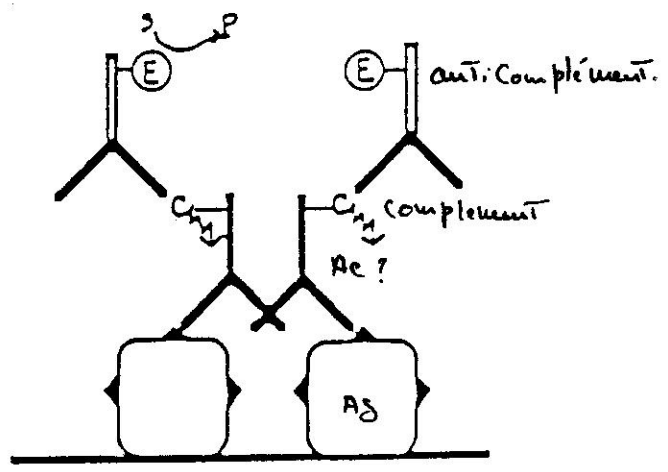


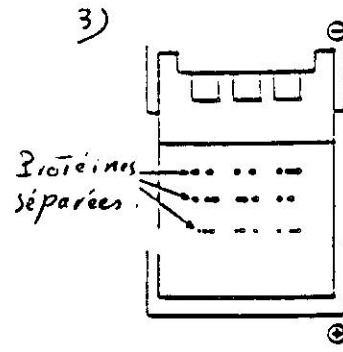
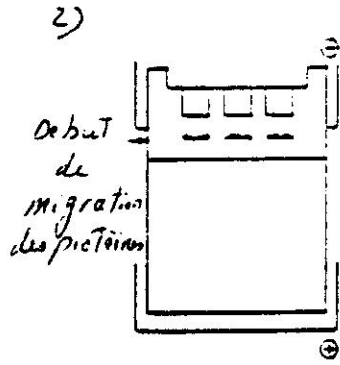
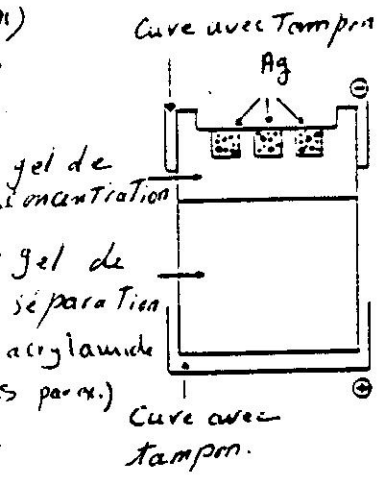
point/plaque
nitrocellulose



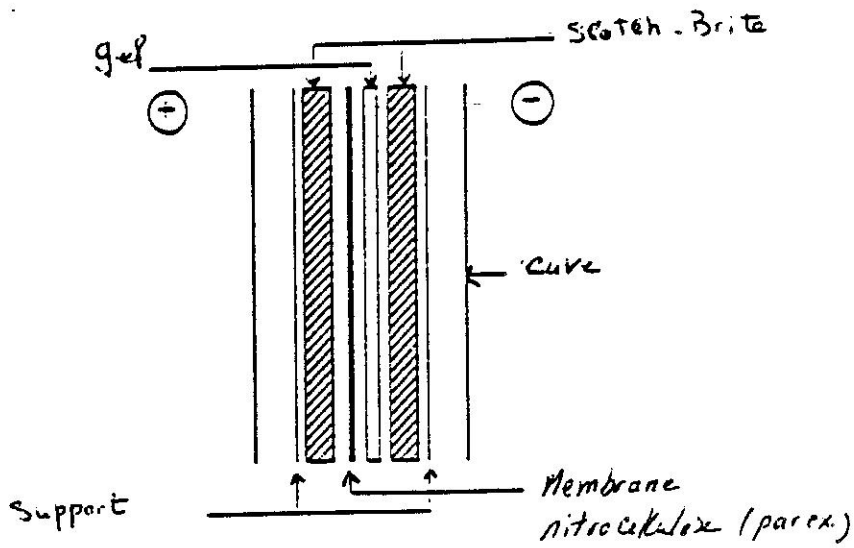
Systeme d'amplification - Biotine . Avidine

10

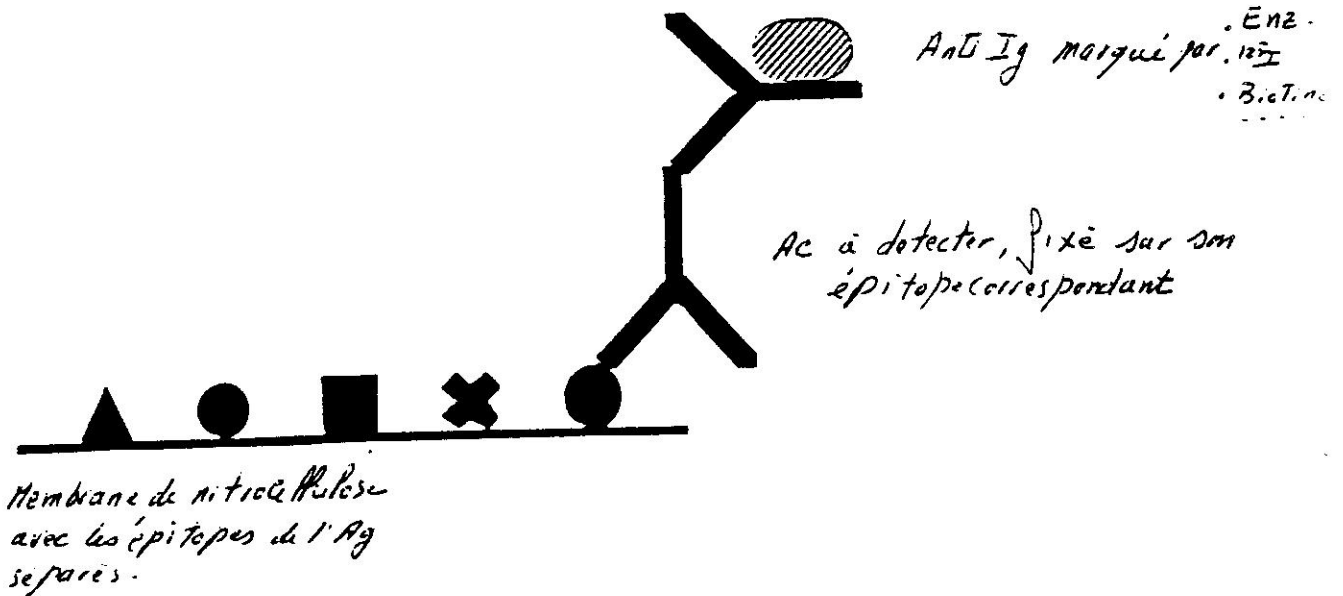


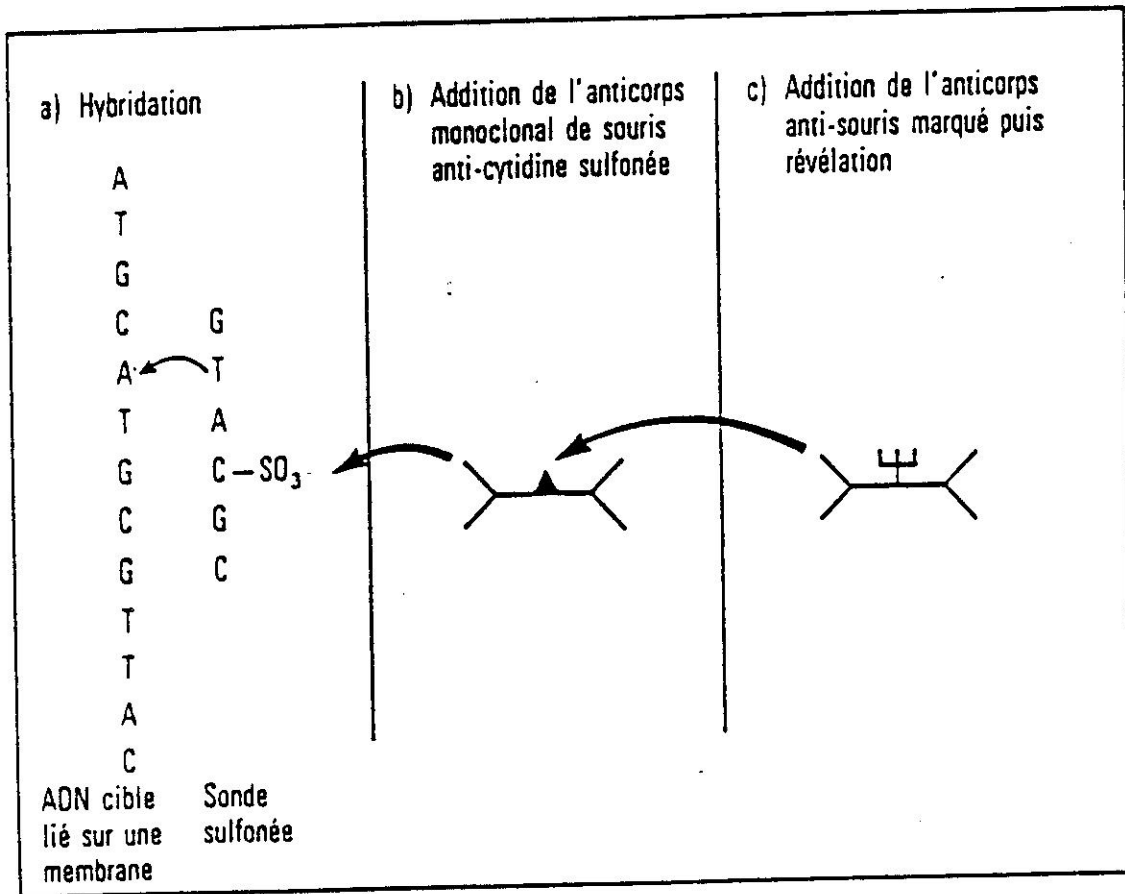


4) Transfert



5) Mise en évidence d'Ac Spécifique.





12

Sonde froide.

Méthode (en anglais)	Conjugué	Enzyme	Lecture
« Enzyme multiplied Immunotechnique » (EMIT)	haptène-enzyme	Lysozyme Glucose-6-phosphate déshydrogénase	T L ou S
« Substrate labelled Fluorescent immunoassay » (SLFIA)	haptène-substrat	β -D-galactosidase	F
« Apoenzyme reactivation Immunoassay system » (ARIS)	haptène-coenzyme	Apoglucose-oxydase	S
« Enzyme modulator mediated Immunoassay (EMMIA) » ou « Inhibitor enzyme immunoassay (IIA) »	haptène-inhibiteur enzymatique	Acétylcholinestérase	S
« Enzyme channeling immunoassay » (ECIA)	haptène-enzyme	Couplage de 2 enzymes immobilisés	S ou F
Dosage immunoenzymatique bioluminescent (BEIA)	haptène-enzyme ou anticorps-enzyme	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase	L

T : turbidimétrie ; L : luminescence ; S : spectrophotométrie ; F : fluorimétrie.

LES REACTIONS Ag-Ac: LA PRATIQUE

Le but des T.P. d'Immunologie est de vous présenter quelques unes des méthodes qui permettent l'étude des Immunoglobulines.

Nous aborderons les Ig sous deux aspects: protéines sériques et anticorps.

I- ETUDE DES Ig : PROTEINES SERIQUES

On réalisera un dosage pondéral et une étude qualitative.

I-1- DOSAGE DES Ig

Dosage des classes Ig G, Ig A et Ig M dans un sérum.

Principe: *Immunoprécipitation - turbidimétrie*

Les protéines contenues dans le sérum forment au cours de la réaction avec les Ac spécifiques des complexes immuns. La turbidité qui apparaît est mesurée automatiquement.

L'évaluation quantitative de la protéine présente dans l'échantillon se fait par la mesure turbidimétrique de la vitesse maximale de réaction. La mesure simultanée de la vitesse maximale de réaction de la formation du précipité et du temps nécessaire à son obtention permet de faire une mesure sur les deux pentes de la courbe d'Heideberger.

L'exploitation se fait par comparaison des deux paramètres de la réaction avec les valeurs obtenues pour une préparation de référence

Réactifs:

- Anticorps anti Ig G, anti Ig A et anti Ig M, prêts à l'emploi
- Sérum à tester (S)
- Solution de Na Cl

Matériel:

- Turbidimètre Behring
- Cuvettes de mesure
- Tubes, pipettes ...

Mode opératoire:

- 1- Diluer le sérum au 1/21: 50 µl de S + 1 ml de Na Cl
- 2- Au moment du dosage mettre dans la cuvette de mesure les réactifs selon les ordres donnés par l'appareil:

* pour Ig G :

20 µl de la dilution + 500 µl de l'anti Ig G

* pour Ig A:

50 µl de la dilution + 500 µl de l'anti Ig A

* pour Ig M:

200 µl de la dilution + 500 µl de l'anti Ig M

3- Récupérer les résultats imprimés

Interprétation:

Les valeurs normales sont chez l'adulte:

Ig G de 8 à 18 g/l

Ig A de 0,9 à 4,5 g/l

Ig M de 0,6 à 2,8 g/l

N.B.:

Il faut toujours mettre des contrôles dans une série des réactions, ceci afin de savoir si on peut interpréter les résultats obtenus pour les échantillon à tester. Ceci est valable pour cette réaction et toutes celles que vous réaliserez .

I-2- IDENTIFICATION D'UNE Ig MONOCLONALE

Principe: *Immunofixation*

L'immunofixation est une technique immunochimique applicable à la détection et à l'identification des immunoglobulines monoclonales.

Elle se réalise en deux étapes:

- une séparation électrophorétique des protéines
- une immunoprécipitation et une révélation, directement sur le support.

Réactifs:

- Gel d'agarose sur support
- Tampon barbital
- Anti sérums: anti Ig G, anti Ig A, anti Ig M, anti κ et anti λ
- Solution de fixation, colorant ...
- Sérum à tester

Matériel:

- Appareillage d'électrophorèse
- Matrice de dépôt, papier buvard, presse etc ...

Mode opératoire:

- 1- Dilutions de l'échantillon: au 1/2 et au 1/10
- 2- Dépôts sur l'agarose
- 3- Migration
- 4- Dépôts des anti sérums

5- Lavage, coloration, séchage

Interprétation:

Déterminer la classe et le type de la chaîne légère de l'Ig monoclonale de votre échantillon.

II- ETUDE DES Ig : ANTICORPS

On réalisera des sérologies bactériennes et virales ainsi que la recherche d'auto-Ac.

II-1- SEROLOGIES BACTERIENNES ET VIRALES

II-1-1 Sérologie Streptococcique: Recherche des ASLO

Principe: *Neutralisation*

Les anticorps du sérum vont neutraliser l'activité hémolytique de la streptolysine O produite par les streptocoques β hémolytiques, présente sous forme desséchée et en quantité croissante dans les puits des barrettes. l'activité hémolytique est mise en évidence par l'adjonction de globules rouges de lapin.

Réactifs:

- Barrette contenant la SLO, en quantité croissante de la cupule 1 à 7
- Diluant (dithiotheitol)
- Globules rouges de lapin à 2%, prêts à l'emploi
- Sérum à tester (S)

Matériel:

- Tubes, pipettes

Mode opératoire:

- 1- Diluer le sérum au 1/101: 10 μ l de S + 1 ml de diluant
- 2- Répartir 75 μ l de la dilution dans chacun des puits de la barrette, agiter délicatement quelques secondes
- 3- Incuber 15 minutes à température ambiante
- 4- Répartir 75 μ l de GRL dans chacun des puits, agiter doucement
- 5- Incuber 1h 30 à température ambiante

Lecture:

- 1- Sortir délicatement la barrette du support et l'observer latéralement
- 2- Titre du sérum: noter le dernier puits où l'hémolyse est encore absente

3- Témoin sérum: la cupule n°8 ne doit pas présenter d'hémolyse

Interprétation:

N° de la cupule*	1	2	3	4	5	6	7	8
Titre en UI/ml	100	200	300	400	600	800	> 1200	Témoin sérum

* numérotation à partir du repère rouge

Les ASLO (anticorps anti streptolysine O) sont les Ac les plus couramment recherchés au cours des infections dues aux Streptocoques du groupe A, infections qui peuvent être suivies de nombreuses et sévères complications / RAA.

Dans 80 % des cas le taux en ASLO s'élève au-delà de 200 UI/ml, valeur définie comme limite pathologique.

La détermination simultanée de plusieurs anti exoenzymes streptococciques augmente la probabilité de réponse positive au alentour de 95% (Cf. Cours de bactériologie).

II-1-2 Sérologie de l'HIV: Etude de la spécificité des Ac

Principe: *Western-Blot*

Le Western-Blot est une technique qui permet l'étude de la spécificité des Ac. Elle se réalise en deux grandes étapes:

- une séparation électrophorétique de l'Ag puis le transfert sur une membrane de nitrocellulose
- une immunoprécipitation et une révélation des Ac fixés par une technique de type ELISA à double Ac.

Réactifs:

- Bandelettes de nitrocellulose avec Ag séparé
- Sérum à tester
- Témoin négatif, témoin positif
- Anti Ig marqué à la peroxydase (conjugué), substrat
- Solution de lavage ...

Mode opératoire:

- 1- Mettre les bandelettes dans une plaque à rainures
- 2- Répartir la totalité de la dilution du sérum dans une rainure, idem pour les témoins
- 3- Laisser en contact, sous agitation
- 4- Faire 3 lavages
- 5- Déposer le conjugué, laisser en contact sous agitation
- 6- Laver

- 7- Déposer le substrat, laisser en contact sous agitation
- 8- Arrêt de la réaction, faire sécher les bandelettes

Interprétation:

Noter le nombre et la position des bandes observées pour le sérum à tester. Comparer avec les témoins.

II-2- SEROLOGIES AUTO-IMMUNES

II-2-1 Recherche des Facteurs Rhumatoïdes par une technique de Waaler - Rose

Principe: Agglutination passive - Faire un schéma .

Les facteurs rhumatoïdes sont mis en évidence et dosés en utilisant des globules de moutons sur lesquels ont été fixés des Ig G de lapin anti hématies de mouton.

Réactifs:

- Hématies sensibilisées
- Sérum à tester
- Tampon phosphate
- Hématies-témoin, non sensibilisées

Matériel:

- Microplaque
- Tubes, pipettes ...

Mode opératoire:

- 1- Diluer le sérum à tester au 1/11: 100 µl de S + 0,9 ml de tampon
- 2- Répartir les réactifs (en ml) selon le protocole suivant:

N° cupule	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilution sérique	Témoin sérum	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
Tampon	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sérum au 1/10	0,05	0,05						
Passage sous			0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Hématies sensibilisées		0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Hématies non sensibilisées	0,03							

Handwritten notes:
 RR des...
 pas de...
 agglutination...
 sensibilité - 2 x 0,45
 0,1/2
 2001/1
 (non...)

3- Laisser en contact pendant 2 heures à température ambiante.

Lecture:

- Témoin sérum: absence d'hémagglutination, les hématies ont du sédimenter régulièrement au fond du puits
- Titre du sérum à tester: c'est l'inverse de la dernière dilution présentant une hémagglutination.
- Expression des résultats en UI/ml: titre x seuil de sensibilité du réactif utilisé ce jour.

Interprétation:

Selon les laboratoires la présence de facteurs rhumatoïdes est significative à partir d'un titre de 20 ou 30 UI/ml.

Les FR sont retrouvés dans:

- 80% des des Polyarthrites rhumatoïde (PR), dites alors séropositives
- dans un pourcentage variable au cours d'autres maladies auto-immunes / Lupus
- dans un pourcentage variable au cours d'atteintes / Hépatites, Syphilis
- 4% des sujets sains.

Dans ces cas, le taux de FR est en général beaucoup plus faible que dans une PR (Cf. les cours d'Immunopathologie).

Les FR peuvent être recherchés par une autre technique d'agglutination passive qui le test de Singer Plotz. Des techniques de type ELISA sont de plus en plus employées car elles permettent de mettre en évidence toutes les classes possibles de FR.

II-2-2 Recherche des Anticorps antinucléaires

Principe: *Immunofluorescence indirecte* - Faire un schéma S.V.P.

Les ^{ACAN} Ac antinucléaires sont mis en évidence et dosés par une technique d'immunofluorescence indirecte qui utilise des cellules Hep2 comme source d'Ag et un anti Ig totales comme conjugué.

Réactifs:

- Lames de Cellules Hep2
- Sérum à tester
- Témoin négatif et positif
- Conjugué anti Ig G humaines marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine
- Bleu Evans, PBS ...

Matériel:

- Microscope à fluorescence
- Tubes, pipettes ...

Mode opératoire:

- 1- Diluer le sérum au 1/80, 1/160, 1/320

- 2- Déposer sur le puits n°1 le témoin positif, n°2 le témoin négatif, n°3 le sérum au 1/80 etc ...
- 3- Laisser en contact 30 minutes
- 4- Laver
- 5- Déposer sur tous les puits une goutte de conjugué, laisser en contact 30 minutes
- 6- Laver avec du PBS + Bleu Evans
- 7- monter la lame avec une goutte de liquide de montage

Lecture:

- Observer d'abord le témoin négatif puis le positif
- Observer les différents puits correspondant à votre sérum à tester et noter jusqu'à quelle dilution vous voyez la fluorescence.

Interprétation:

Les Ac antinucléaires sont présents dans de très nombreuses maladies auto-immunes mais c'est dans le cas du Lupus Erythémateux Disséminé que leur fréquence et leur taux est le plus élevé (Cf. le cours d'Immunopathologie).

II-2-3 Recherche des Anticorps anti-DNA: trois méthodes possibles

Méthode 1

Principe: Immunofluorescence *indirecte* - Faire un schéma S.V.P.

Les Ac anti-DNA sont mis en évidence et dosés par une technique d'immunofluorescence indirecte utilisant comme Ag des *Crithidia luciliae* et un anti Ig totales comme conjugué.

Réactifs:

- Lames de *Crithidia luciliae*
- Sérum à tester
- Témoin négatif, positif
- Conjugué anti Ig humaines marqué à l'isothiocyanate de fluoresceine
- PBS, Bleu Evans ...

Matériel:

- Microscope à fluorescence
- Tubes, pipettes ...

Mode opératoire:

Idem Cellules Hep2

Lecture:

- On observe la fluorescence qui apparaît au niveau du kinetoplaste, élément très riche en DNA. Les autres fluorescences qui pourraient être présentes seraient des artefacts.

Interprétation:

Les Ac anti-DNA sont caractéristiques du Lupus, ils représentent donc un élément important du diagnostic de cette maladie.

Méthode2

Principe: ELISA - Faire un schéma S.V.P.

Les Ac anti-DNA sont mis en évidence par une technique de type ELISA utilisant comme Ag du DNA isolé et un anti Ig totales marqué par la peroxydase comme conjugué.

Réactifs:

- Plaque avec puits contenant du DNA
- Sérum à tester
- Sérum étalon
- Témoin négatif, positif
- Conjugué anti Ig humaine marqué à la peroxydase, substrat
- Solution de lavage, diluant, PBS ...

Matériel:

- Lecteur de plaques
- Tubes, pipettes ...

Mode opératoire:

- 1- Diluer les témoins, le sérum étalon et le sérum à tester au 1/41: 5 µl + 200 µl diluant
- 2- Mettre 200 µl de chaque dilution dans le puits approprié et 100µl de diluant dans le puits qui servira de blanc
- 3- Incuber 30 minutes
- 4- Laver
- 5- Ajouter 2 gouttes de conjugué, laisser en contact 30 minutes
- 6- Laver
- 7- Ajouter 2 gouttes de substrat, laisser en contact 30 minutes
- 8- Ajouter 2 gouttes de solution d'arrêt

Lecture:

- Lire la DO de chacun des puits à l'aide du lecteur de plaques
- Calcul: . déduire la DO du blanc de chacune des DO
. faire le rapport DO échantillon DO étalon et multiplier par la valeur de l'étalon en UI/ml.
- N si < 100 UI/ml

Interprétation:

Idem cas précédent

Méthode 3

Principe: RIA - Faire un schéma S.V.P.

Les Ac anti-DNA sont mis en évidence et dosés par la technique de Faar qui utilise comme Ag un DNA marqué à l'iode 125.

Réactifs:

- DNA marqué à l'iode 125
- Sérum à tester
- Témoin négatif, positif
- Sulfate d'ammonium ...

Matériel:

- Compteur gamma
- Centrifugeuse
- Tubes, pipettes, papier aluminium
- Hotte, containers pour détritrus radioactifs ...

Mode opératoire:

- Faire une gamme d'étalonnage avec le sérum de référence
- Mettre en contact les sérums et le DNA
- Après l'incubation ajouter le sulfate d'ammonium
- Centrifuger
- Décanner le surnageant

Lecture:

- Mesurer la radioactivité de chacun des tubes
- Etablir la courbe d'étalonnage
- Calculer pour le sérum à tester la teneur en Ac anti-DNA, elle est exprimée en %.

Interprétation:

Idem le cas précédent.

LEXIQUE

- **Agammaglobulinémie:**
Défaut de synthèse des gammaglobulines.
- **Agglutination:**
Réaction entre un Ag particulière et son Ac spécifique, entraînant la formation d'agglutinats dans le milieu réactionnel.
- **Agglutination conditionnée ou passive ou indirecte:**
Réaction d'agglutination dans laquelle un Ag soluble est fixé sur un support figuré.
- **Agglutination directe:**
Réaction d'agglutination dans laquelle l'Ag est directement particulière.
- **Agglutinine:**
Ac appartenant en général aux Ig M, dont la fixation sur un Ag figuré entraîne une agglutination de ce dernier.
- **Agglutinines froides:**
Ac n'agglutinant qu'à + 4°C.
- **Anticorps (Ac):**
Glycoprotéines produites par un organisme à la suite de l'introduction d'un Ag, capables de se fixer spécifiquement sur ce dernier. Molécules présentes sur certaines cellules (Ly B) jouant le rôle de vecteur pour un Ag donné.
- **Anticorps monoclonal:**
Ac produit par un hybridome, Ig issues d'un clone et ne reconnaissant qu'un épitope.
- **Anticorps polyclonal:**
Ig issues de plusieurs clones, reconnaissant plusieurs épitopes portés par un seul Ag.
- **Antigène (Ag):**
Molécule reconnue comme étrangère par les lymphocytes d'un individu et entraînant une réponse immunitaire à médiation cellulaire ou à médiation humorale.
- **Antigène particulière:**
Ag correspondant à une cellule, Ag insoluble.
- **Antigène soluble:**
Ag correspondant à une substance chimique définie.
- **Antisérum:**
Sérum contenant des Ac dirigés contre un Ag ou un mélange d'Ag.

- **Auto-anticorps:**
Ac synthétisé par un organisme et dirigé contre un de ses composants.
- **Auto-antigène:**
Composant susceptible d'induire une réaction immunitaire dans l'organisme auquel il appartient.
- **Complément:**
Système multienzymatique, activé par des complexes immuns dans le cas de la voie classique, par des substances diverses dans le cas de la voie alterne, intervenant dans la défense de l'organisme soit associé aux Ac, soit seul.
- **Complexes immuns:**
Complexes formés d'un Ag et d'un Ac spécifique, sont soit circulants, soit déposés au niveau de tissus, activant souvent le complément. Responsables de phénomènes immunopathologiques appelés maladies à complexes immuns.
- **Conjugué:**
Complexe Ag-marqueur ou Ac-marqueur utilisé dans les réactions d'IF, EIA ou RIA afin de révéler la réaction.
- **Déterminant antigénique:**
La plus petite unité structurale reconnue sur un Ag par les Ac ou les récepteurs lymphocytaires.
- **EIA:**
Enzyme Immuno Assay, ensemble des techniques de dosage d'Ac ou d'Ag utilisant comme marqueur une enzyme.
- **Electrophorèse:**
Séparation par l'action d'un champ électrique des constituants d'un liquide biologique.
- **ELISA:**
Enzyme Linked Immuno Assay, techniques en phase hétérogène de mise en évidence ou de dosage d'un Ag ou d'un Ac en utilisant des enzymes comme marqueurs.
- **Epitope:**
Synonyme de déterminant antigénique.
- **Haptène:**
Substance de faible poids moléculaire, incapable à elle seule d'induire une réponse immunitaire, mais devenant immunogène quand elle est associée à un porteur (porteur); capable seule de se fixer aux produits issus de la réponse immunitaire in vivo ou in vitro.
- **Hémagglutination:**
Agglutination des hématies.

- Hémagglutination passive:
Réaction d'agglutination passive dans la quelle le support est une hématie.
- Hybridome:
Cellule résultant de la fusion entre un plasmocyte producteur d'Ac et d'une cellule myélomateuse; cette lignée cellulaire (clone) sera immortelle et productrice d'un Ac spécifique d'un épitope donné.
- Immunodiffusion:
Réaction basée sur la précipitation d'Ag et d'Ac à la suite de leur diffusion dans un milieu gélifié, peut être double (Ouchterlony, électrosynérèse ...) ou simple (Mancini, Laurell).
- Immunoélectrophorèse:
Réaction combinant une électrophorèse et une immunodiffusion double, permet l'étude qualitative d'un mélange d'Ag.
- Immunofluorescence:
Technique de mise en évidence ou de dosage d'Ag ou d'Ac en utilisant des fluorochromes comme marqueurs.
- Immunoglobulines (Ig):
Glycoprotéines correspondant aux Ac, subdivisées en 5 classes Ig G, Ig A, Ig M, Ig D et Ig E.
- Immunohémolyse:
Destruction des hématies à la suite de la fixation d'Ac et de complément à leur surface.
- Immunsérum:
Synonyme d'anti-sérum.
- Inhibition de l'agglutination virale:
Réaction au cours de la quelle sont mis en évidence des Ac capables de neutraliser l'activité hémagglutinante de certains virus.
- Marqueurs:
Produits tels que les fluorochromes, les radio-isotopes et les enzymes pouvant être fixés sur un Ag ou un Ac permettant ainsi de visualiser une réaction Ag-Ac par IF, RIA ou EIA.
- Méthode par compétition:
Procédé de dosage, utilisé en RIA ou EIA, mettant en jeu une quantité connue d'Ag marqué et une quantité inconnue d'Ag non marqué vis à vis d'une quantité limitée d'Ac ou inversement.
- Méthode sandwich:
Technique permettant de doser un Ag ou un Ac par une réaction en phase hétérogène soit en IF en RIA ou en EIA. Un Ag sera pris en sandwich entre un Ac fixé sur un support et un Ac marqué. Un Ac sera pris en sandwich entre un Ag fixé sur un support et un Ag marqué ou un anti-Ig marqué.

- Opsonines:
Substances favorisant la phagocytose.
- Paratope:
Synonyme de site anticorps.
- Phénomène de zone:
Phénomène par lequel la précipitation ou l'agglutination est inhibée soit en excès d'Ag soit en excès d'Ac.
- Réaction antigène-anticorps:
Terme utilisé pour désigner une réaction faite au laboratoire (in vitro) afin d'identifier, de doser un Ag ou un Ac.
- Réaction croisée:
Réaction d'un Ac avec deux Ag différents mais possédant un épitope commun ou voisin. Réaction entraînant de fausses réactions positives lors de sérologies ou de sérotypages.
- Réaction de fixation du complément:
Réaction au cours de laquelle est mise en évidence la capacité qu'ont certains Ac, après leur liaison avec un Ag, à activer le complément par la voie classique.
- Réaction de neutralisation:
Réaction au cours de laquelle un Ac inhibe l'activité biologique d'un Ag.
- Réponse primaire:
Réponse immunitaire intervenant à la suite du premier contact avec l'Ag, caractérisée par un temps de latence, un taux faible d'Ac appartenant préférentiellement à la classe des Ig M, une courte durée et l'apparition d'une mémoire immunologique.
- Réponse secondaire:
Réponse immunitaire intervenant à la suite de la réintroduction d'un Ag, caractérisée par sa rapidité, un taux élevé en Ac appartenant préférentiellement à la classe des Ig G et sa durée.
- RIA:
radio Immuno Assay, techniques de mise en évidence et de dosage d'Ag ou d'Ac en utilisant des radio-isotopes comme marqueurs.
- Sensibilité:
Correspond à la plus petite quantité d'Ag ou d'Ac détectable par une réaction Ag-Ac donnée.
- Séroconversion:
Variation du titre d'un sérum permettant d'établir le diagnostic sérologique d'une maladie.

- **Sérodiagnostic:**
Diagnostic d'une maladie infectieuse ou d'une maladie auto-immune en mettant en évidence les Ac apparus dans le sérum du malade.
- **Sérologie:**
Synonyme de sérodiagnostic.
- **Sérotypage:**
Identification d'une cellule en déterminant quels sont les Ag présents à sa surface.
- **Site anticorps:**
Situé sur le Fab, fait de l'association du domaine variable de la chaîne légère et de celui de la chaîne lourde d'une Ig, site où se fixe l'épitope.
- **Titre:**
Valeur correspondant à la quantité d'Ac ou d'Ag contenue dans un sérum, peut être donné en inverse de la dilution, en mg/ml etc.
- **Transformation lymphoblastique:**
Transformation blastique des lymphocytes sous l'action de mitogènes non spécifiques (lectines) ou de mitogènes spécifiques (Ag) et multiplication.
- **Valence d'un Ac:**
Nombre de sites anticorps efficaces par molécule d'Ig.
- **Valence d'un Ag:**
Nombre d'épitopes accessibles aux produits de la réponse immunitaire.
- **Zone d'équivalence:**
Zone dans laquelle le rapport des concentrations en Ag et en Ac est tel que la formation des complexes immuns est maximale.
- **Zone d'excès d'Ac ou d'Ag:**
Zone dans laquelle l'Ac ou l'Ag en excès entraîne une formation que partielle des complexes immuns donc une mauvaise détection de ces derniers avec risque de fausse réaction négative.