Université d'Alger Benyoucef Benkhedda
Faculté de médecine

Réactions de précipitation

Module d'immunologie
3éme année Médecine

Dr S.TAGUEMOUNT
si.taguemount@gmail.com

Dr H.IGUERGUESDAOUNE
hamzaiguer@hotmail.fr

02-05/10/2022

PLAN:

I. Introduction:

II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

1. Bases moléculaires de la réaction Antigène-Anticorps
2. Caractéristiques de la réaction Antigène-Anticorps

III. Réactions d'immuno-précipitation:

1. Définition
2. Courbe de précipitation
3. Les techniques d'immuno-précipitation

3.1. Méthodes en milieu liquide
3.2. Méthodes en milieu gélifié

I. Introduction:

On regroupe sous le terme de méthodes immunochimiques toutes les méthodes basées sur la mise en évidence du complexe qui se forme lors de la réaction Ag avec son Ac spécifique.

Ces techniques sont utilisées pour détecter (analyse qualitative) et quantifier (analyse quantitative) , soit les antigènes, soit les anticorps.

Leurs applications sont nombreuses et ont été étendues à nombreuses autres disciplines.

II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

1. Bases moléculaires de la réaction Antigène-Anticorps

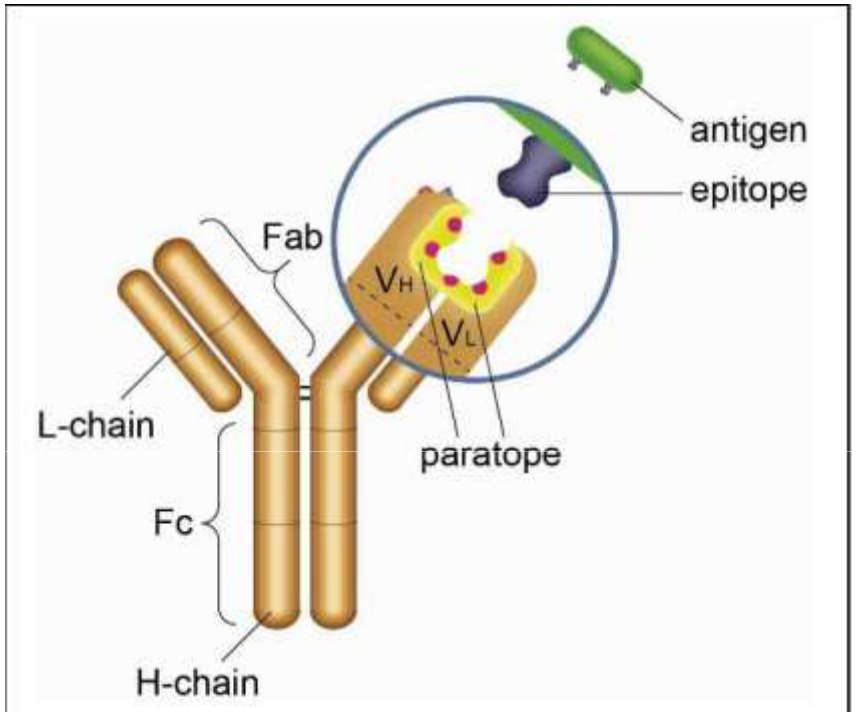


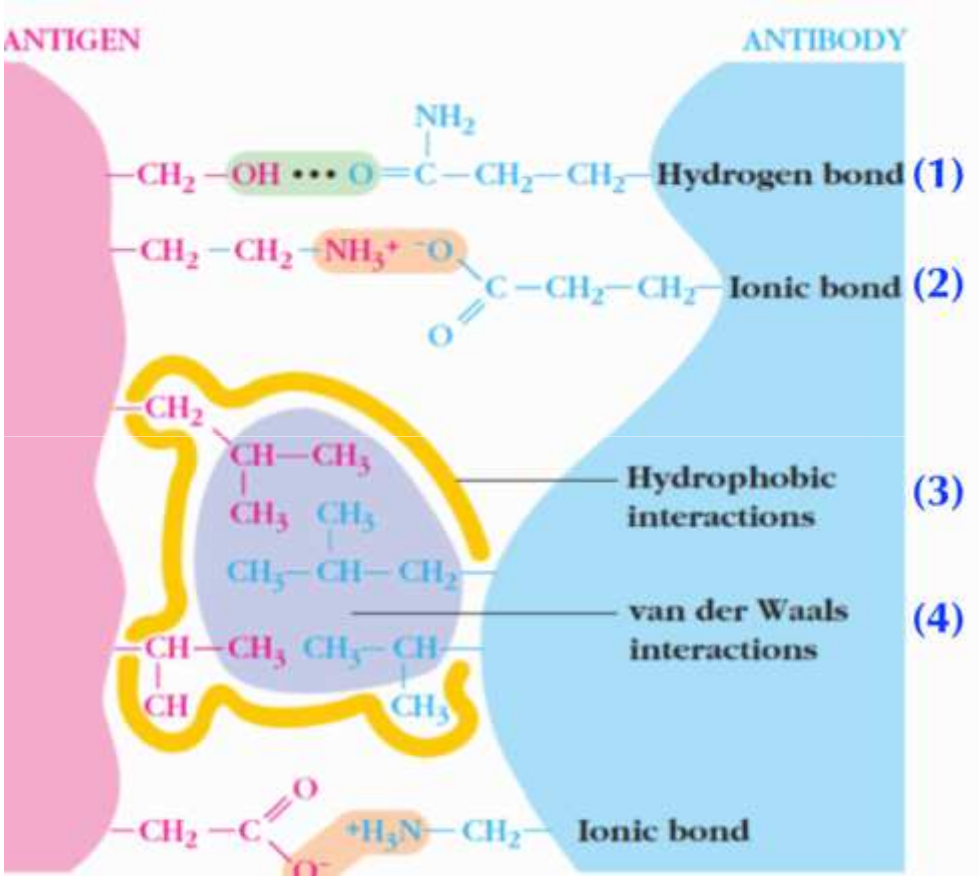
Figure 1. Interaction Ac-Ag

- **complémentarité stérique**
- **interactions non covalentes**
- **réversibles**

Les épitopes et paratopes engagent des **interactions non covalentes, et réversibles,** de type liaisons de van der Waals, liaisons hydrophobes, liaisons électrostatiques et liaisons hydrogène.

II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

1. Bases moléculaires de la réaction Antigène-Anticorps



liaisons hydrogène

liaisons électrostatiques

liaisons hydrophobes

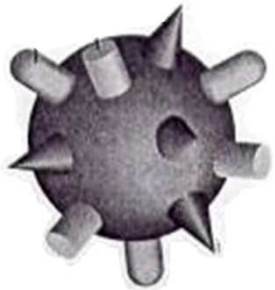
liaisons de van der Waals

Ces interactions dépendent de:

- **PH**
- **Concentration saline**
- **Température**

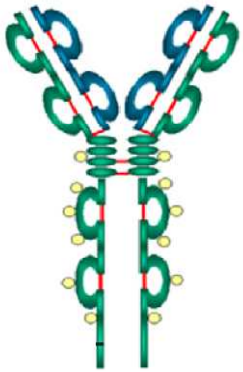
II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

1. Bases moléculaires de la réaction Antigène-Anticorps



Ag

- Immunogénicité
- Antigénicité



Ac

- molécule protéique
- spécifique de l'Ag

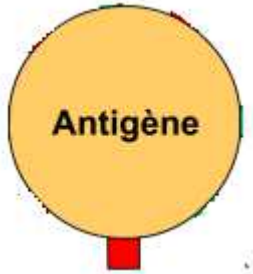
II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

Les antigènes:

1- Antigène univalent et uni-déterminé:

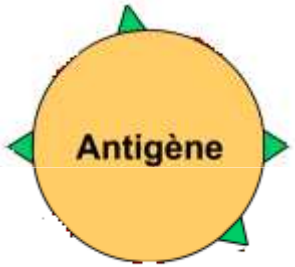
possède un seul épitope à la surface qui est capable de se lier à un anticorps.

Les haptènes sont univalent et uni-déterminé.



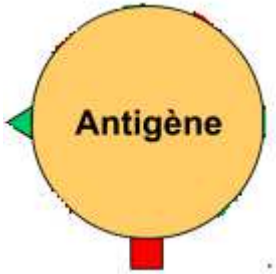
2- Antigène multivalent et uni-déterminé :

possède au moins deux épitopes du même type sur une molécule d'antigène.



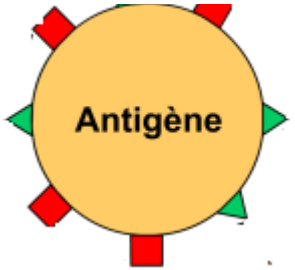
3- Antigène univalent et multi-déterminé :

présente plusieurs épitopes de différents types, mais seulement un de chaque type sur une molécule d'antigène.



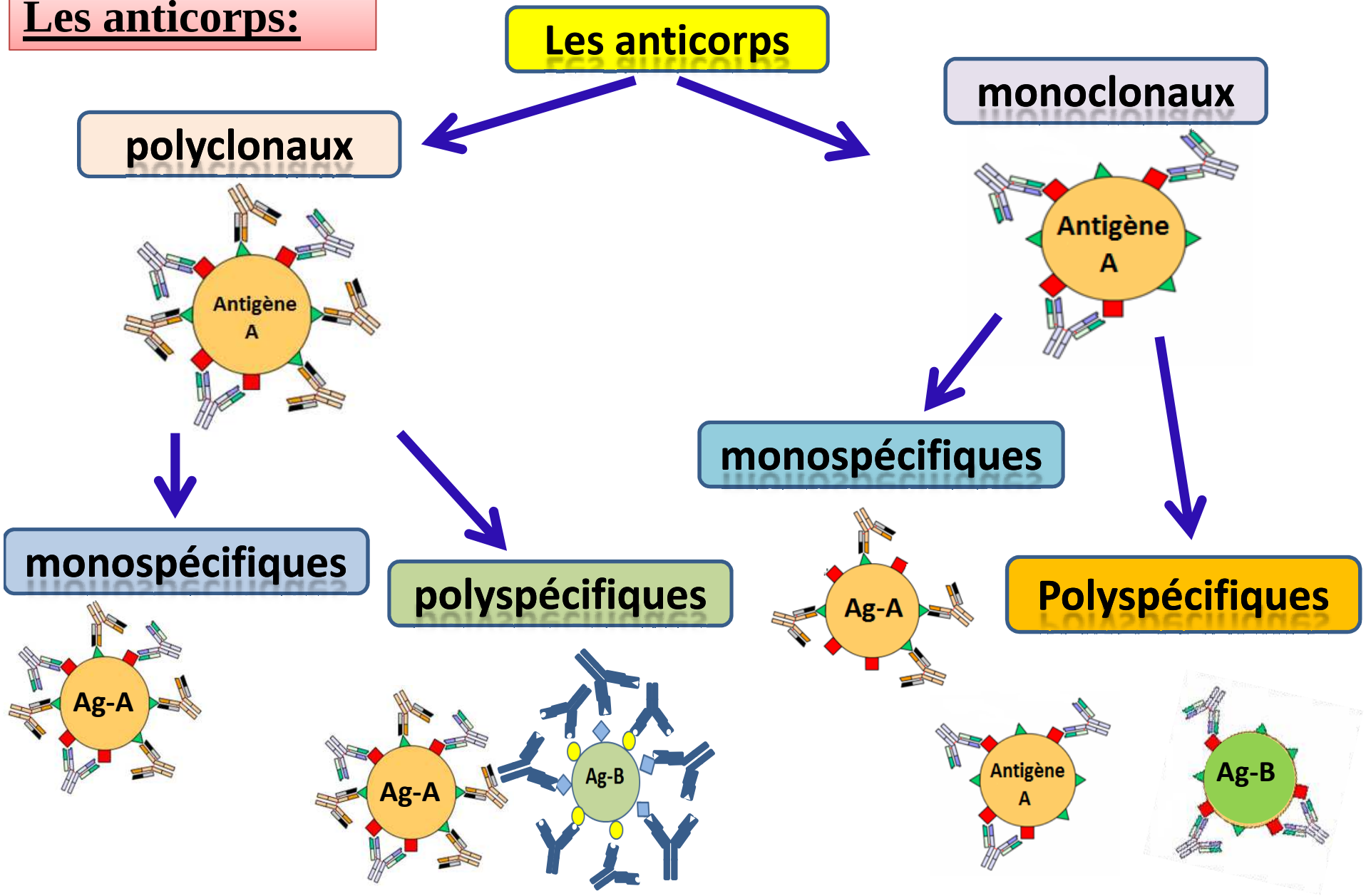
4- Antigène multivalent et multi-déterminé :

présente plusieurs épitopes de différents types et plus d'un épitope de chaque type par molécule d'antigène



II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

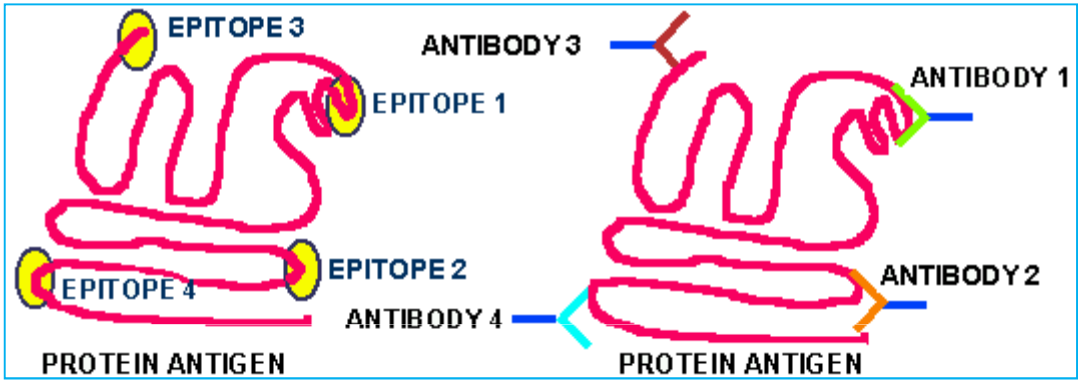
Les anticorps:



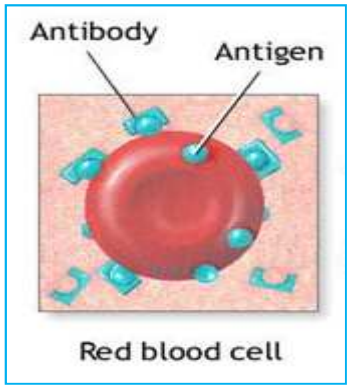
II. Généralités sur la réaction antigène-Anticorps:

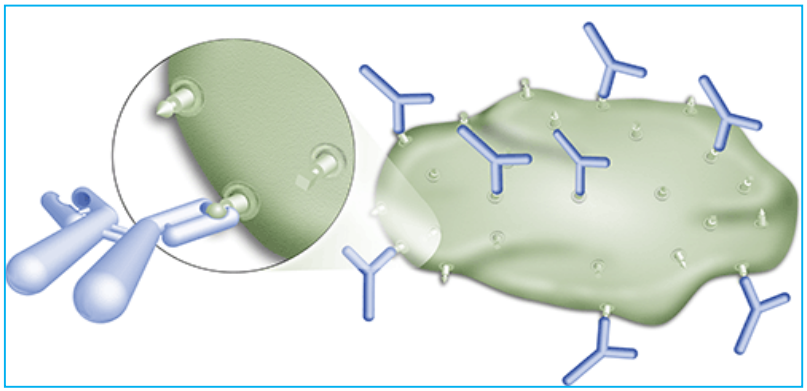
2.Caractéristiques de la réaction Antigène-Anticorps:

Si l'antigène est ***moléculaire ou soluble***; les complexes Ag/Ac forment un **précipité**.



Si l'antigène est ***particulaire*** ou ***cellulaire*** (bactéries, hématies, billes de latex …); les complexes immuns forment un **agglutinat**.





III. TECHNIQUES D'IMMUNOPRÉCIPITATION

III. Techniques d'immuno-précipitation:

1. Définition:

Le phénomène de **précipitation** se produit lorsqu'on met en contact un **antigène soluble** avec l'anticorps correspondant.

Cette réaction se fait soit en **milieu liquide** soit en **milieu gélifié**

III. Techniques d'immuno-précipitation:

Réactions **d'immuno- précipitation** se déroulent en trois étapes :

1. Liaison de l'Ac au déterminants antigéniques
2. Formation d'un réseau par réarrangement des sites de liaison
3. Agrégation des réseaux et formation de précipité visible à l'oeil nu.

Caractéristiques de l'immuno-précipitation:

Ag: soluble

Ac: Ac polyclonaux

réseaux tridimensionnel (zone d'équivalence)

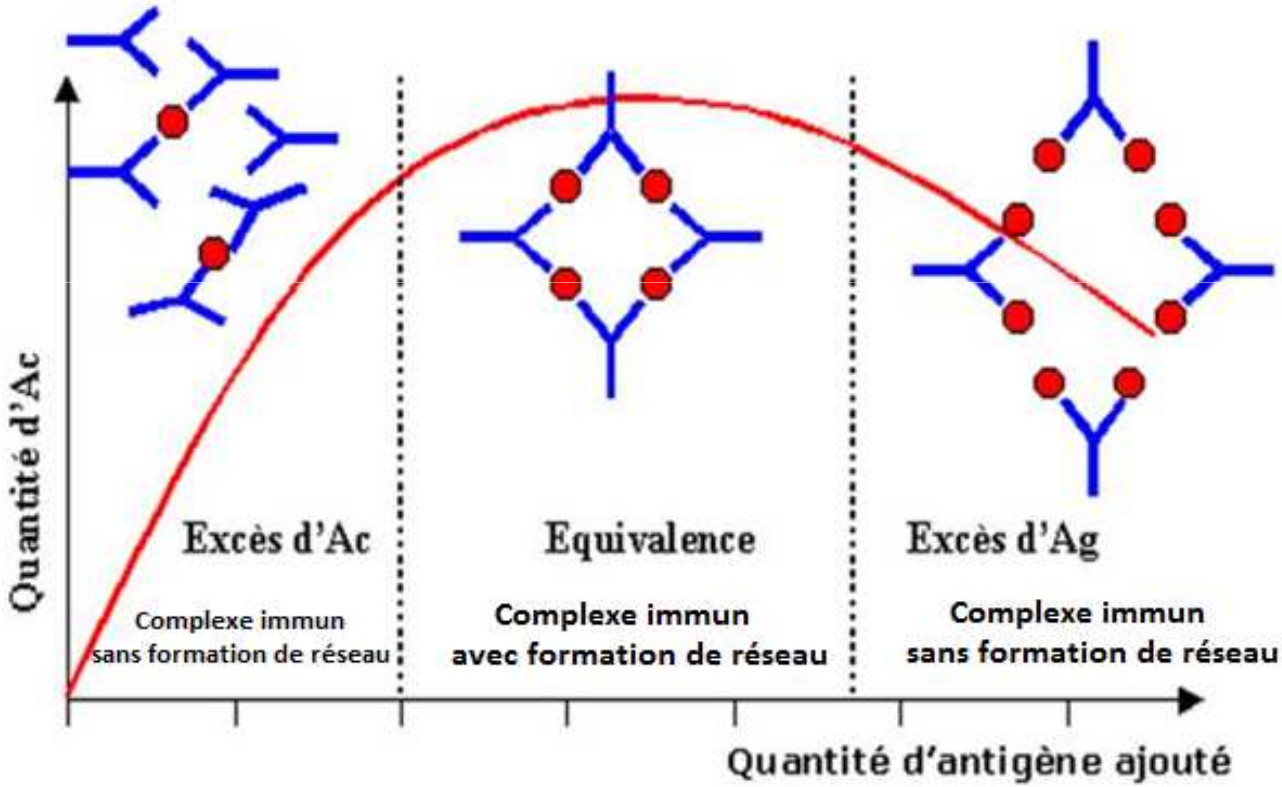
lecture : - œil nu

- turbidimétrie, néphélémétrie

III. Techniques d'immuno-précipitation:

2. Courbe de précipitation :

méthode de Heidelberg et Kendall (1929)



La **zone d'équivalence** est le point où la courbe atteint son maximum.
Il correspond à la formation d'un réseau Ag-Ac

III. Techniques d’immuno-précipitation:

III. Techniques d'immuno-précipitation:

1.Précipitation en milieu liquide:

a. Test de l'anneau (*ring test)*

b. Néphélémétrie

c. Turbidimétrie

2. Précipitation en milieu gélifié

a. Immunodiffusion double: Ouchterlony

b. Immunodiffusion radiale :Mancini

c. Électro-immunodiffusion de Laurell

d. Electrosynerèse

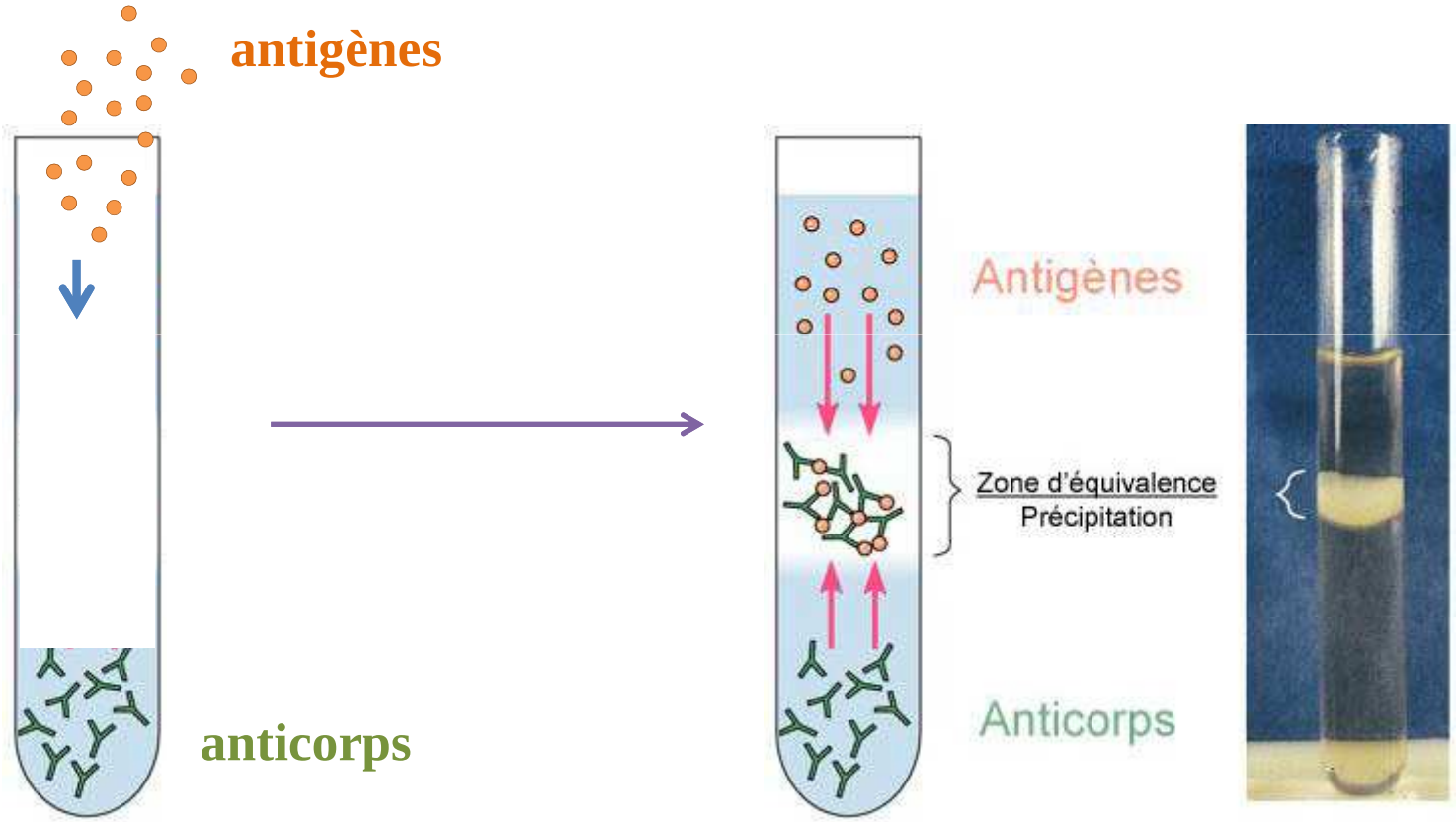
e. Immunoélectrophorèse

f. Immunofixation

g. Immunsélection

1. En milieu liquide:

1. Test de l'anneau (ring test):



Applications: - suivre l'évolution d'animaux producteurs d'immun-sérums en cours d'immunisation. - Les fraudes alimentaires.

1. En milieu liquide:

2. Technique de néphélémétrie et de turbidimétrie:

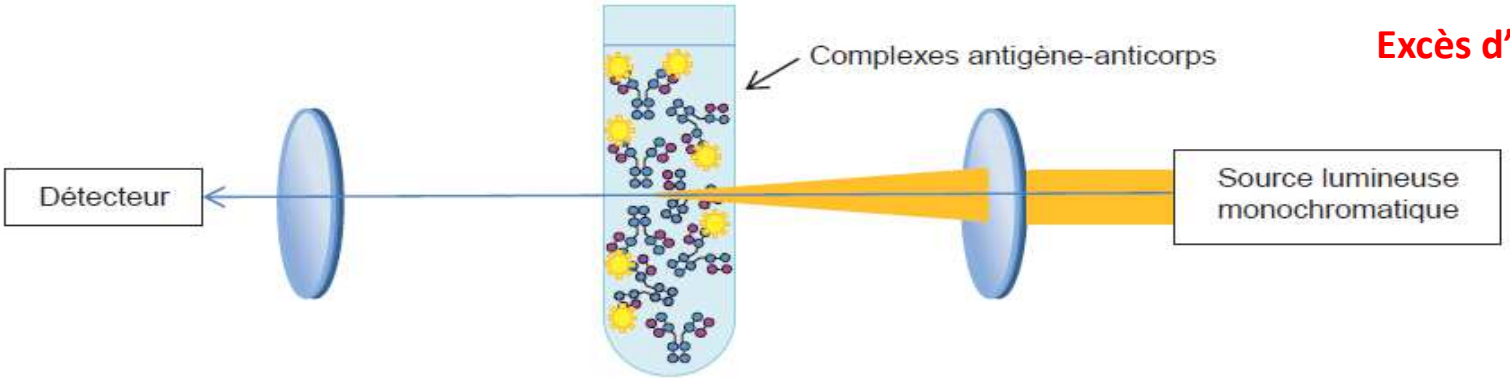
- Un rayon laser traverse le tube contenant d'éventuels précipités Ac/Ag.
- La diffraction de la lumière par les précipités Ac/Ag (nephelos = nuage) est mesurée à la sortie.
- Plus il y a de précipité, plus il y aura de signal sur le photomultiplicateur (appareil qui mesure la diffraction).
- Mesure rapide et automatisée et permet un dosage quantitatif.

1. En milieu liquide:

Turbidimétrie : la mesure de lumière transmise produit un signal décroissant avec la concentration d'antigènes.

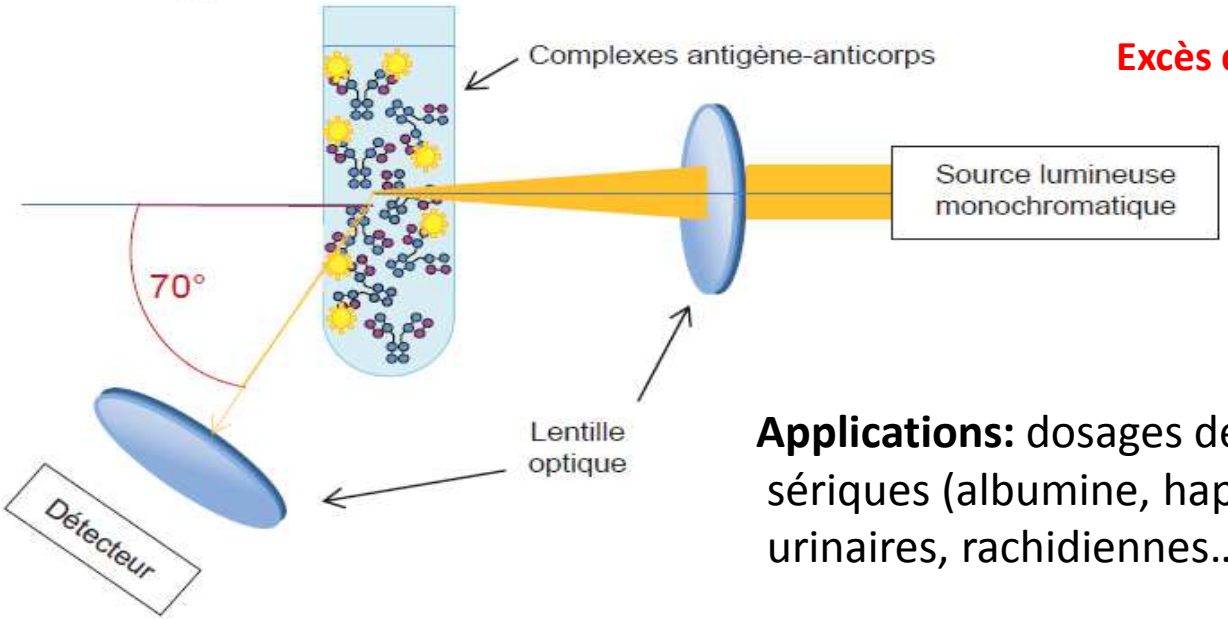
Automates++

Excès d'anticorps++



Néphélémétrie : la mesure de la dispersion de la lumière produit un signal croissant avec la concentration d'antigènes.

Excès d'anticorps++



Applications: dosages des protéines sériques (albumine, haptoglobine, Ig…), urinaires, rachidiennes…

III. TECHNIQUES D'IMMUNOPRÉCIPITATION

2.Précipitation en milieu gélifié:

2. En milieu gélifié:

- **Diffusion des réactants dans un milieu gélifié** ➡ **gradient de concentration**
- **A la zone d'équivalence** ➡ **Formation d'un précipité**

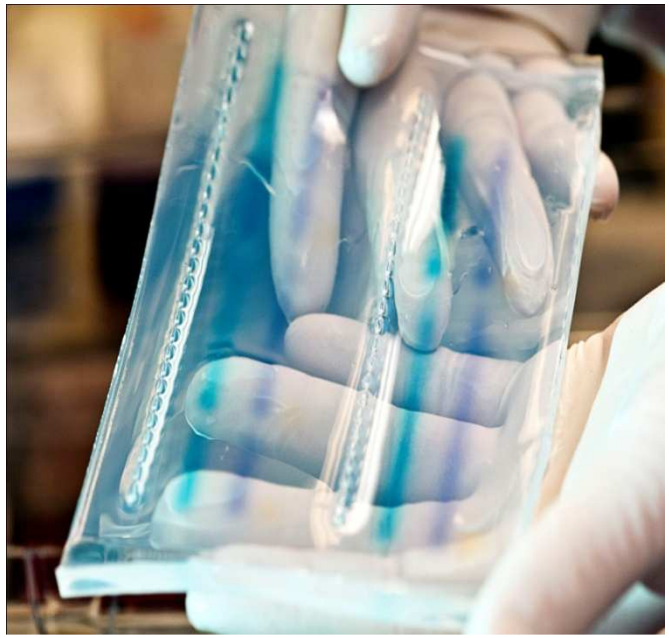
2. En milieu gélifié:

Nature des gels:

extraits d'algues marines: agar-agar (gélose)et ses dérivés purifiés (agarose)

Caracteristiques des gels:

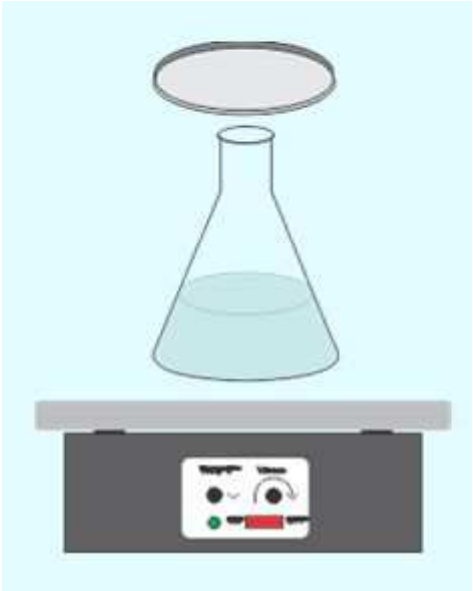
1. Inertes chimiquement.
2. Visqueux à 50°C ce qui permet d'inclure l'Ag et l'Ac sans qu'ils soient dénaturés.
3. Solides à 37°C.
4. Transparents, permettant l'observation des précipités.



2. En milieu gélifié:

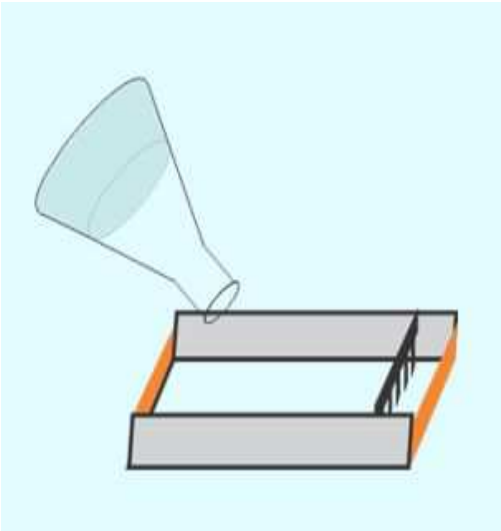
Gel d'agarose- préparation:

Dissoudre l'agarose dans un tampon



-Couvrir
-Agiter
- Bouillir

refroidir



- Verser
- Eviter les bulles d'air

2. En milieu gélifié:

1. Méthodes qualitatives:

a. Méthode d'Ouchterlony = Immunodiffusion double
b. Électrosynérèse
c. Immuno-électrophorèse (IEP)
d. Immunofixation
e. Immunosélection

2. Méthodes quantitatives:

a. Immunodiffusion radiale= Mancini
b. Immunoélectroquantification= Laurell

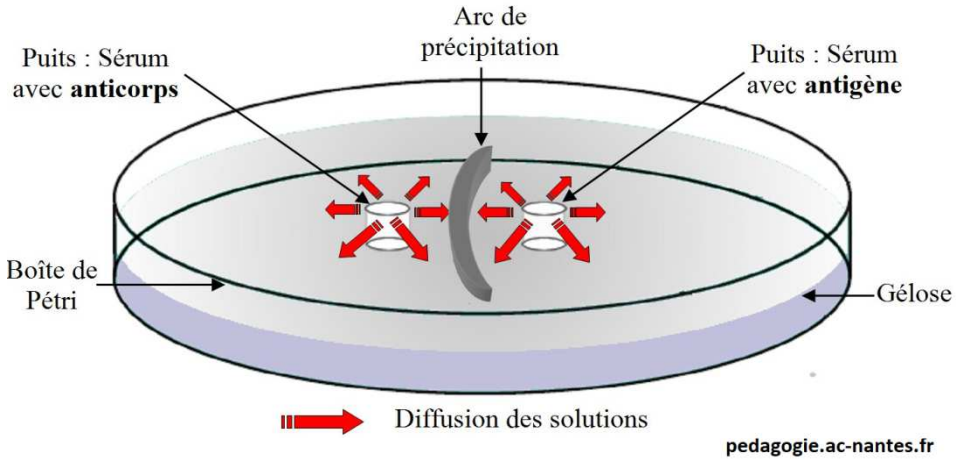
1. Méthodes qualitatives:

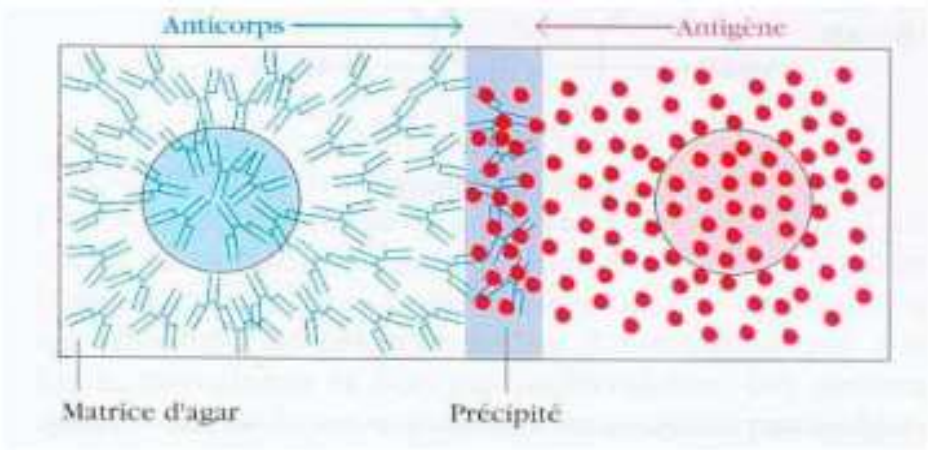
a. Méthode d'Ouchterlony = Immunodiffusion double
b. Électrosynérèse
c. Immuno-électrophorèse (IEP)
d. Immunofixation
e. Immunosélection

1. Méthodes qualitatives:

a. Technique D'OUCHTERLONY:

Diffusion spontanée
Technique qualitative

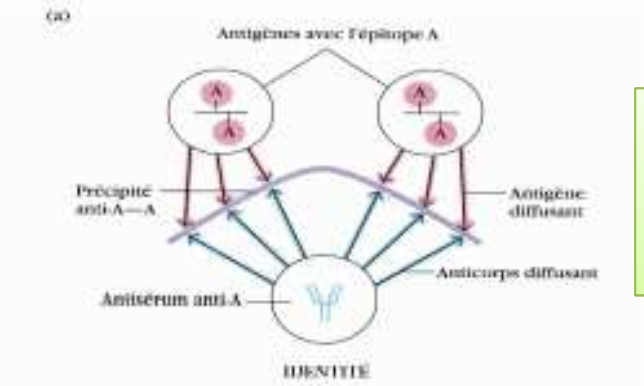




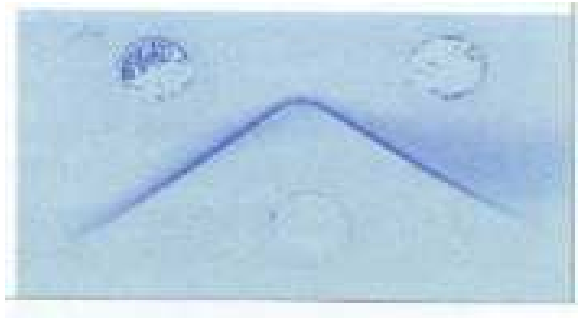
Applications : déterminer la pureté d'une solution antigénique, préciser les spécificités d'un immun-sérum…
Exemple d'application : recherche de la protéine de Bence Jones.

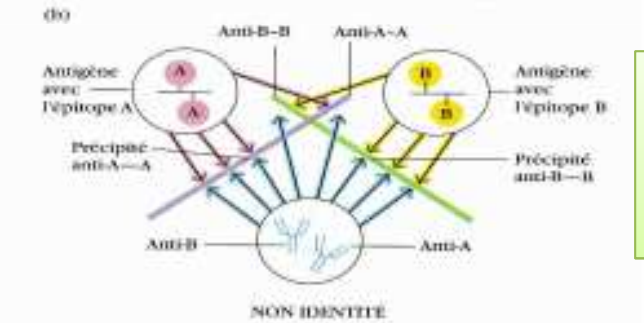
1. Méthodes qualitatives:

a. Technique D'OUCHTERLONY:

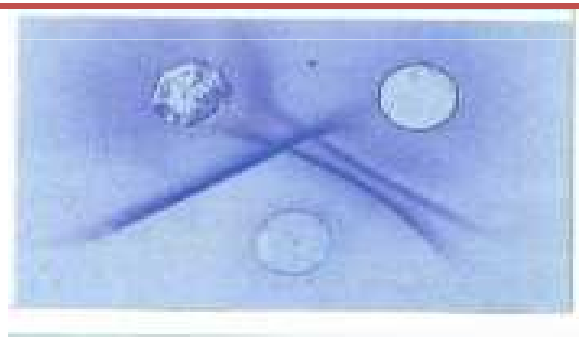


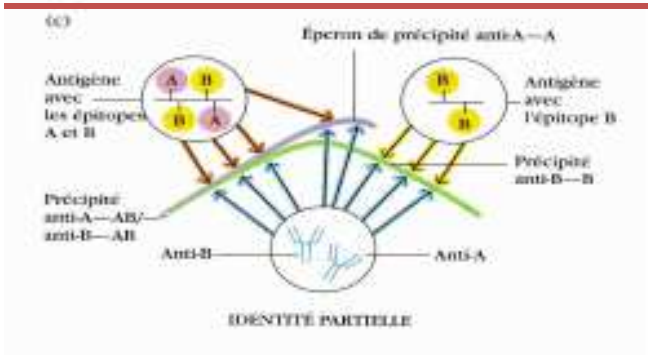
Identité totale
Ag1 et Ag2 présentent une identité immunochimique totale



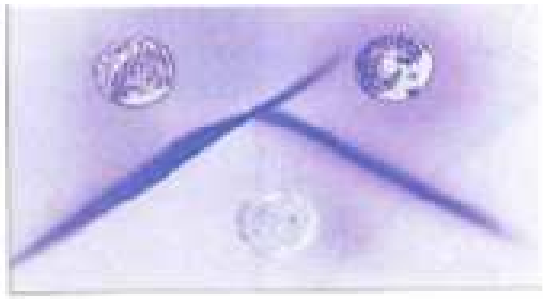


Absence d'identité
Ag1 et Ag2 ne présentent aucune identité immunochimique





Identité partielle
Ag1 et Ag2 présentent une identité immunochimique Partielle



1. Méthodes qualitatives:

a. Technique D'OUCHTERLONY:

Si les solutions d'Ag ou d'Ac sont complexes

⬇

Plusieurs arcs de précipitation

But:
- **Analyse qualitative des solution d'Ag ou d'Ac**
- **Étude des relations entre différents Ag**

1. Méthodes qualitatives:

b. Contre-immunoélectrophorèse ou Electrosynérèse

Diffusion accélérée
Technique qualitative

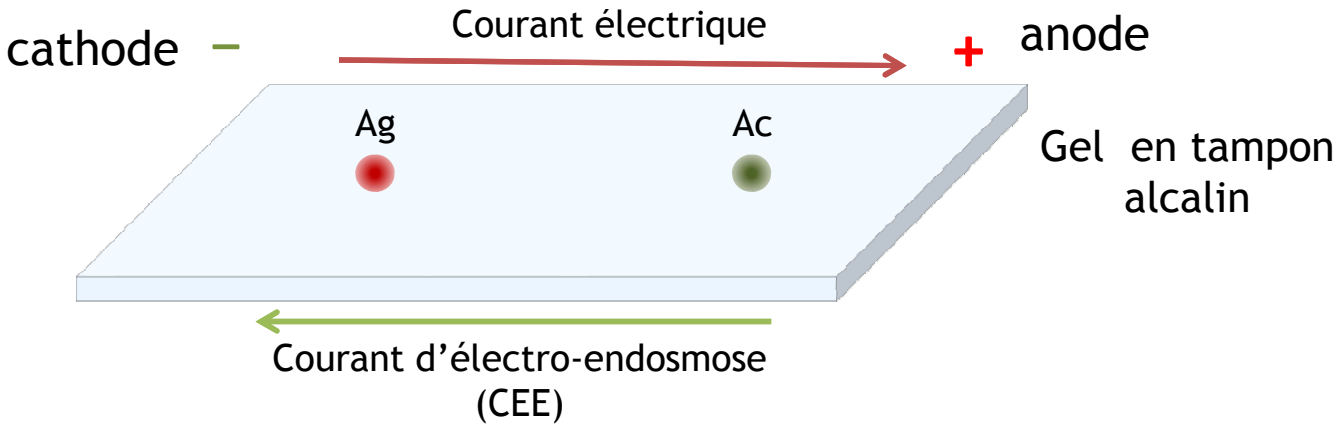
- **Principe:** technique **qualitative** d'immunoprécipitation en gel **vierge** ou la diffusion de l'Ag et de l'Ac est **accélérée** par un courant électrique (CE).

- **Support:** gel d'agarose à fort **courant d'électro-endosmose** (EEE).

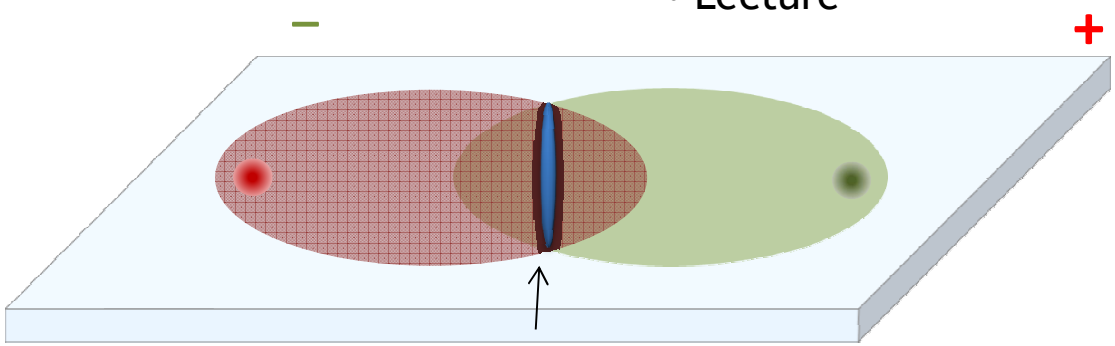
•La réaction Ag-Ac conduit à la formation d'une ligne de précipitation à la zone d'équivalence.

1. Méthodes qualitatives:

b. Contre-immunoélectrophorèse ou Electrosynérèse



- Migration de l'Ag vers l'anode
- Migration de l'Ac vers la cathode
- Précipitation dans la zone d'équivalence
- Coloration
- Lecture



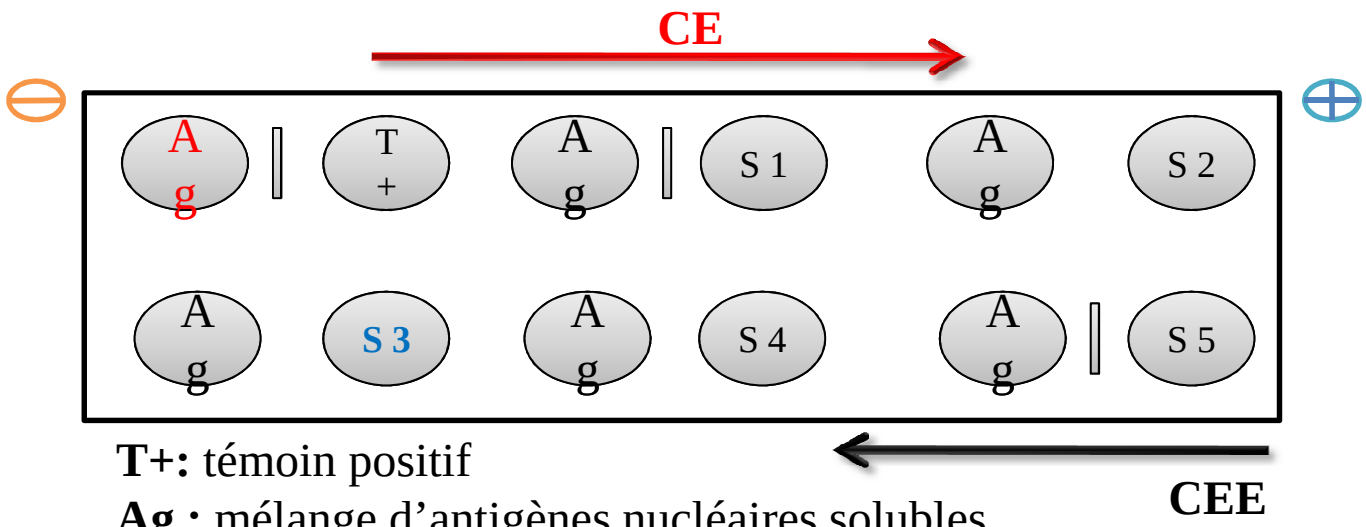
Ligne ou arc de précipitation

1. Méthodes qualitatives:

b. Contre-immunoélectrophorèse ou Electrosynérèse

Applications:

- Recherche d'auto anticorps anti- antigènes nucléaires solubles (SSA, SSB, Sm, RNP…)
- Détection de l'Ag HBs ou de l'Ac anti-HBS



T+: témoin positif
Ag : mélange d'antigènes nucléaires solubles.
S1, S2….: sérums des malades

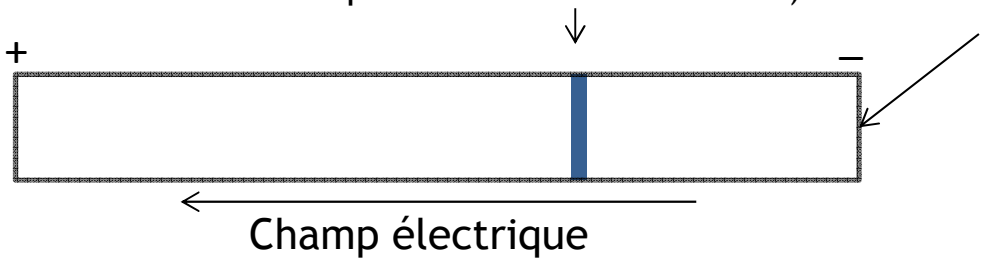
1. Méthodes qualitatives:

c. Immunoélectrophorèse:

Diffusion accélérée
Technique qualitative

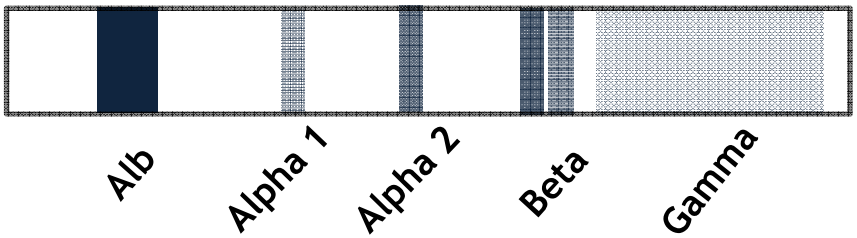
Electrophorèse des protéines

Dépôt (les protéines se comportent comme des anions)



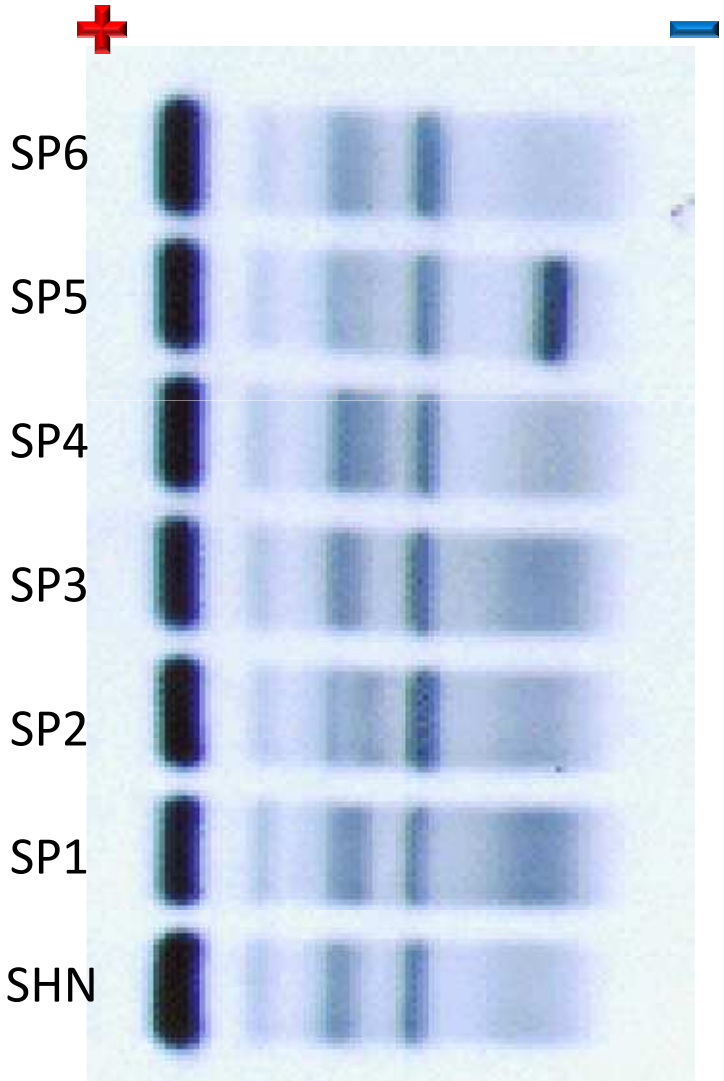
Support avec tampon à pH alcalin (8-9):
- Acétate de cellulose
- Gel d'agarose

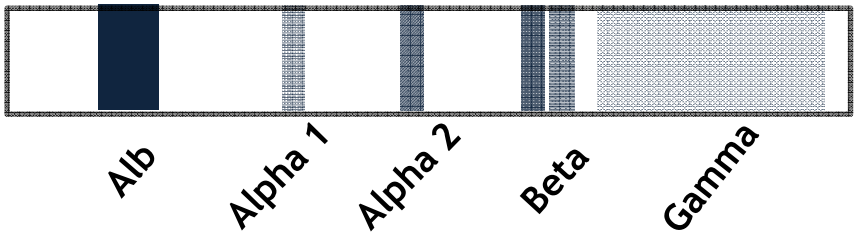
Electrophorèse :
Migration des protéines selon leur charge et taille

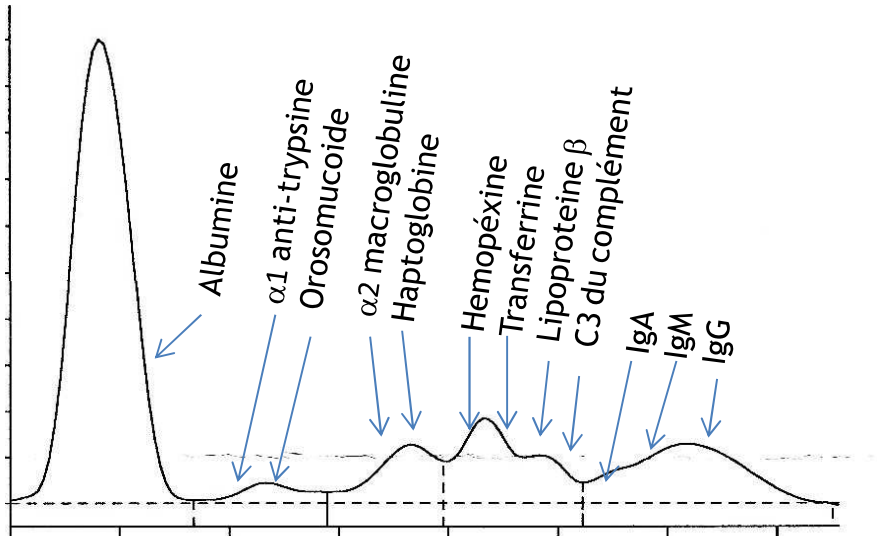


Coloration

Electrophorèse des protéines







Tracé électrophorétique après lecture densitométrique des fractions protéiques sériques

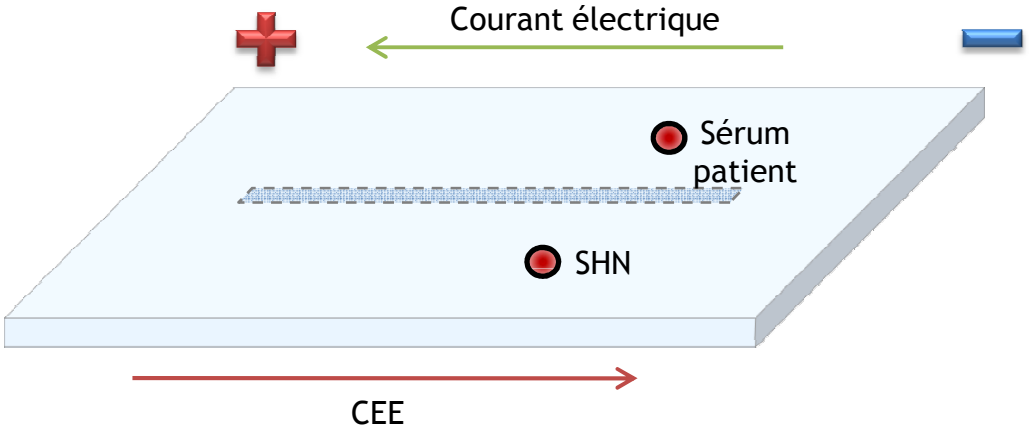
- Albumine 58±5% 32-50 g/l
- α1 globulines 3±1,5% 1-4 g/l
- α2 globulines 9±3% 6-10 g/l
- β globulines 14±3% 6-13 g/l
- γ globulines 16±4% 7-15 g/l

1. Méthodes qualitatives:

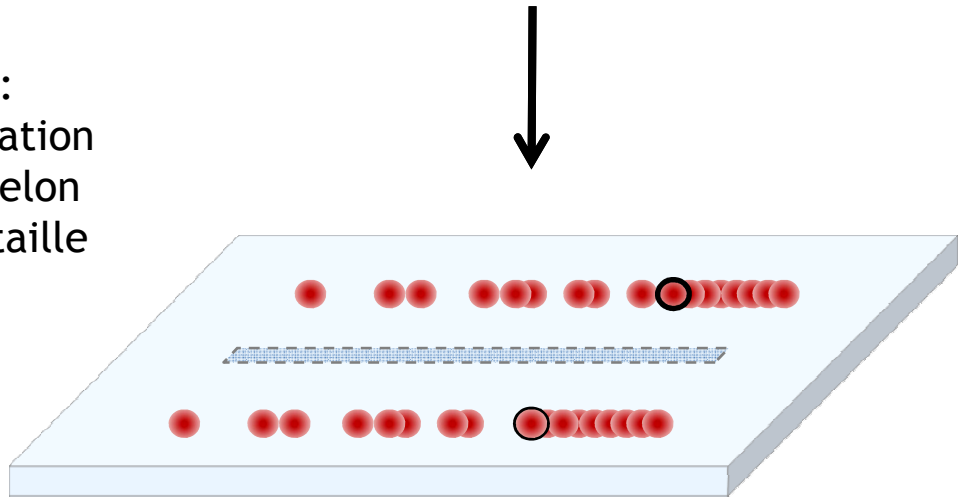
c. Immunoélectrophorèse

1ère étape : séparation électrophorétique

Gel en tampon alcalin (8-9)



Electrophorèse : dépôt puis migration des protéines selon la charge et la taille



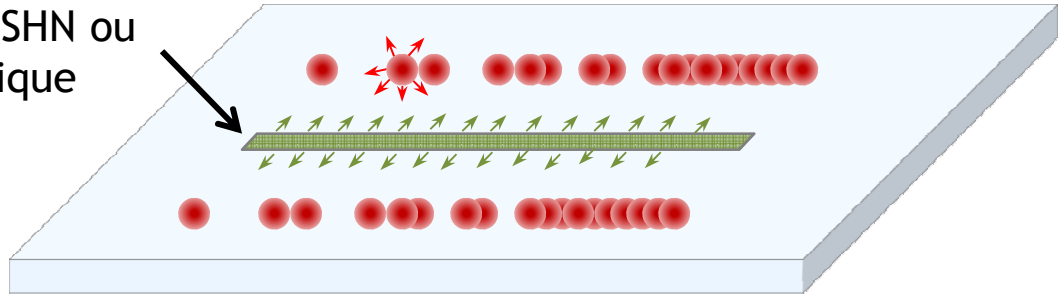
1. Méthodes qualitatives:

c. Immunoélectrophorèse

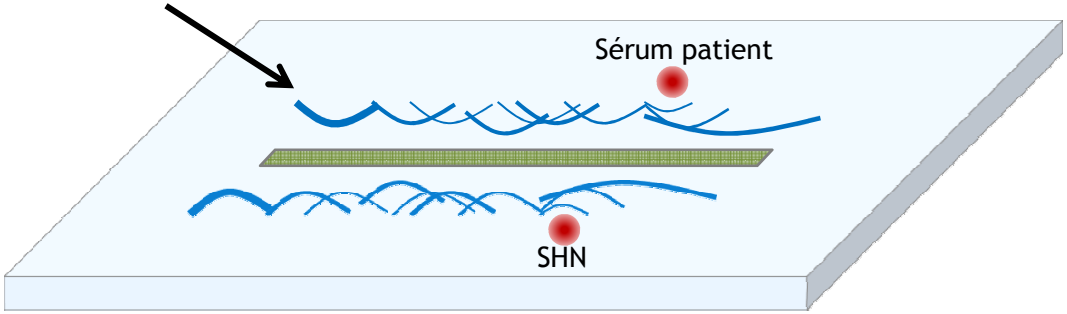
2ème étape : Immunodiffusion et précipitation des fractions protéiques

1. Ajout d'un anti-SHN ou d'un IS monospécifique

2. Diffusion

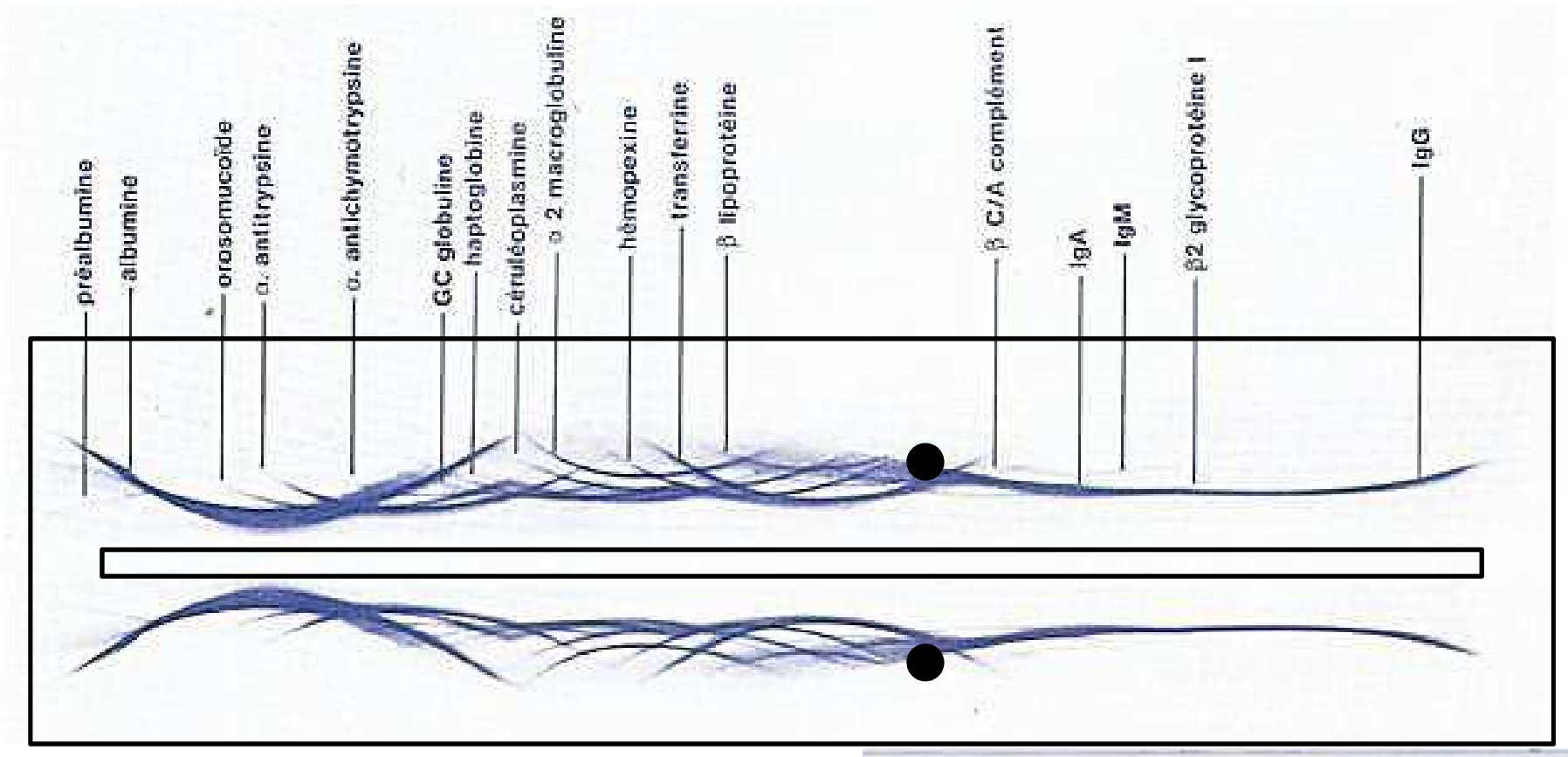


3. Formation de ligne(s) de précipitation



1. Méthodes qualitatives:

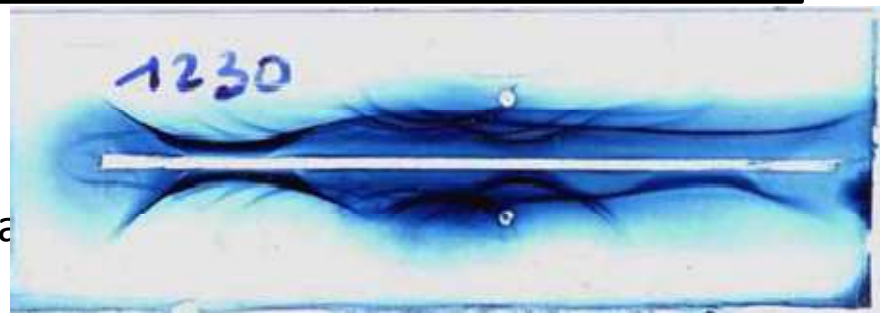
c. Immunoélectrophorèse



Applications:

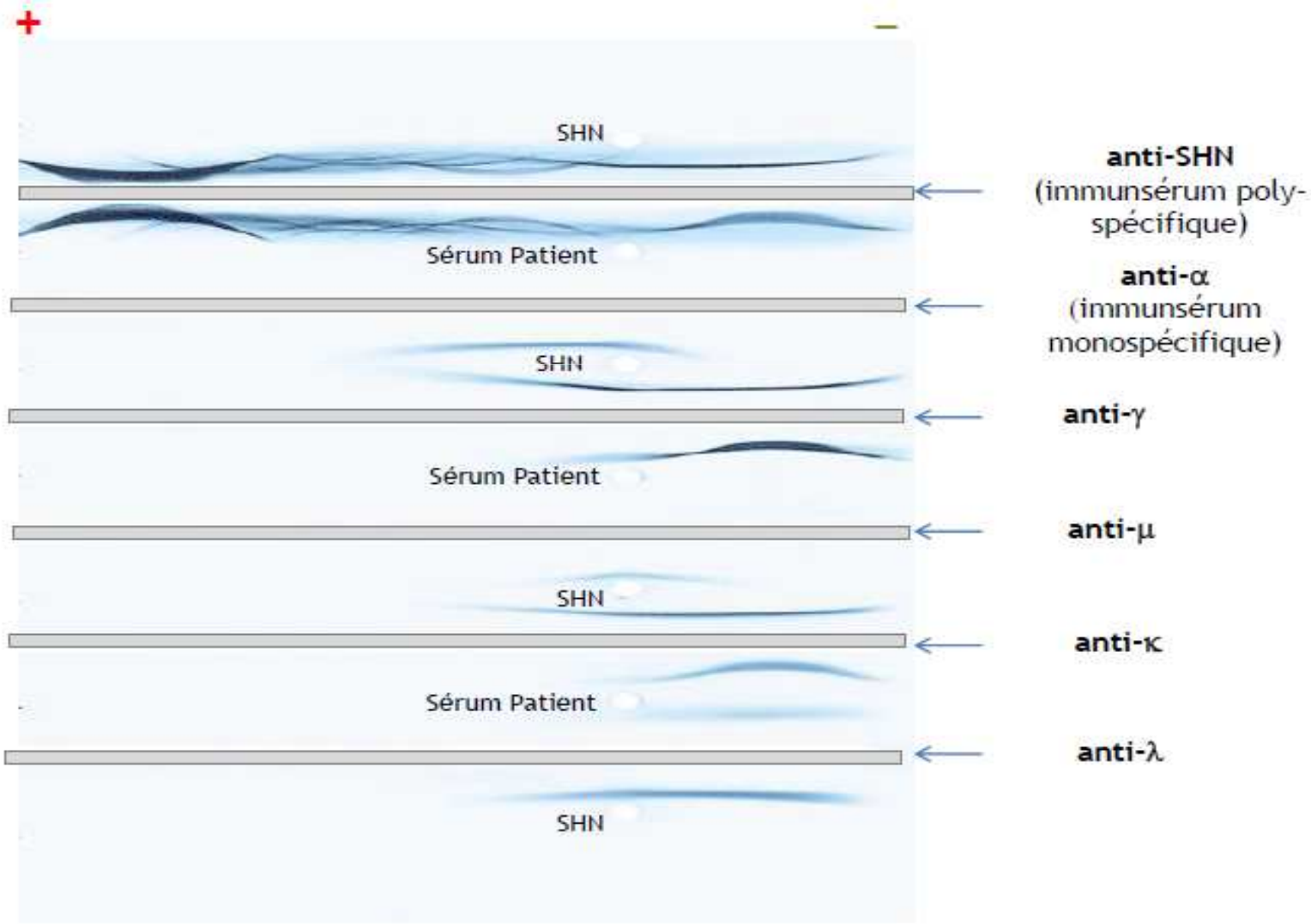
Etude semi-quantitative des concentrations

Identification et typage d'un composant monoclona



1. Méthodes qualitatives:

c. Immunoélectrophorèse



1. Méthodes qualitatives:

d. Immunofixation:

- Principe: technique immunochimique qualitative

  en deux temps:

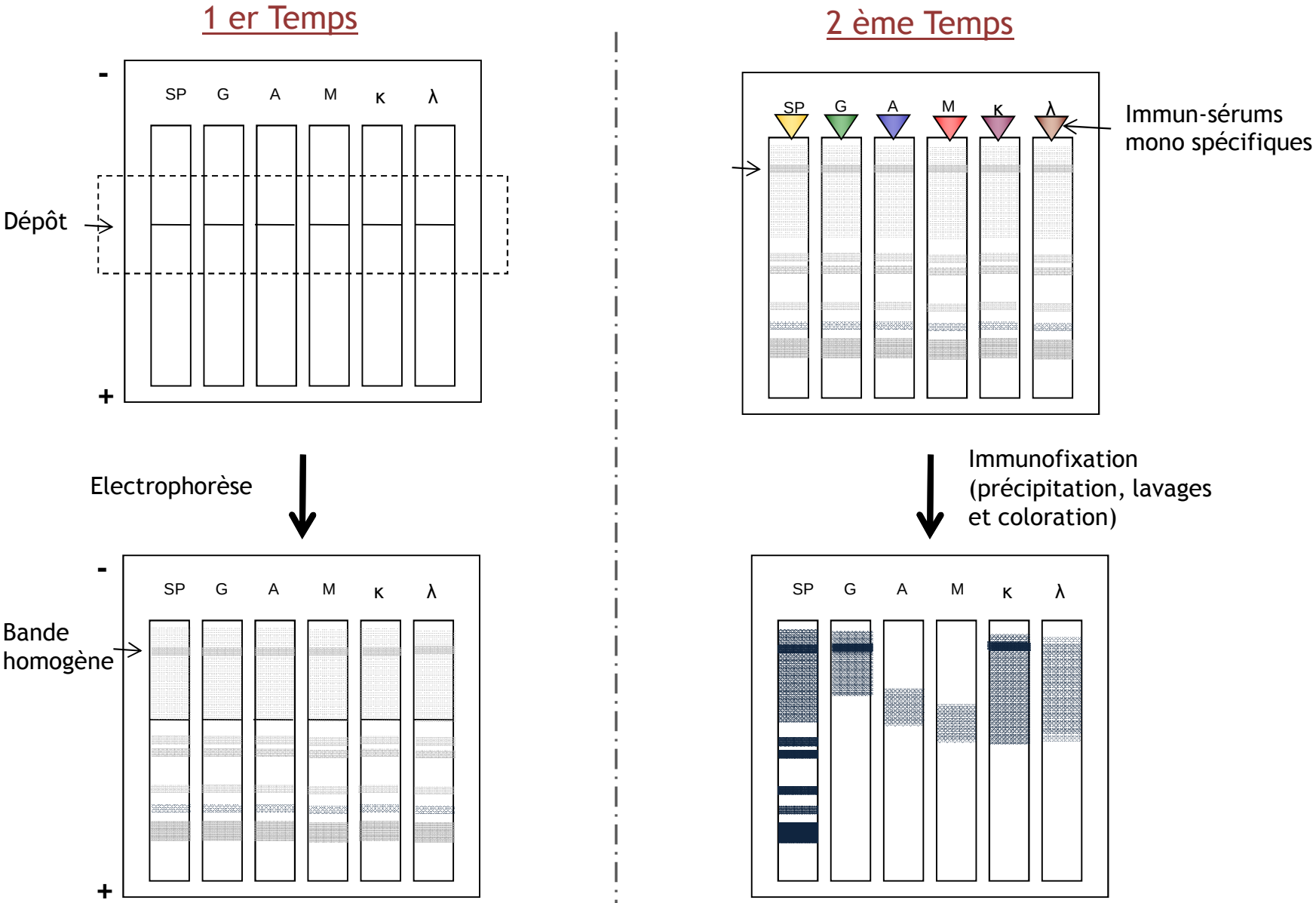
1. séparation électrophorétique.
2. Immunoprécipitation par des immun-sérums mono-spécifiques

- Application:

mettre en évidence la nature et de préciser le typage d'une immunoglobuline monoclonale (myélome…) décelés à l ’électrophorèse des protéines sériques/urinaires.

Méthode plus sensible et plus rapide que l'immunoélectrophorèse.

1. Méthodes qualitatives:



Composant monoclonal de classe IgG à chaine légère Kappa

1. Méthodes qualitatives:

e. Immunoselection:

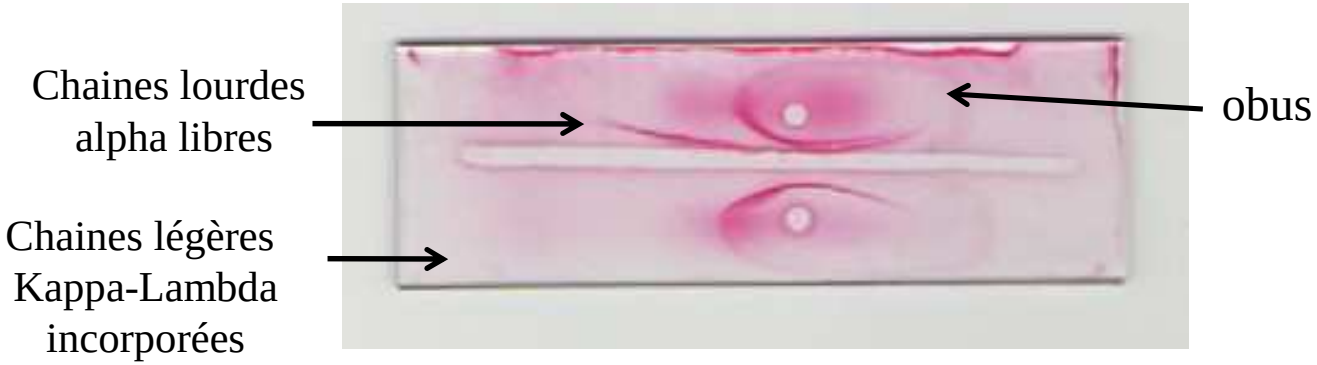
Diffusion accélérée
Technique qualitative

- Principe:

Permet la détection de chaînes lourdes libres présentes en faible quantité dans des liquides biologiques.

Le gel est incorporé d'anti-chaînes légères Kappa et Lambda en quantité optimale, ces Ac précipiteront les Ig entières sous forme de « rockets » ou obus

Les chaînes lourdes libres vont migrer et pourront être identifiées dans un second temps par immunodiffusion en utilisant un immun sérum spécifique (anti- chaine lourdes).



1. Méthodes qualitatives:

e. Immunoselection:

Application:

Recherche de la maladie des chaines lourdes alpha le plus souvent, rarement gamma ou mu.

2. Méthodes quantitatives:

a. Immunodiffusion radiale= Mancini
b. Immunoélectroquantification= Laurell

2. Méthodes quantitative:

a. Immunodiffusion radiale: technique de Mancini:

Principe: technique d'immunoprécipitation quantitative qui consiste en la diffusion **passive** et **radiale** de la protéine à doser au sein d'un **gel incorporé** d'Immun sérum spécifique de cette protéine et formation de cercle de précipitation aux zones d'équivalence.

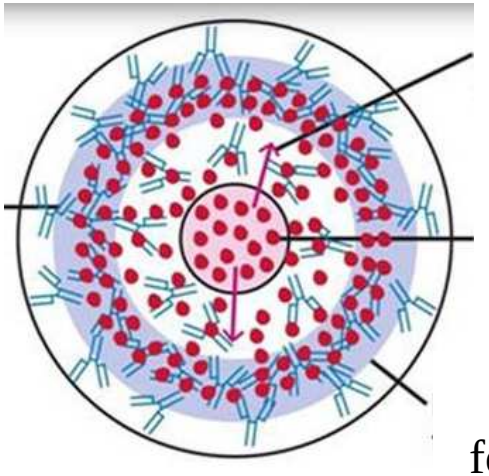
Le diamètre du cercle est proportionnel à la concentration de la protéine.

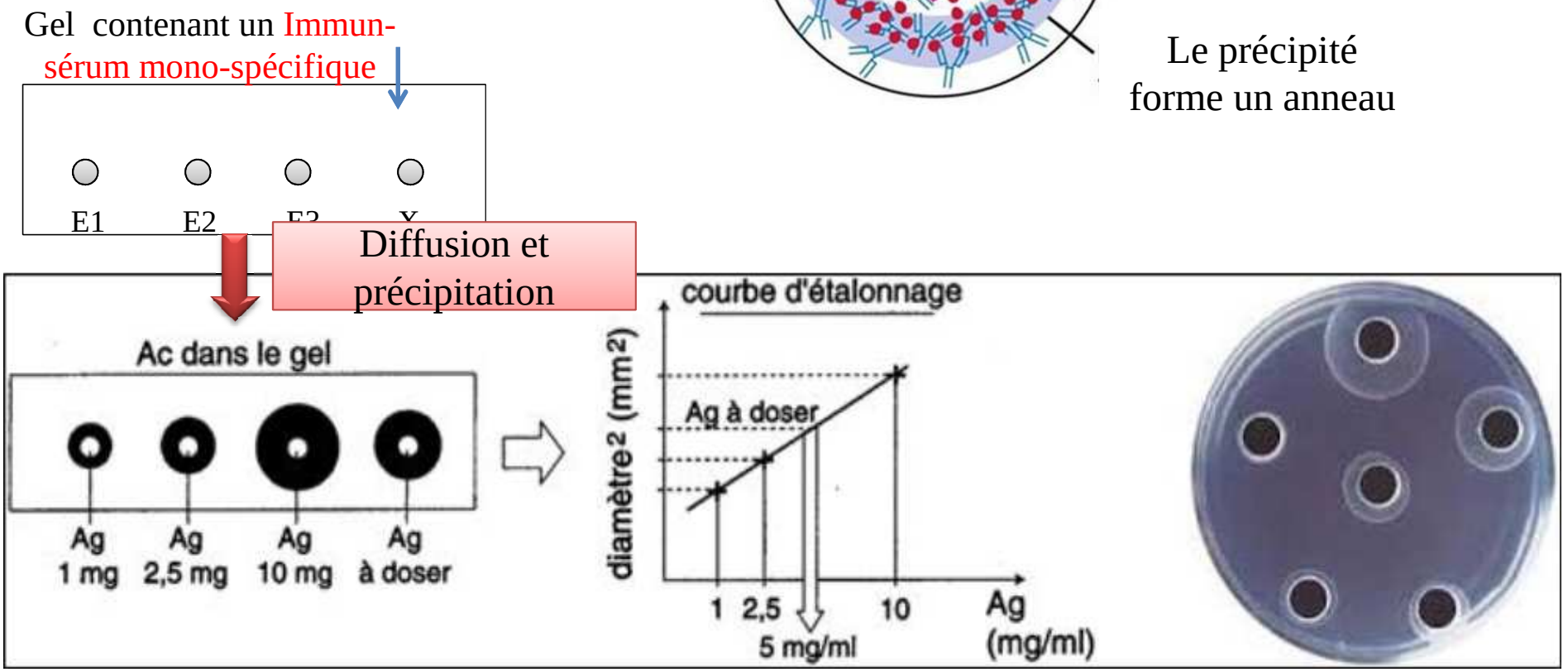
L'utilisation d'étalons de concentrations connues permet d'établir une courbe d'étalonnage.

Application : Le dosage des protéines

Inconvénient : technique lente (18 heures pour que le précipité se forme
Sensibilité: 50mg/l

Immunodiffusion radiale: technique de Mancini



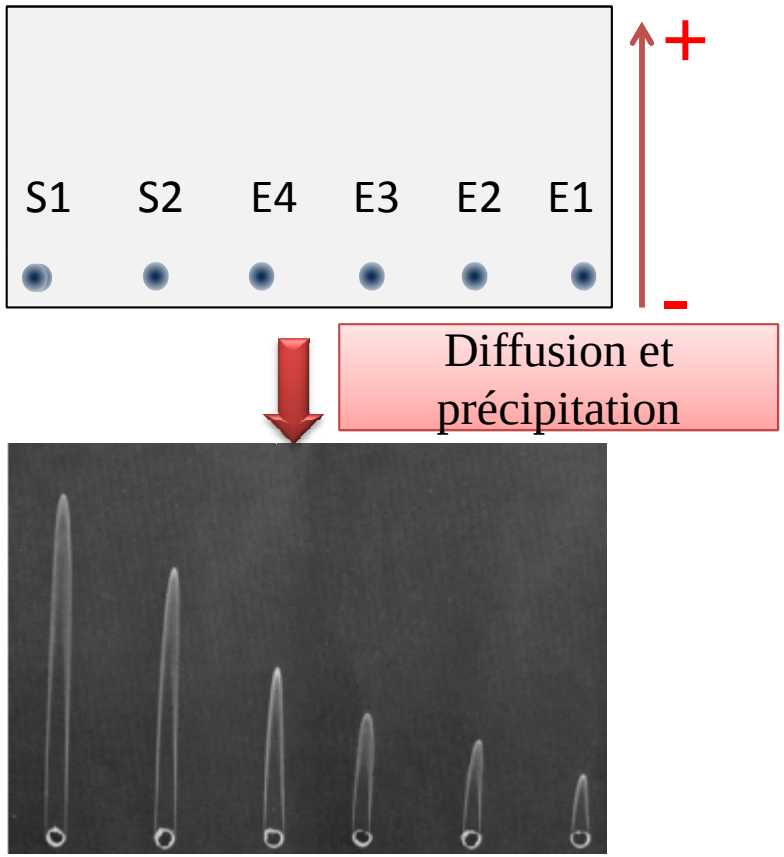


2. Méthodes quantitative:

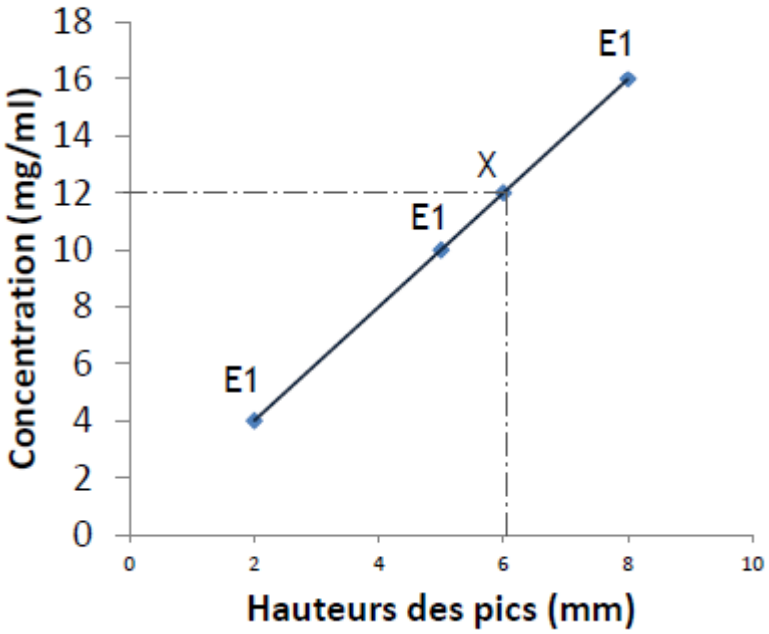
b. Eléctroimmunoquantification (LAURELL):

Gel contenant un Immun-sérum monospécifique

Décrite initialement par Laurell en 1966



Apparition d'obus, pics ou « rokets »



résultat quantitatif est obtenu en 4 heures.

Techniques d'immuno-précipitation

		gel vierge	gel incorporé
En milieu gélifié	Non pulsées	☑ Ouchterlony (Immunodiffusion double)	☑ Mancini (Immunodiffusion radiale)
	Pulsées	☑ Electrosynérèse	☑ Laurell (Technique des rockets)
		☑ Immunoélectrophorèse	
		☑ Immunofixation	☑ Immunosélection

Techniques d'immuno-précipitation

		Qualitatives	Quantitatives
En milieu liquide		☑ Ring test (Test à l'anneau)	☑Néphélemétrie ☑Turbidimétrie
En milieu gélifié	Non pulsées	☑ Ouchterlony (Immuno-diffusion double)	☑ Mancini (Immunodiffusion radiale)
	Pulsées	☑ Electro-synérèse ☑ Immunoélectrophorèse ☑ Immunofixation	☑ Laurell (Technique des rockets)