

PRÉPA PHARMA

IMMUNOLOGIE

ADRIEN MELAYE | VICTOIRE SADOWICZ



Réussir
l'internat
en pharmacie

deboeck **B**
SUPÉRIEUR

Adrien Melaye | Victoire Sadowicz

Immunologie

Pour toute information sur notre fonds et les nouveautés
dans votre domaine de spécialisation, consultez notre site web :

www.deboecksuperieur.com

© De Boeck Supérieur s.a., 2021
Rue du Bosquet, 7
B-1348 Louvain-la-Neuve

Tous droits réservés pour tous pays.

Il est interdit, sauf accord préalable et écrit de l'éditeur, de reproduire (notamment par photocopie) partiellement ou totalement le présent ouvrage, de le stocker dans une banque de données ou de le communiquer au public, sous quelque forme ou de quelque manière que ce soit.

Dépôt légal :
Bibliothèque nationale, Paris : octobre 2021
Bibliothèque royale de Belgique : 2021/13647/154
ISBN : 978-2-8073-3953-8

Section I : Sciences mathématiques, physiques et chimiques

Item 15 Méthodes utilisant la réaction antigène-anticorps.....	3
--	---

Section II : Sciences de la Vie

Item 25 (+ Section IV question 22) Groupes sanguins A, B, O, systèmes Rhésus et Kell ...	15
Item 27 Structure et propriétés des immunoglobulines	25
Item 28 (+ Section IV question 35) Immunité innée et inflammation	31
Item 29 Complexe majeur d'histocompatibilité et présentation de l'antigène	53
Item 30 Organes et cellules de la réponse immunitaire.....	57
Item 31 Réponses immunitaires adaptatives humorales et cellulaires et leurs régulations.....	67

Section IV : Éléments de séméiologie et de pathologie. Biologie appliquée à la clinique

Item 32 Asthme et allergies.....	77
Item 33 Maladies auto-immunes : polyarthrite rhumatoïde et lupus systémique.....	99
Item 34 Déficits immunitaires congénitaux	115

Section V : Sciences du Médicament

Item 38 Immunosuppresseurs	131
Item 57 (+ Section III question 3) Production et utilisation des vaccins (hépatite B, ROR, tétanos, grippe).....	155
Item 58 Production et utilisation des anticorps monoclonaux.....	163

Ag : Antigène	KHPM : Kininogène de Haut Poids Moléculaire
Ac : Anticorps	KIR : Killer cell Ig like Receptor
ADCC : Cytotoxicité dépendante des Ac	LB : Lymphocyte B
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien	LNK : Lymphocyte NK
BCR : B-cell receptor	LT : Lymphocyte T
CD : Cluster of Differentiation	LPS : Lipopolysaccharide
CDR : Complementarity determining regions	MALT : Tissus lymphoïde associé aux muqueuses
CFU : Colony Forming Unit	MASP : MBL Associated Serine Protease
CLR : Récepteur de type Lectines de type C (C-type lectin receptor)	MBL : Mannose Binding Lectin
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	MC : Minéralocorticoïdes
CPAg : Cellule présentatrice d'antigène	MINCLE : Macrophage-Inductible C-type lectin
CRD : Domaine de reconnaissance des carbohydrates	MPO : Myeloperoxydase
CRP : C-réactif protéin	NBT : Test au nitro blue tetrazolium
CSH : Cellule souche hématopoïétique	NFS : Numération formule sanguine
DA : Dermatite atopique	NLR : NOD-like receptor = Récepteur de type NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein)
DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific ICAM-Grabbing Non-integrin	PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern = Motif moléculaire associé aux pathogènes
Dectine : Dendritic Cell associated C type lectin 1	PNB : Polynucléaire basophile
DHR : Test par digydrorhodamine	PNEo : Polynucléaire éosinophile
DI : Déficit immunitaire	PNN : Polynucléaire neutrophile
DRO : dérivés réactifs de l'oxygène	PRR : Pattern Recognition Receptor = Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
DT1 : Diabète de type 1	PTX3 : Pentraxine 3
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	RAI : Recherche des Agglutinines Irrégulières
EI : Effet indésirable	Rh : Rhésus
FR : Framework	RIA : Radio immune assay (dosage radio-immunologique)
GC : Glucocorticoïdes	RLR : RIG-like receptor = Récepteur de type RIG (Retinoic acid Inducible Gene)
GR : Globule rouge	RNI : Reactive Nitrogen Intermediate
GVH : Graft Versus Hote	SA : Semaine d'aménorrhée
Hb : Hémoglobine	SAP : Sérum Amyloid P
HLA : Human Leukocyte Antigen	SC : Sous cutanée
HS : Hypersensibilité	SCF : Facteur des cellules souches
IDM : Infarctus du myocarde	SMD : Syndrome myélodysplasique
IFI : Immunofluorescence indirect	SNC : Système nerveux centrale
IFN : Interféron	SR : Scavenger receptor = Récepteur d'épuration
Ig : Immunoglobuline	TAP : Transporteur Associated with Antigen Processing
IL : Interleukine	TCR : T Cell Receptor
IMG : Interruption médicale de grossesse	TDA : Test Direct à l'Antiglobuline
IV : Intraveineux	TIR : Toll/IL-1 receptor
IVG : Interruption volontaire de grossesse	
KBPM : Kininogène de Bas Poids Moléculaire	

Lexique

TLR : Toll-like receptor = Récepteur de type toll

TTL : Test de Transformation Lymphoblastique

VS : Vitesse de sédimentation

Section I :
Sciences
mathématiques,
physiques
et chimiques

Item 15

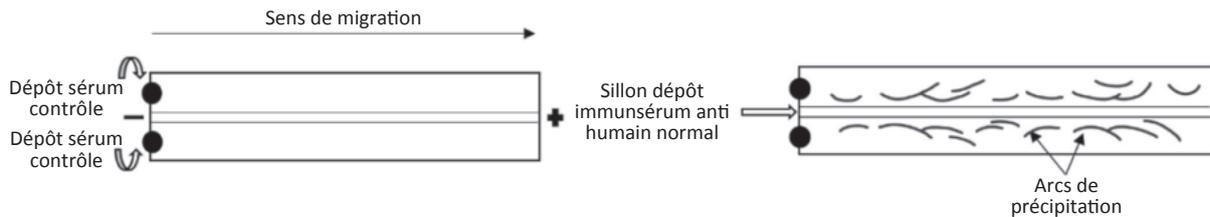
Méthodes utilisant la réaction
antigène-anticorps

I. Techniques dans un milieu gélifié

1) Immunoélectrophorèse

Méthode qualitative et séparative en double diffusion-précipitation réalisée en 3 temps :

- Electrophorèse des protéines sériques : application d'un champ électrique sur gel d'agarose qui permet la migration des protéines selon leurs masses moléculaires et leurs charges.
- Diffusion : lorsque la migration est complète, on vient créer un sillon le long de ce gel pour y insérer un **immunsérum polyvalent anti-sérum humain normal** qui se diffusera perpendiculairement au sillon
- Précipitation : après incubation de 48 h, détection des **arcs de précipitation** (= couple antigène/anticorps)
→ *Tous les arcs seront différents et spécifiques d'une protéine*



Intérêts	Inconvénients
Permet d'apprécier qualitativement la baisse, l'augmentation voire l'absence de certaines protéines utiles au diagnostic de certaines pathologies	<ul style="list-style-type: none"> – Délai de quelques jours – Technique difficilement automatisable – Risque d'erreur de manipulation humaine – Nécessité d'une connaissance pointue pour apprécier les résultats

2) Immunofixation

L'immunoélectrophorèse peut être approfondie en utilisant par la suite des antisérums monospécifiques pour affiner la caractérisation en se basant sur le même principe :

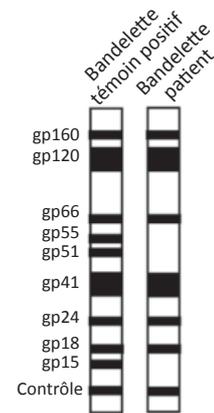
- Electrophorèse des protéines sériques
- Individualisation des protéines sur gel : ajouts **d'antisérums monospécifiques** (exemples : antichaines légères kappa, antichaines légères lambda, antichaines lourdes...)
- Migration, précipitation, lavage et révélation à l'aide d'un colorant pour apprécier la présence ou non de bandes diffuses (Ig polyclonale) ou étroites (Ig monoclonale)

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Identifier une immunoglobuline monoclonale : détermination de la classe (IgG, IgM ou IgA) et le type de chaînes légères associées (kappa, lambda) – Lecture plus simple – Rapidité des résultats (quelques heures) – Technique plus sensible que l'immunoélectrophorèse 	<ul style="list-style-type: none"> – Pas d'aspect quantitatif – Risque d'erreur de manipulation humaine – Sensibilités des antisérums variables

3) Western Blot = immunotransfert

Permet la détection spécifique de protéines en différentes étapes :

- Electrophorèse des **protéines d'intérêt** provenant d'un lysat cellulaire
- Transfert des protéines sur une membrane, le plus souvent de nitrocellulose ou SDS-PAGE, les protéines se fixeront à cette membrane en gardant la même conformation de migration
- Ajout d'anticorps primaires spécifiques de ces protéines
- Ajout d'anticorps secondaires anti-immunoglobuline humaine qui seront marqués à une enzyme ou un fluorochrome permettant la révélation par bandes colorées



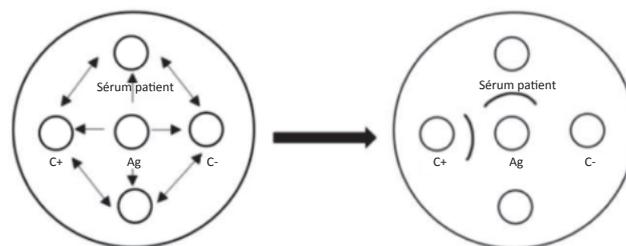
Exemple : confirmation diagnostique lors d'une recherche de séropositivité VIH

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Technique très souvent utilisée pour la confirmation diagnostique d'infections (VIH, maladie de Lyme...) – Permet le suivi de certains traitements (exemple : diminution d'une protéine ciblée par un médicament) 	<ul style="list-style-type: none"> – Technique indirecte délicate – Délai de réponse un peu long – Possibles réactions croisées

4) Réaction d'Ouchterlony = immunodiffusion double

C'est une méthode qualitative de double diffusion sur un disque de gélose, le plus souvent un gel d'Agar. Elle permet la recherche d'**anticorps spécifiques** d'un patient face à un antigène donné.

- Cas 1 :
Puit central : solution d'un antigène donné (Ag)
Puits équidistants : sérum contrôle négatif (C-), sérum contrôle positif (C+), sérum d'un patient à tester
- Cas 2 :
Puit central : sérum à tester
Puits équidistants : différents antigènes à tester, un contrôle positif



La solution antigénique diffusera de façon homogène dans tous les sens et lorsqu'il y aura rencontre avec des anticorps spécifiques, il y aura formation de complexes immuns qui se traduiront par un arc de précipitation.

NB : l'électrosynérèse = immunodiffusion double mais accélérée par un champ électrique qui accélère la migration.

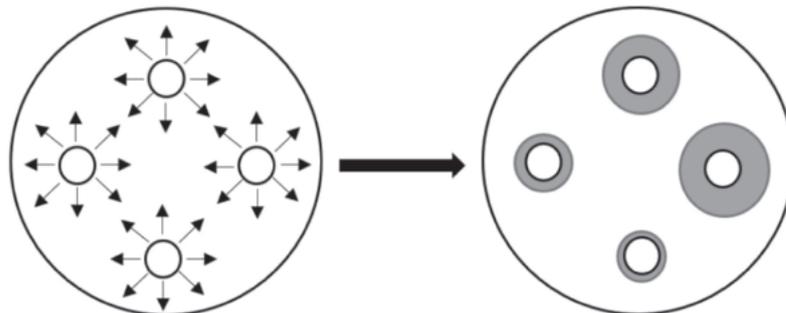
Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Permet de caractériser la spécificité de la relation antigène-anticorps – Permet aussi de caractériser l'identité d'un antigène en fonction de l'allure de l'arc de précipitation : l'identité peut être totale, partielle ou nulle : appréciation des réactions croisées entre antigènes, relations entre les microorganismes 	<ul style="list-style-type: none"> – Délai de réponse de 24 h-48 h – Risque d'erreur de manipulation humaine – Difficultés d'interprétations à l'œil nu

5) Technique de Mancini = immunodiffusion radiale simple

Méthode **quantitative** qui permet la quantification d'une concentration en **antigène** dans une solution. Elle est basée sur l'utilisation d'un gel qui contient une concentration en anticorps connue, constante et homogène au sein du gel.

→ C'est pourquoi elle est appelée *diffusion radiale simple* : seul l'antigène diffusera.

- Préparation d'un gel qui contient les anticorps anti-antigènes.
- Préparation d'une gamme étalon pour réaliser une courbe d'étalonnage.
- Formation de différents puits contenant les solutions d'antigènes diluées de concentrations connues.
- Dépôt dans un puit de la solution contenant l'antigène à quantifier.
- Il y aura une diffusion des solutions d'antigènes au sein du gel, lorsque la concentration de l'antigène sera au terme de sa zone d'équivalence avec la concentration en anticorps, se formera un cercle de précipitation (marqueur de la liaison anticorps-antigène) dont le diamètre sera directement proportionnel à la quantité de l'antigène.
- Le résultat sera trouvé grâce à la courbe d'étalonnage.



Formation de 4 puits : 3 avec des concentrations connues d'antigène puis 1 à rechercher

Diffusion et formation des cercles de précipitation

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Permet de quantifier la concentration en antigène d'une solution 	<ul style="list-style-type: none"> – Délai de réponse de 24 h-48 h – Risque d'erreur de manipulation humaine – Difficultés d'interprétations à l'œil nu

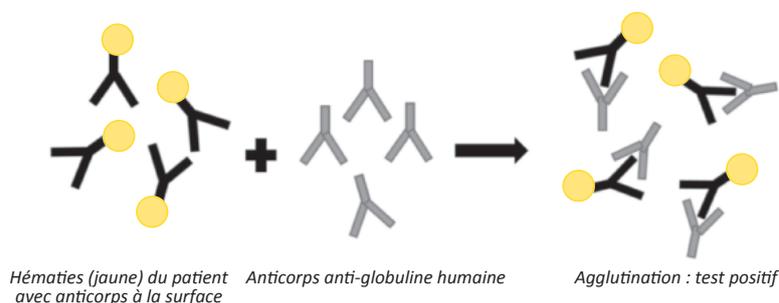
NB : technique de Laurell = immunodiffusion radiale simple accélérée par un champ électrique

II. Techniques d'agglutination

1) Test de Coombs direct = test direct à l'anti-globuline (TDA)

Méthode **qualitative d'agglutination** utilisée le plus souvent dans la démarche diagnostique d'une **hémolyse** par la recherche des anticorps à la surface d'une hématie.

- Hématies du patient lavées (élimination immunoglobulines plasmatiques du patient)
- Mise en contact avec le réactif de Coombs qui contient des **anticorps anti-immunoglobuline humaine** (ex : de lapin) : on peut soit utiliser des anticorps anti-globuline **polyvalents** (reconnaissance IgM, IgG, IgA), ou **monospécifiques** (reconnaissance IgM ou IgG : permet de typer l'anémie).
- On peut aussi mettre en évidence des fractions du **complément** sur les hématies (C3b)



Hématies (jaune) du patient avec anticorps à la surface

Anticorps anti-globuline humaine

Agglutination : test positif

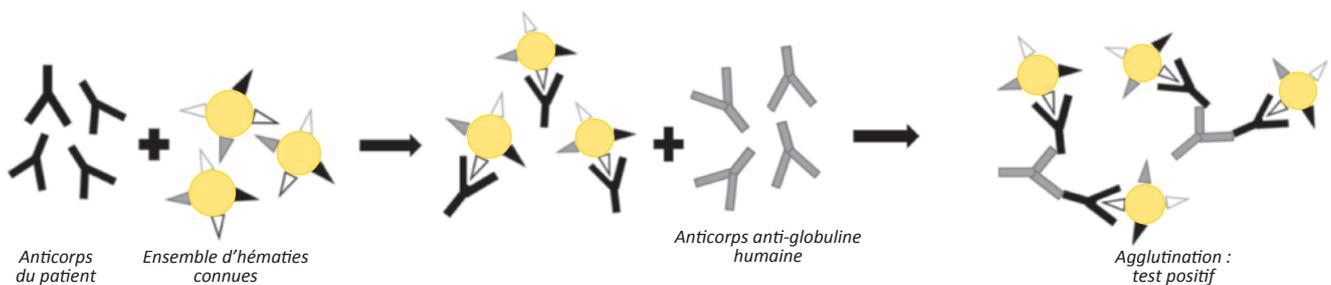
Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Méthode très sensible (90-95 %) – Utilisée dans la recherche d'une anémie hémolytique du nouveau-né, d'une anémie immuno-allergique, d'allo-immunisation lors d'erreur transfusionnelle – Examen clé d'une anémie hémolytique auto-immune 	<ul style="list-style-type: none"> – Risques de faux positifs ou faux négatifs – Techniques en tube ou en gel dont les résultats peuvent varier en fonction des réactifs utilisés ou dont les résultats peuvent être différents pour une même recherche selon la technique utilisée

2) Test de Coombs indirect = test indirect à l'anti-globuline

Méthode **quantitative** réalisée si le test de Coombs direct est positif. Elle est basée sur le même principe **d'agglutination** que précédemment, ici on ne prend que le sérum du patient contenant ses anticorps et non ses hématies.

- Sérum du patient
- Mise en contact avec **différentes hématies sensibilisées** présentant des antigènes connus à leur surface.
- Ajout d'anticorps anti-globuline humaine et recherche d'une agglutination
- Quantification par dilutions du sérum : permet aussi de visualiser dans le temps des taux d'anticorps : résultats exprimés en **titre** (inverse de la dernière dilution positive)

Permet d'affiner les réponses obtenues lors d'un Coombs direct, peut préciser le type d'anticorps mis en jeu et de le quantifier.



Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Aspects qualitatif et quantitatif : détermine la nature des anticorps et leur spécificité – Permet le suivi de l'évolution des taux d'anticorps dans le temps – Diagnostic allo-immunisation anti-rhésus chez la mère lors d'incompatibilité rhésus +/-rhésus – – Recherche des agglutinines irrégulières (RAI) 	<ul style="list-style-type: none"> – Risques de faux positifs ou faux négatifs – Technique un peu plus longue que le Coombs direct, nécessité des dilutions pour le titrage

3) Test de Coombs plaquettaire (aussi Test de Dixon)

Méthode **qualitative** qui utilise le même principe que le Coombs direct cité précédemment mais basée sur l'utilisation des plaquettes et non plus des hématies : on recherche des auto-anticorps fixés sur les plaquettes.

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Test sensible – Confirmation diagnostique d'une thrombopénie auto-immune – Recherche d'une allo-immunisation post transfusionnelle 	<ul style="list-style-type: none"> – Risques de faux positifs ou faux négatifs – Prélèvement parfois difficile – Résultats dépendent du taux de plaquettes initial du patient

III. Techniques d'immunomarquage

1) Immunofluorescence

Méthode **qualitative** et **quantitative** de mise en évidence d'une protéine d'intérêt dans une cellule ou un tissu par marquage d'un antigène spécifique, à l'aide **d'anticorps**.

- **Qualitative** : utilisation d'un anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt
 - **Méthode directe** : l'anticorps **primaire** est directement couplé à un fluorochrome
 - **Méthode indirecte (IFI)** : utilisation d'un anticorps **secondaire** qui sera celui porteur d'un fluorochrome et qui reconnaîtra l'anticorps primaire
 - *C'est la plus utilisée : permet plusieurs marquages en même temps et l'intensité lumineuse est meilleure*
- **Quantitative** : l'intensité de la fluorescence perçue est corrélée à la quantité
 - Le fluorochrome sera excité par une lumière, ce qui permettra l'émission de la fluorescence, qui sera détectée au microscope à fluorescence.

➔ Méthode d'immunomarquage mais aussi d'immunodosage

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Méthode facile à réaliser, simple – Nombreux fluorochromes utilisables (fluorescéine, rhodamine...) – Utilisation dans de nombreux domaines médicaux – Permet le marquage mais aussi le dosage – Peut déterminer la présence d'une protéine, sa position dans la cellule/le tissu ou son absence 	<ul style="list-style-type: none"> – Risques de faux positifs ou faux négatifs – Possibles réactions croisées – Parfois réalisation en amont d'un photoblanchiment si l'élément de l'étude possède une fluorescence naturelle

2) Cytométrie en flux

Méthode analytique qui permet le comptage et de fournir les **caractéristiques** de différentes cellules (taille, forme, granulations...) présentes dans un même liquide. Cette technique peut utiliser différents anticorps marqués à des fluorochromes qui iront se fixer sur les antigènes présents à la surface de la cellule. Chaque cellule passe devant un laser et permet de directement fournir ces informations en se basant, en outre, sur l'intensité de la fluorescence émise, la déviation et la diffusion du faisceau de laser.

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Analyse rapide d'un très grand nombre de cellule en même temps – Permet un tri cellule rapide – Permet l'analyse de cellules rares ou délicates 	<ul style="list-style-type: none"> – Pas d'image à proprement parler des cellules – Nécessité des cellules en suspension

3) Immunoenzymologie

Méthode **qualitative** et **quantitative** basée sur le même principe que celui de la fluorescence mais on utilise ici une enzyme et la réaction avec son substrat.

- Le substrat de l'enzyme sera **chromogène** : il est initialement **incolore**
- L'enzyme catalysera la réaction et le substrat deviendra produit
- A ce moment-là, le produit émettra une couleur
- La densité optique du produit coloré sera mesurée par spectrophotométrie : en effet l'intensité de couleur sera proportionnelle à la quantité
 - *C'est la base de la technique ELISA, vue un peu plus loin dans le chapitre*

➔ Méthode d'immunomarquage mais aussi d'immunodosage

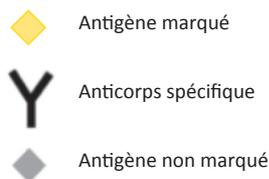
Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Méthode facile à réaliser, simple et sensible – Différentes enzymes utilisables (PAL, peroxydase, G6PD...) – Utilisation en immunohistochimie (tissus) ou immunocytochimie (cellules) – Couramment utilisée en routine 	<ul style="list-style-type: none"> – Limite de détection moins puissante que la radio-immunologie – Conditions du milieu à respecter pour que l'enzyme puisse catalyser sa réaction

4) Radio immuno assay = dosage radio-immunologique (RIA)

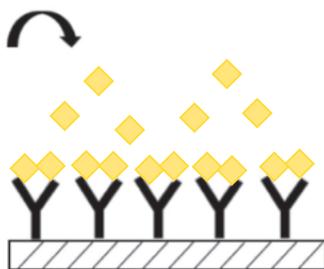
Méthode **qualitative** et **quantitative** par compétition ou l'on utilise les principes de radioactivité.

- On va **marquer des antigènes** à l'aide de radio isotope (le plus souvent de l'iode 125) qui seront dans une solution de concentration connue.
- On va les mettre en contact **d'anticorps spécifiques** de ces antigènes : formation de complexe immun.
- On ajoute à cette solution les mêmes antigènes **mais non marqués** à des concentrations connues : il y aura alors **compétition** entre les antigènes marqués et ceux non marqués
- Les antigènes marqués seront déplacés au profit de ceux non marqués qui se fixeront aux anticorps : au plus leur concentration augmentera, au plus la radioactivité diminuera
- Au fur et à mesure, sera mesurée la radioactivité par comptage gamma : cela permettra de réaliser une courbe d'étalonnage qui servira comme témoin pour mesurer la concentration en antigène dans le sérum du patient.

➔ Méthode d'immunomarquage mais aussi d'immunodosage



Ajout des antigènes marqués



Radioactivité à 100 %

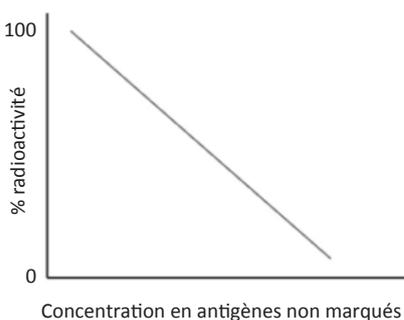
Ajout des antigènes non marqués



Compétition



Radioactivité à 0 %



Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Méthode très précise, sensible et spécifique – Permet de détecter un nombre très petit d'antigènes dans une solution donnée – Utilisations diverses : oncologie, suivi thérapeutique, recherche, quantification d'hormones, concentrations en médicaments... – Possibilité d'utilisation de différents radio isotopes : C14, H3, I125... 	<ul style="list-style-type: none"> – Première technique d'immunomarquage mise au point mais tend à disparaître en faveur de l'immunoenzymologie – Manipulation très particulière et nécessité de précautions – Nécessite des dilutions – Elimination des déchets radioactifs

IV. Techniques d'immunodosage

1) ELISA

La technique ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est basée sur le principe de l'immunoenzymologie vu plus haut.

Intérêts	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> – Méthode facile à réaliser, simple et sensible – Des solutions diluées permettent la quantification – Différentes enzymes utilisables (PAL, peroxydase, G6PD...) – Utilisation en immunohistochimie (tissus) ou immunocytochimie (cellules) – Couramment utilisée en routine – On peut aussi utiliser des billes plutôt que des puits 	<ul style="list-style-type: none"> – Limite de détection moins puissante que la radio-immunologie – Linéarité des résultats moins bonne que pour la radioactivité ou la fluorescence – Conditions du milieu à respecter pour que l'enzyme puisse catalyser sa réaction

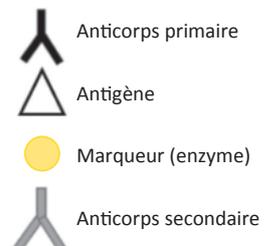
a) ELISA direct

Permet la détection et le dosage des **anticorps** :



ELISA direct

- Ajout d'antigènes spécifiques de l'anticorps recherché dans des puits, fixation au fond des puits puis lavage pour éliminer l'excédent d'antigènes.
- Réalisation de dilutions du sérum du patient contenant l'anticorps à doser
- Ajout des dilutions dans les différents puits : les anticorps iront se fixer sur leurs antigènes spécifiques puis lavage pour éliminer l'excédent d'anticorps. Ces anticorps sont directement marqués par une enzyme. Lavage pour éliminer l'excédent.
- Ajout d'un substrat incolore chromogène spécifique de l'enzyme qui sera catalysé en produit coloré qui permettra sa détection.



b) ELISA indirect

Permet la détection et le dosage des **anticorps** :

- Ajout d'antigènes spécifiques de l'anticorps recherché dans des puits, fixation au fond des puits puis lavage pour éliminer l'excédent d'antigènes.
- Réalisation de dilutions du sérum du patient contenant l'anticorps à doser.
- Ajout des dilutions dans les différents puits : les anticorps primaires iront se fixer sur leurs antigènes spécifiques. Lavage pour éliminer l'excédent d'anticorps.
- Ajout d'anticorps secondaires anti-immunoglobuline humaine (de lapin ou de souris) conjugués à une enzyme.
- Ajout d'un substrat incolore chromogène spécifique de l'enzyme qui sera catalysé en produit coloré qui permettra sa détection.



ELISA indirect

Réussir
l'internat
en pharmacie

IMMUNOLOGIE

Cet ouvrage regroupe toutes les sections comprenant les items du programme du concours national de l'internat de pharmacie :

- Section I, Sciences mathématiques, physiques et chimiques : item 15
- Section II, Sciences de la vie : item 25 + section IV item 22, item 27, item 28 + section IV item 35, item 29, item 30 et item 31
- Section IV, Eléments de séméiologie et de pathologie. Biologie appliquée à la clinique : item 32, item 33 et item 34
- Section V, Sciences du médicament : item 38, item 57 + section III item 3, item 58

Il aborde les bases de l'immunologie fondamentale, clinique et thérapeutique.

Ces fiches ont été conçues pour permettre aux étudiants préparant le concours national de l'internat de pharmacie, de savoir répondre aussi bien aux QCMs qu'aux cas cliniques.

Il peut cependant intéresser également les étudiants en santé apprenant les bases de l'immunologie.

Victoire Sadowicz et **Adrien Melaye**,
sont étudiants en pharmacie à l'université de Lille.



Dans la même collection



ISBN : 978-2-8073-3953-8



9 782807 339538

deboeck
SUPÉRIEUR

www.deboecksuperieur.com