

Université Mohammed V-Agdal
Faculté des Sciences – Rabat



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biochimie-Immunologie



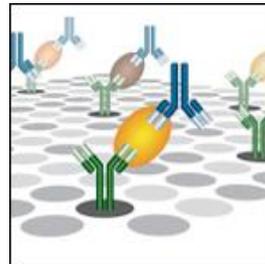
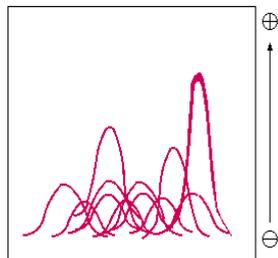
Filière SVI

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 RÉACTION D' AGGLUTINATION

B. LA RÉACTION DE NEUTRALISATION

C. LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION

1- EN MILIEU LIQUIDE :

-IMMUNO NÉPHÉLÉMÉTRIE

-IMMUNO TURBIDIMÉTRIE

2- EN MILIEU GÉLIFIÉ :

- IMMUN DIFFUSION DOUBLE (OUCHTERLONY)

- IMMUN DIFFUSION RADIALE (MANCINI)

- ELECTRO-IMMUNODIFFUSION (LAURELL)

- IMMUNOÉLECTROPHORÈSE

- 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)

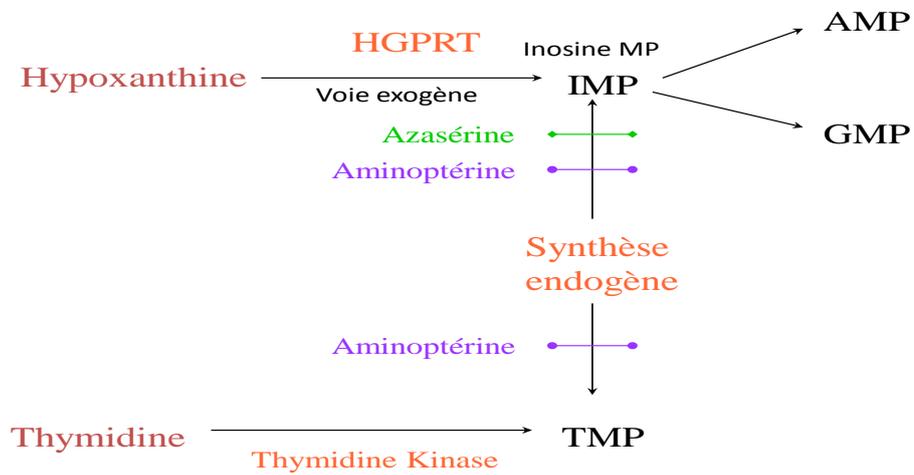
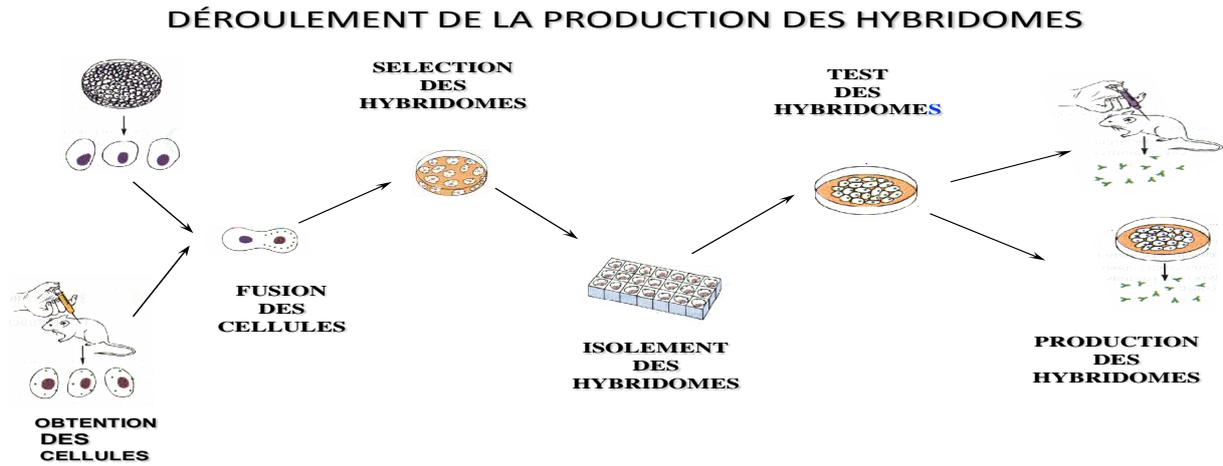
C - RADIOIMMUNOLOGIE

A CONSULTER :

[HTTP://ISPB.UNIV-LYON1.FR/ETUDIANT/COURS_3A/TP3.PDF](http://ispb.univ-lyon1.fr/etudiant/cours_3a/tp3.pdf)

[HTTP://WWW.USS-LAOS.ORG/UMVF/CAMPUS-IMMUNOLOGIE/WWW.ASSIM.REFER.ORG/TECHNIQ.PDF](http://www.uss-laos.org/umvf/campus-immunologie/www.assim.refer.org/techniq.pdf)

I / TECHNIQUE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX



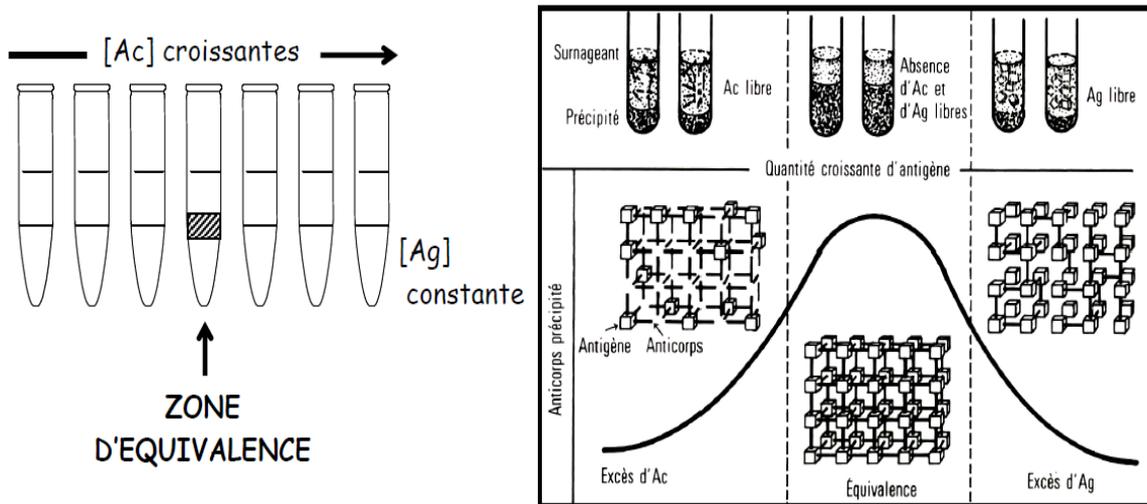
Milieu HAT : Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine

Milieu Haza : Hypoxanthine, azasérine



A. LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION

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

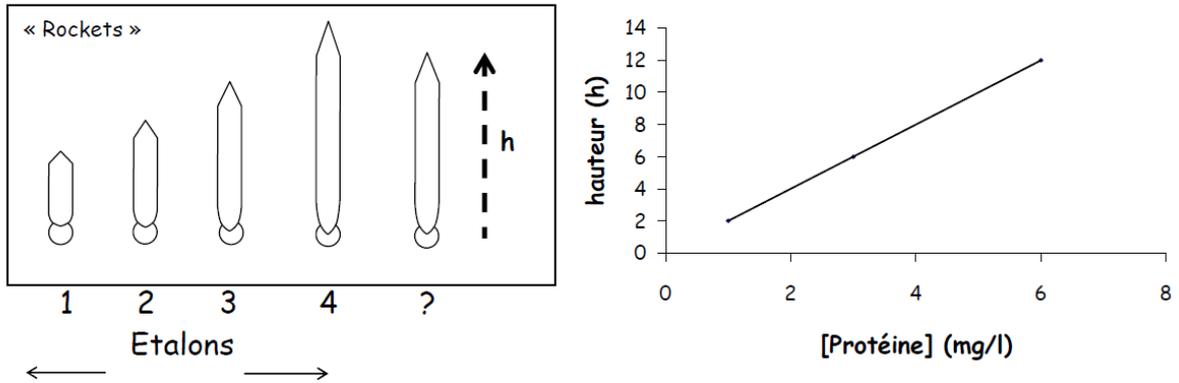


2 : EN MILIEU GÉLIFIÉ :

2.1 IMMUNODIFFUSION DOUBLE (OUCHTERLONY)

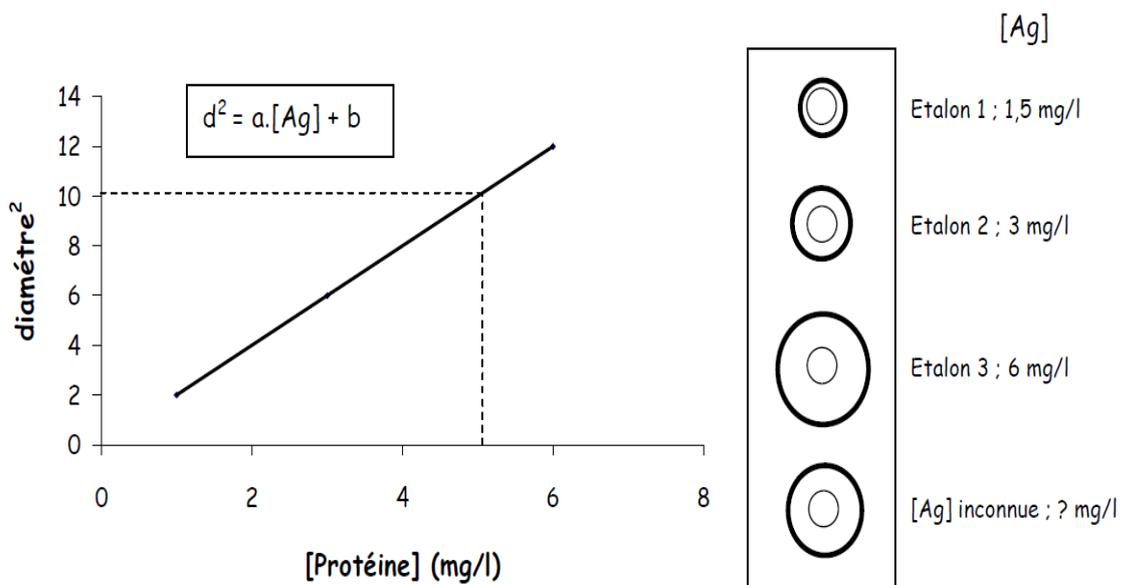
IDENTITE	OUI	NON	PARTIELLE
<p>Antigènes</p> <p>Ag</p> <p>↓</p> <p>↑</p> <p>Ac</p> <p>Anticorps</p>	<p>Ag A</p> <p>Ag B</p> <p>Ac anti-A</p>	<p>Ag A</p> <p>Ag B</p> <p>Ac anti-A</p> <p>Ac anti-B</p>	<p>Ag A</p> <p>Ag B</p> <p>Ac anti-B</p>
		<p>Les Ag A et B n'ont aucun déterminant antigénique commun</p>	<p>Les Ag A et B possèdent des épitopes communs</p>

2.2 IMMUNODIFUSION LAURELL



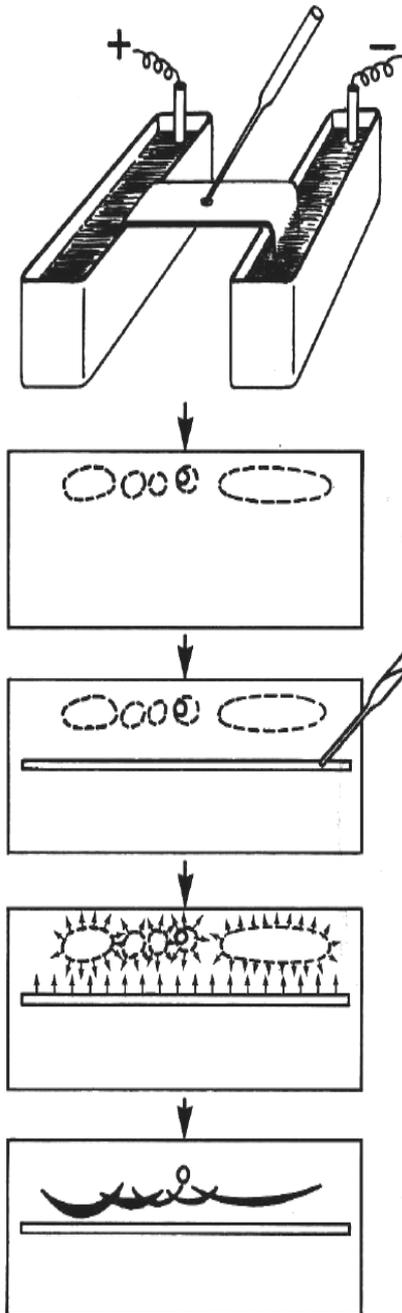
La hauteur des « fusées » (lignes de précipitation) est proportionnelle à la [Ag].

2.3 IMMUNODIFUSION RADIALE (MANCINI)



2.3 IMMUNO ELECTRIIMMUNODIFFUSION

* *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)

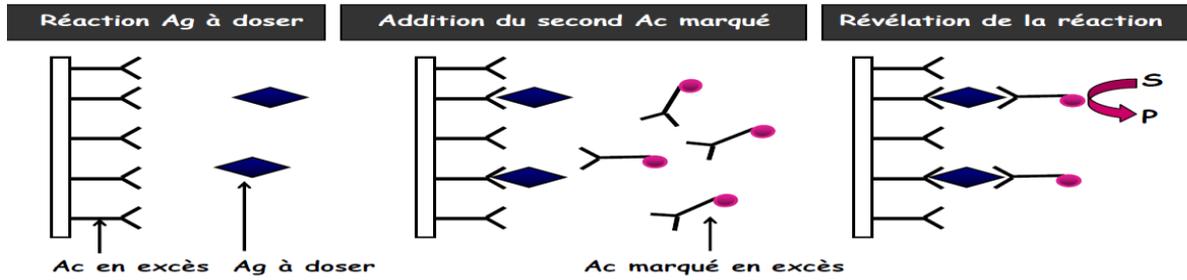
2^e tps ; un immunosérum polyspécifique diffuse dans un sens perpendiculaire à celui de la piste électrophorétique dont les fractions diffusent en sens inverse.

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

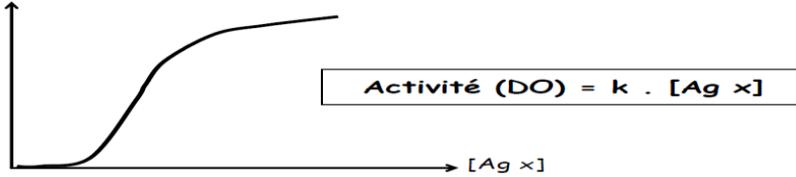
A - IMMUNOENZYMOLOGIE

* Méthode en « sandwich »

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

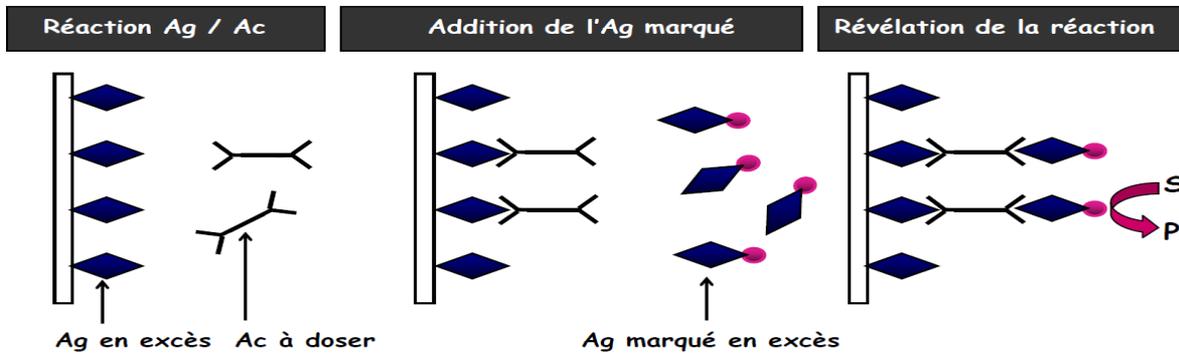


Activité enzymatique liée au support (DO)

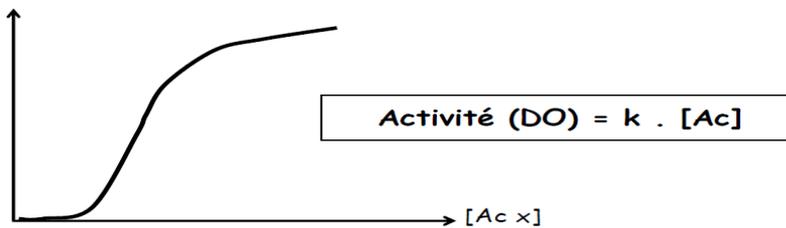


* **Directe** : Dosage immuno-enzymométrique ou IEMA

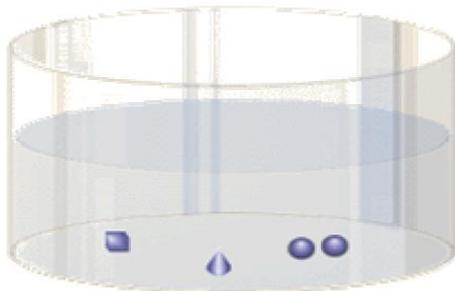
* Indirecte avec Ag marqué



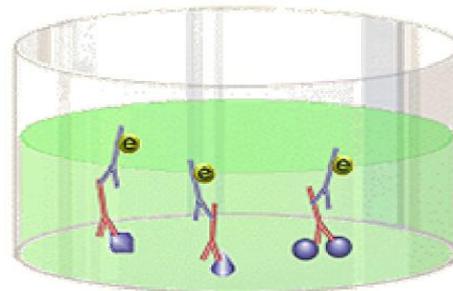
Activité enzymatique liée au support (DO)



× Indirecte avec Ac secondaire marqué

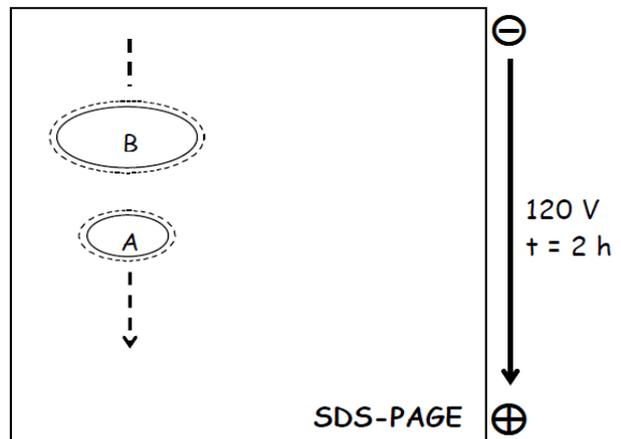
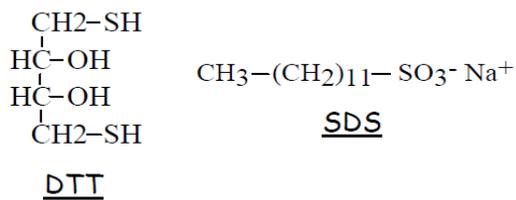
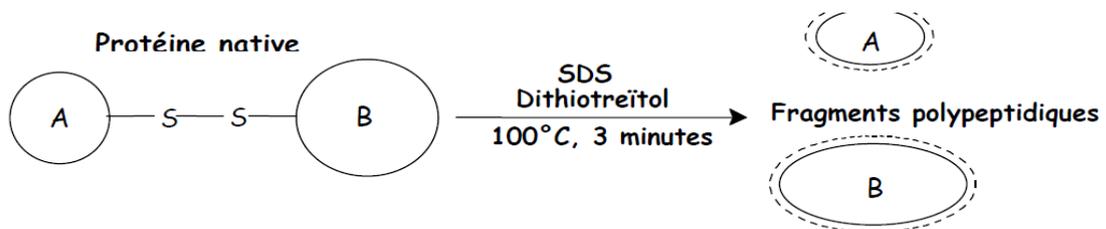


Puits négatif



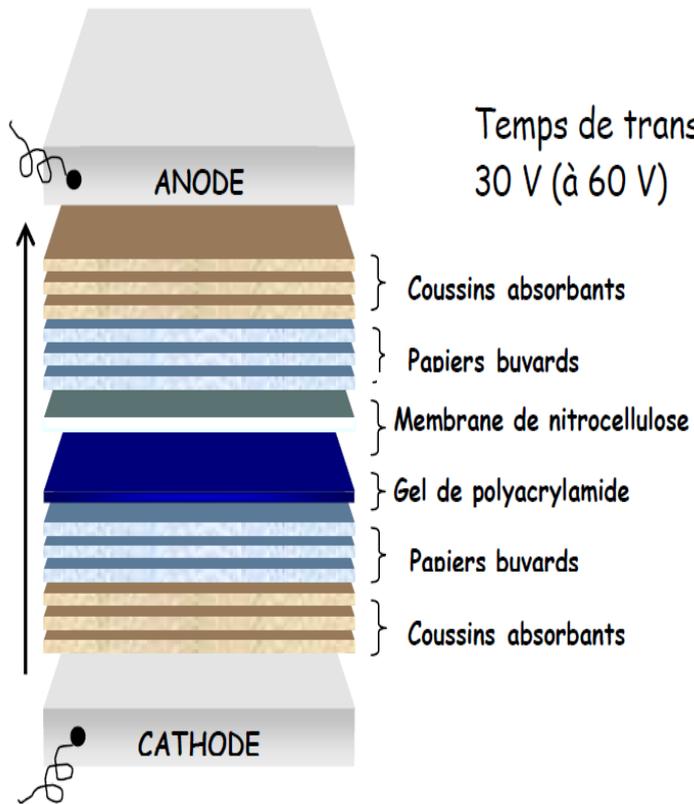
Puits positif

TECHNIQUES DÉRIVÉS (WESTERN BLOT)



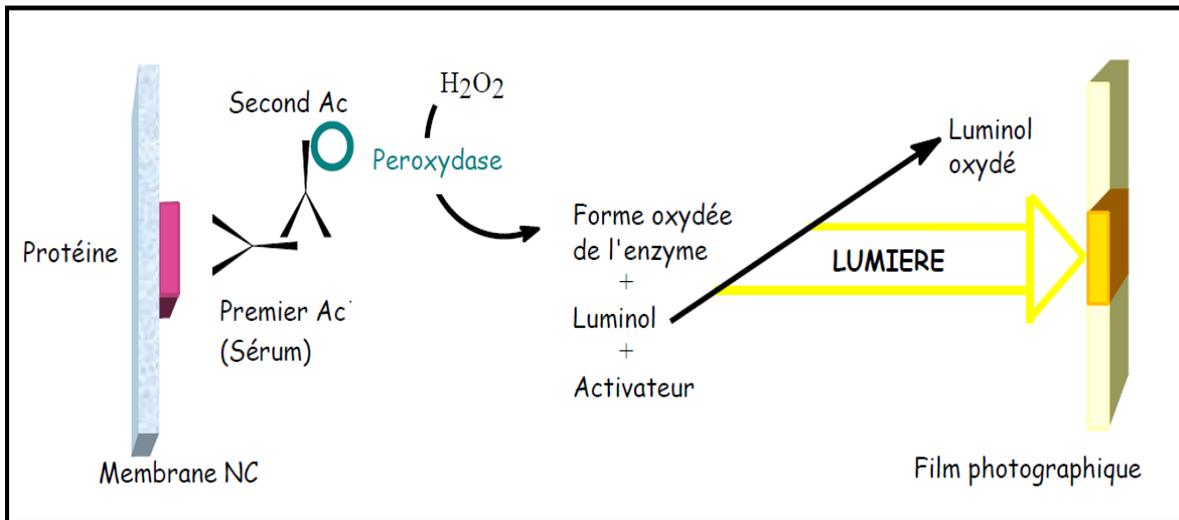
La migration achevée, le gel peut être colorée s'il ne constitue pas la première étape du WB :

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)

