

Université Mohammed V-Agdal

Faculté des Sciences – Rabat



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biochimie-Immunologie



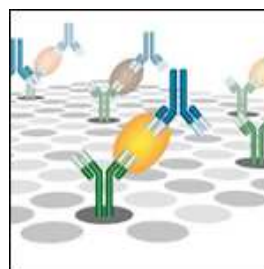
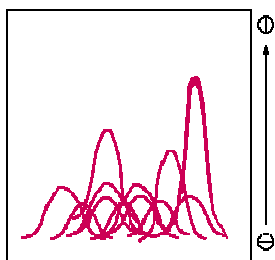
Filière SVI

Module de Biochimie – Immunologie (M22)

Elément : Immunologie

SEMESTRE 6

TD : TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES



Pr : BELLAOUI Hicham

Année universitaire : 2010-2011

I / TECHNIQUE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

II/ IMMUNODOSAGE SANS MARQUEUR

A. LA REACTION D' AGGLUTINATION

B. LA REACTION DE NEUTRALISATION

C. LA REACTION DE PRECIPITATION

1- EN MILIEU LIQUIDE :

-IMMUNO NEPHELEMETRIE

-IMMUNO TURBIDIMETRIE

2- EN MILIEU GELIFIE :

- IMMUN DIFFUSION DOUBLE (OUCHTERLONY)

- IMMUN DIFFUSION RADIALE (MANCINI)

- ELECTRO-IMMUNODIFFUSION (LAURELL)

- IMMUNOELECTROPHORESE

- IMMUN FIXATION

- IMMUNOCHROMATOGRAPHIE

III / IMMUNODOSAGES AVEC MARQUEUR

A – IMMUNOENZYMOLOGIE

- ELISA (DIRECT /INDIRECT/COMPETITIF/SANDWICH)

- TECHNIQUES DERIVES / WESTERNBLOT

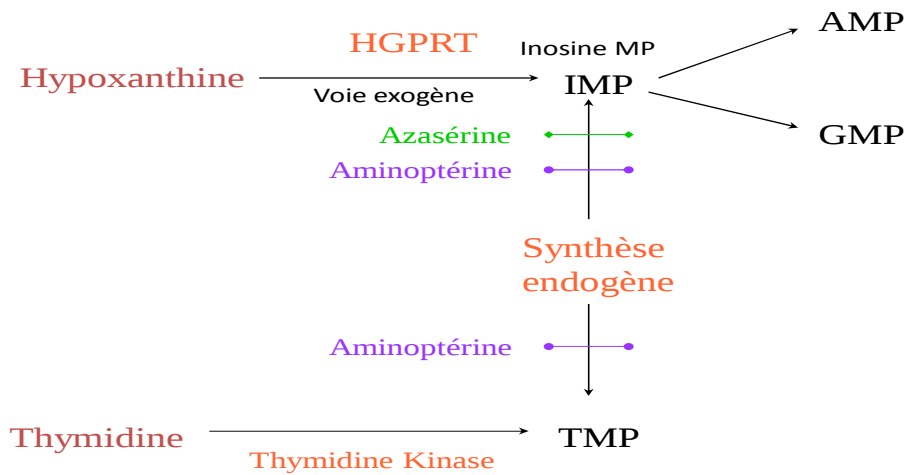
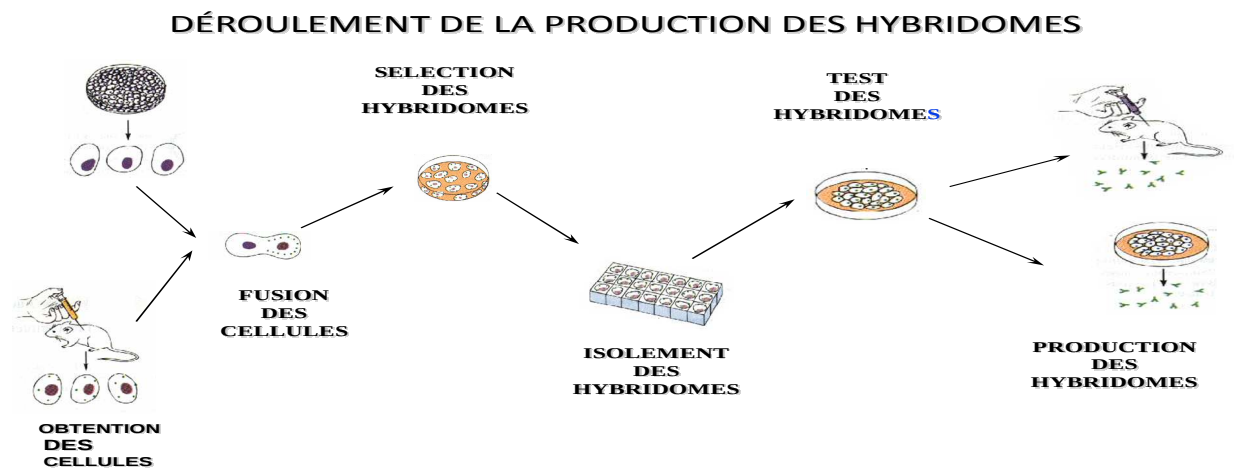
B – IMMUNOFLUORESCENCE

- MARQUAGE : DIRECT /INDIRECT / SANDWITCH)

- TECHNIQUES DERIVES (CYTOMETRIE EN FLUX)

C - RADIOIMMUNOLOGIE

I / TECHNIQUE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX



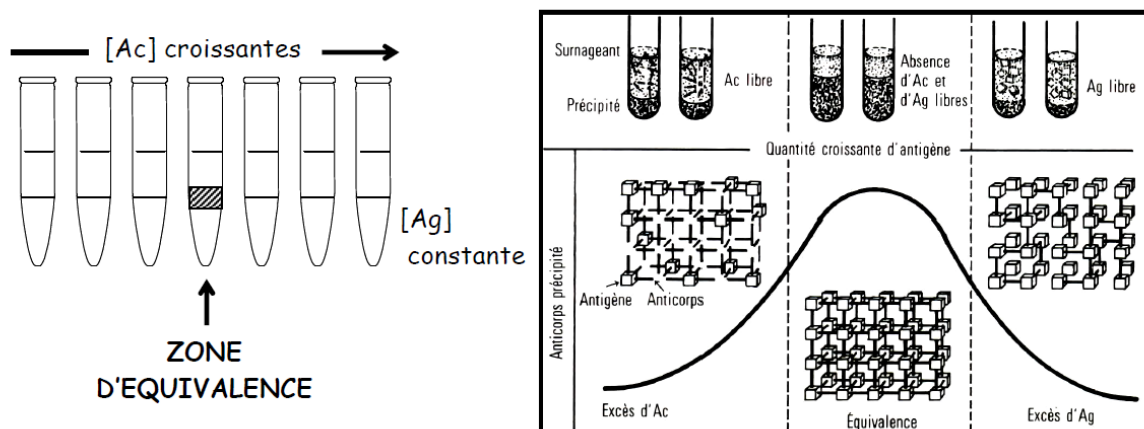
Milieu HAT : Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine

Milieu Haza : Hypoxanthine, azasérine



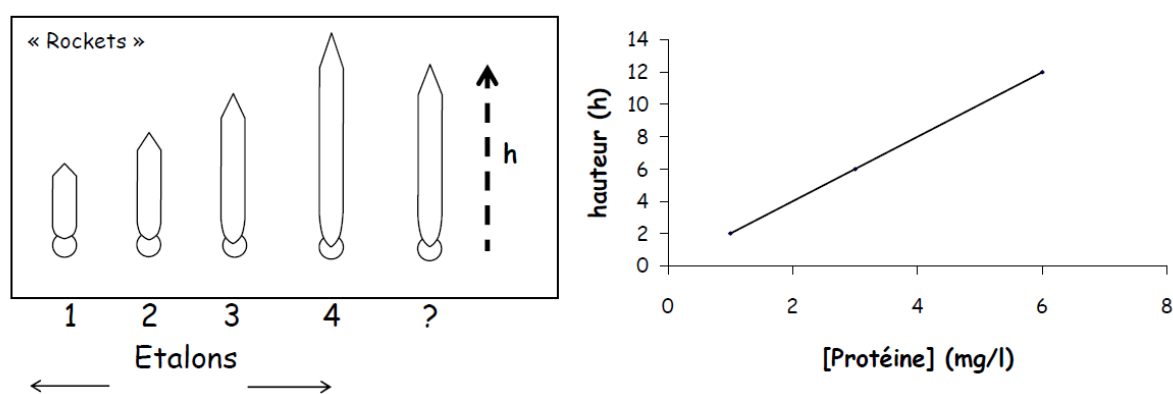
A. LA REACTION DE PRÉCIPITATION

1 : En milieu liquide : le test de l'anneau (« Ring Test »)

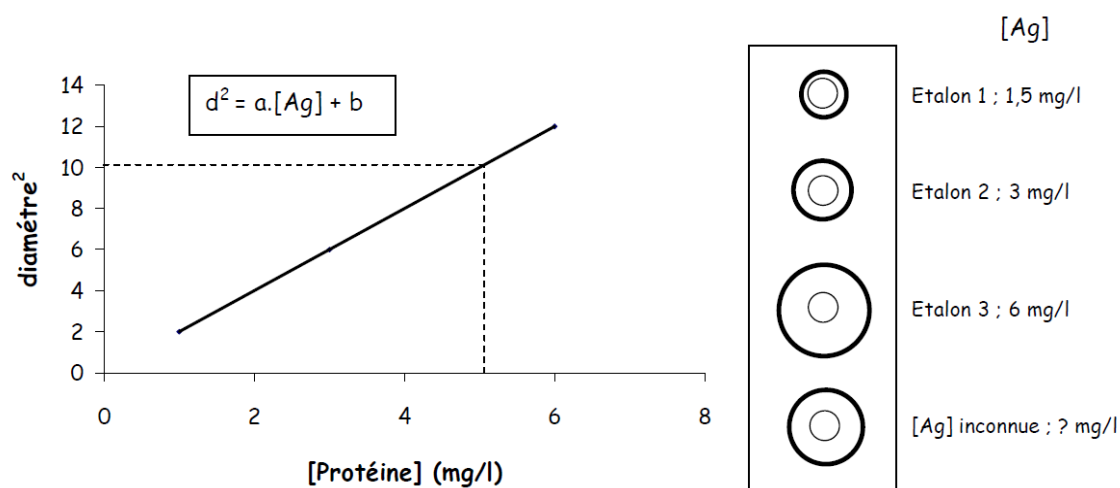


EN MILIEU GELIFIÉ :

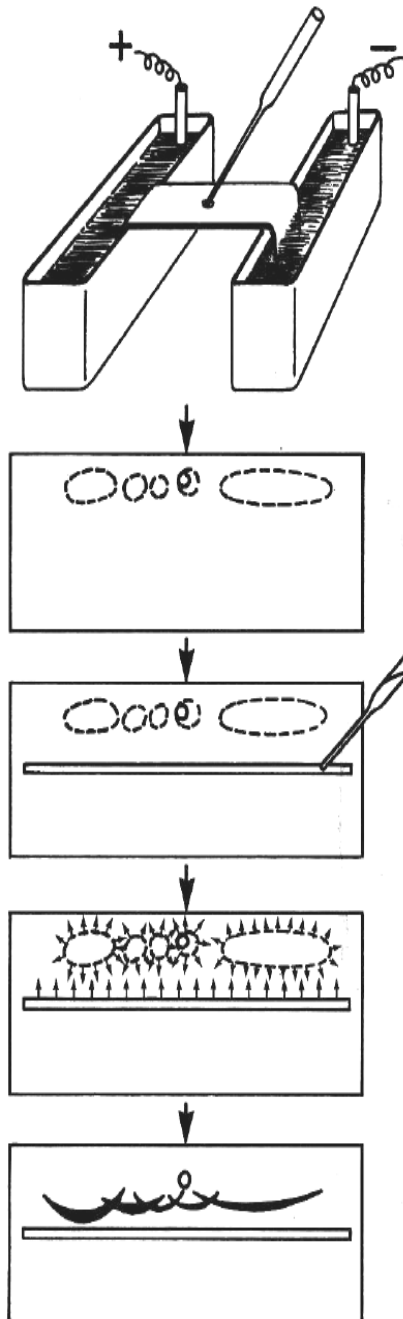
ELECTRIIMMUNODIFFUSION (LAURELL, MANCINI ET OUCHTERLONY))



La hauteur des «fusées» (lignes de précipitation) est proportionnelle à la [Ag].



× *Immuno-électrophorèse (Grabar et Williams)*



Cette technique renforce le pouvoir analytique des doubles diffusions en identifiant les constituants d'un mélange par 2 propriétés indépendantes, leur **mobilité électrophorétique** et leur **spécificité antigénique**.

⇒ 1^{er} tps ; un mélange d'Ag est soumis à un champ électrique (de 5 à 8 V) le long duquel les constituants se répartissent en fonction de leur mobilité électrophorétique.

(Tampon Véronal-Tris)

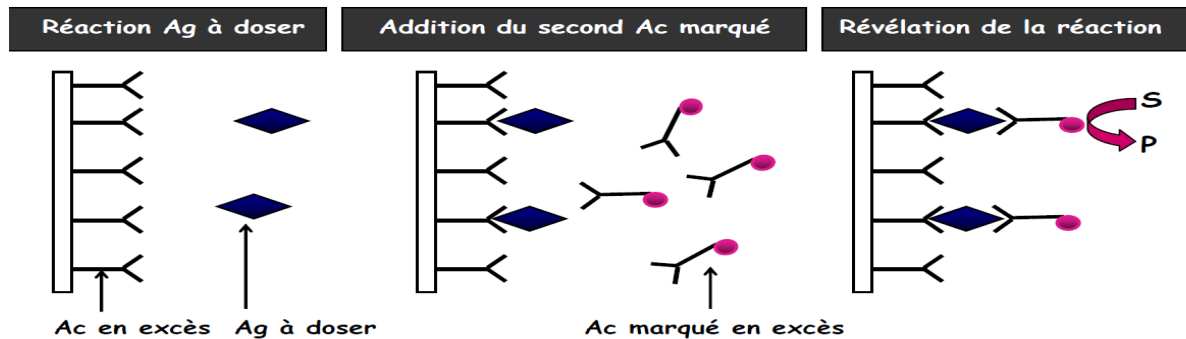
2^e tps ; un immunosérum polyspécifique diffuse dans un sens perpendiculaire à celui de la piste électrophorétique dont les fractions diffusent en sens inverse.

L'exploitation des résultats est basée sur celle de la technique d'Ouchterlony.

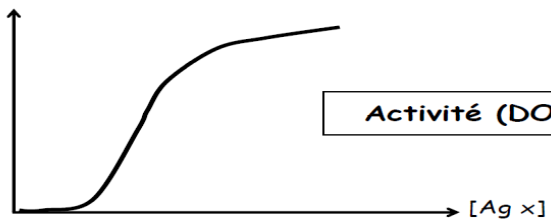
A - IMMUNOENZYMOLOGIE

* Méthode en « sandwich »

S'applique aux Ag possédant au moins 2 épitopes (identiques ou non)



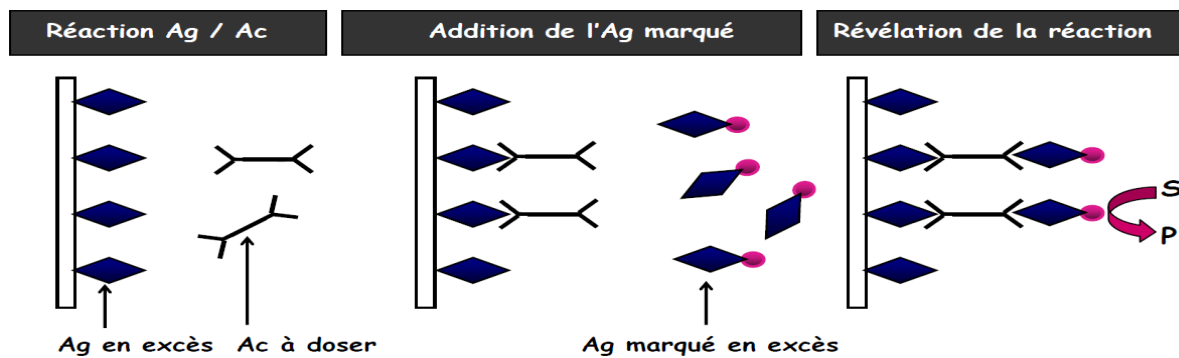
Activité enzymatique
liée au support (DO)



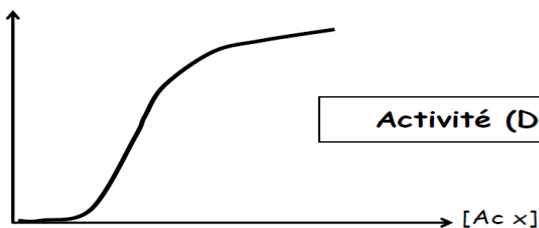
$$\text{Activité (DO)} = k \cdot [\text{Ag } x]$$

* Directe : Dosage immuno-enzymométrique ou IEMA

* Indirecte avec Ag marqué

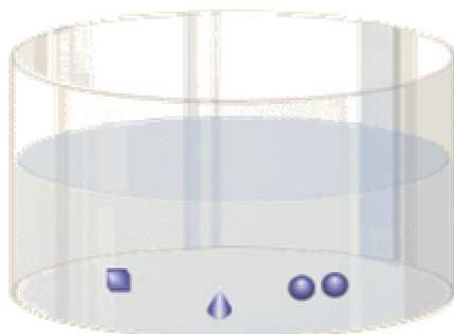


Activité enzymatique
liée au support (DO)

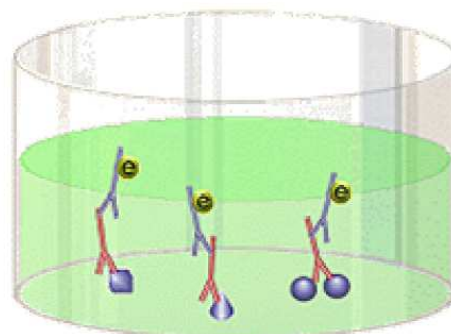


$$\text{Activité (DO)} = k \cdot [\text{Ac}]$$

× Indirecte avec Ac secondaire marqué

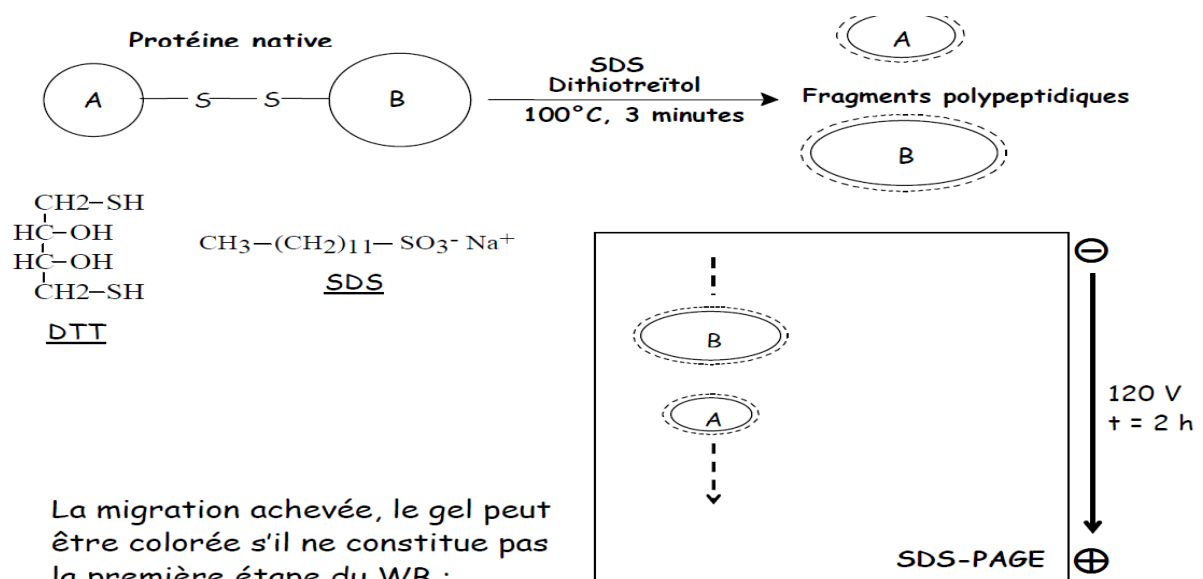


Puits négatif



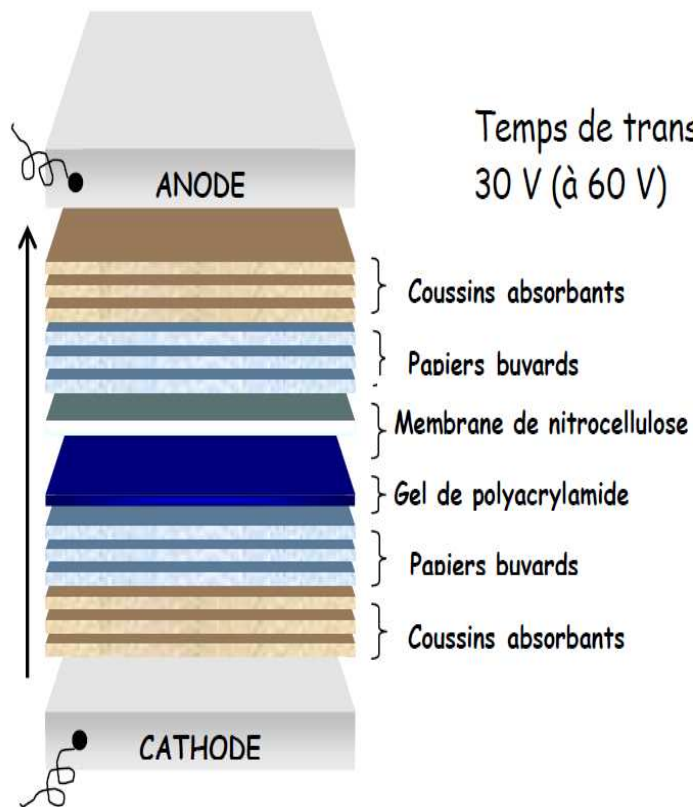
Puits positif

TECHNIQUES DERIVES (WESTERN BLOT)



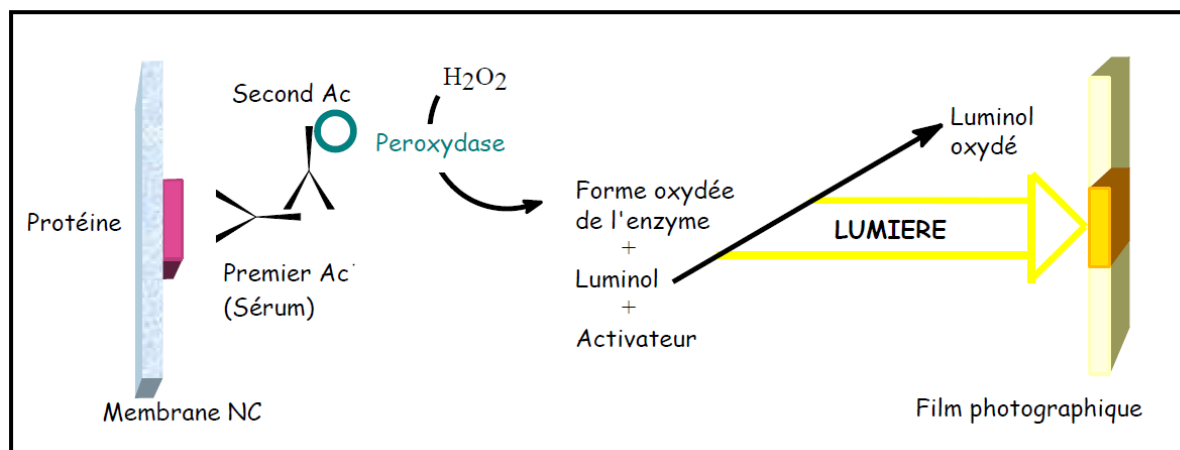
La migration achevée, le gel peut être colorée s'il ne constitue pas la première étape du WB :

Bleu de Coomassie (0,2 à 0,5 µg de protéine / piste), nitrate d'argent (0,01 à 0,05 µg de protéine / piste)...



Temps de transfert : 2 h (à 18 h), voltage
30 V (à 60 V)

Le tampon de transfert contient du méthanol qui augmente la capacité de la NC à absorber les protéines, et empêche le gel de gonfler



TECHNIQUES DERIVES DE LIMMUNOFLUORESCENCE (CYTOMETRIE EN FLUX)

