

**FACULTE DE MEDECINE DE BATNA
DEPARTEMENT DE MEDECINE
LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE**

**REACTIONS D'IMMUNOPRECIPITATION &
D'AGGLUTINATION**

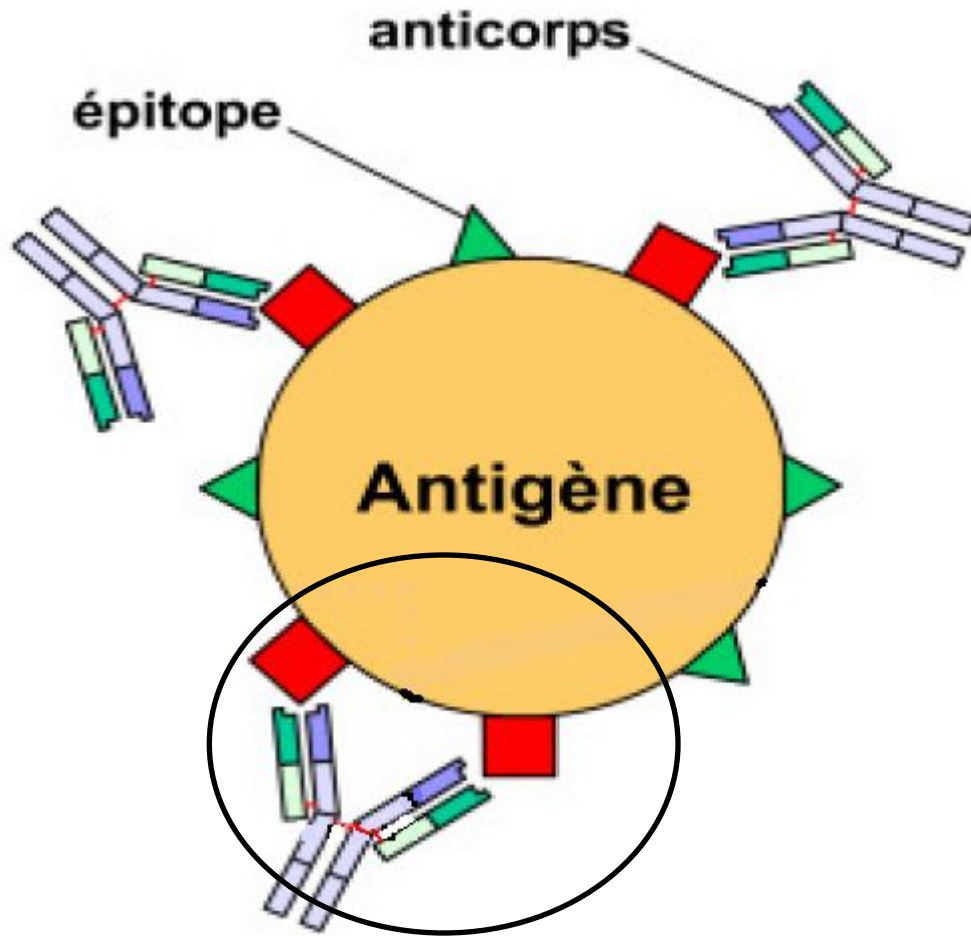
Dr KHANFRI Y.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020/2021

INTRODUCTION

- De multiples Ac sont produits par l'organisme à la suite de la pénétration d'une substance immunogène.
- Leur mise en évidence in vitro, repose sur leur capacité d'union spécifique avec l'Ag qui leur a donné naissance.

INTERACTIONS Ag-Ac



□ Réaction entre un épitope et un paratope

□ Phénomène:

- rapide
- invisible
- constant
- commun à toutes les réactions Ag-Ac

CHAMPS D'APPLICATION

1. Identification et/ou dosage d'un Ag :
 - Identification d'une cellule, d'un agent infectieux.
 - Identification et/ou dosage d'une protéine.
 - Dosage d'une hormone, d'un médicament .

2. Mise en évidence et/ou titrage d'un Ac :

- Diagnostic et suivi sérologique d'une infection ou d'une maladie auto-immune.
- Diagnostic d'une allergie.
- Suivi d'une grossesse ou d'une transplantation.

Les techniques de detection et dosage utilisant la réaction Ag –Ac sont de deux types :

1) Méthodes n'utilisant pas de marqueurs:

Observation directe :

- Immunoprécipitation
- Agglutination

2) Méthodes utilisant des marqueurs

En pratique, le choix d'une réaction donnée dépend de :

- la nature de l'Ag
- la sensibilité recherchée
- la rapidité souhaitée pour obtenir un résultat
- la précision désirée.

REACTIONS D'IMMUNOPRECIPITATION

I-GENERALITES:

- ☐ La liaison Ag-Ac possède 2 caractéristiques essentielles : la complémentarité et la réversibilité
- ☐ La liaison Ag-Ac est une liaison dynamique, elle varie en fonction de la température, du pH et de la force ionique

-L'affinité :

- caractérise la force de la stabilité de la liaison Ag-Ac,
- augmentée quand une étroite complémentarité stérique existe entre le paratope et l'épitope permettant aux forces d'attraction de s'exercer pleinement.

- L'avidité : (c la somme de plusieurs affinités)

- La majorité des Ag sont formés d'une mosaïque d'épitopes.
- On parle d'avidité d'un immun-serum constitué d'un mélange d'Ac d'affinités différentes pour des épitopes différents sur l'antigène .

II- REACTIONS D'IMMUNOPRECIPITATION :

A-Définition :

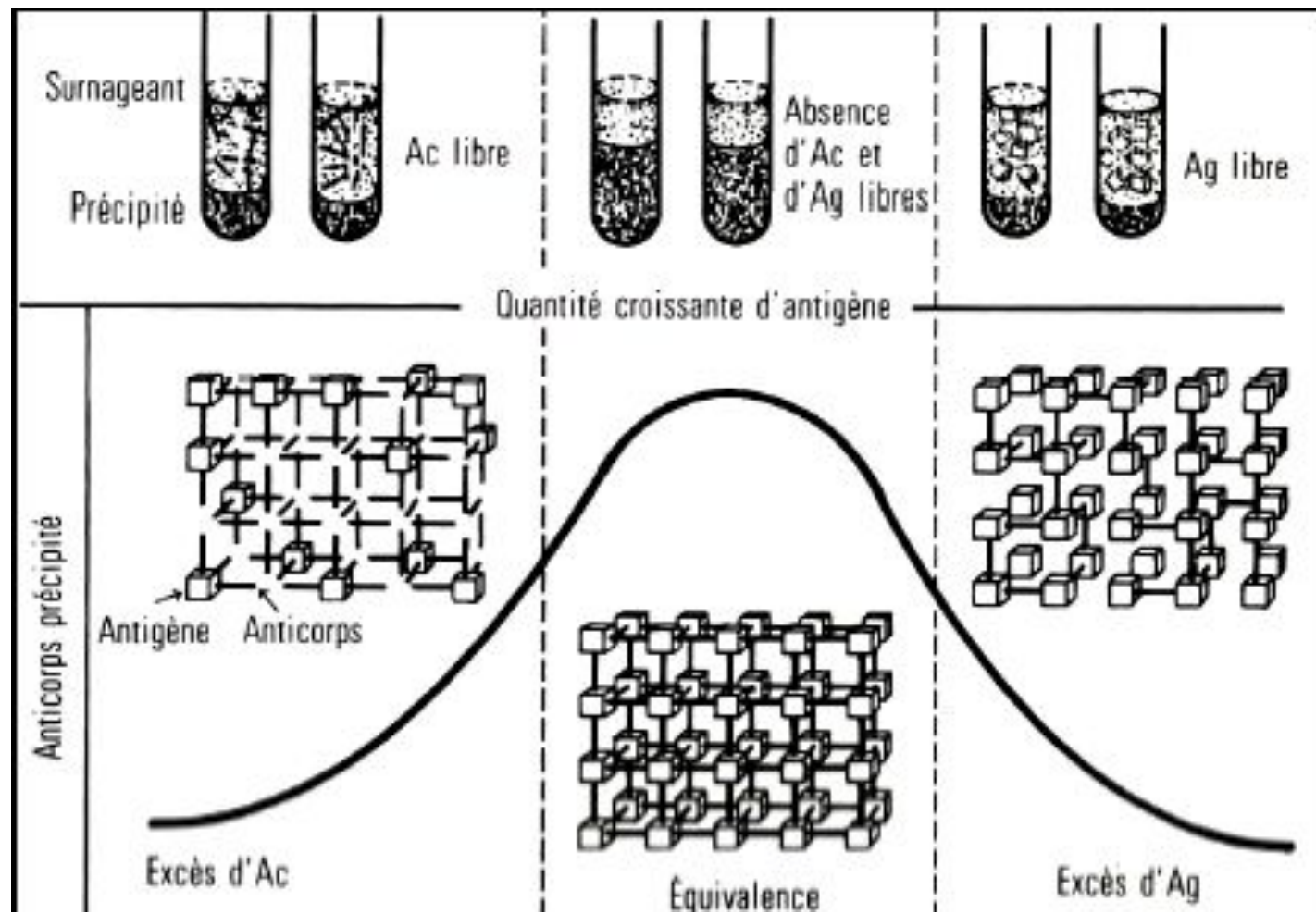
- ☐ La réaction d'immunoprécipitation a pour base la liaison Ag-Ac, *l'Ag étant soluble.* (on parle d'agglutination qd l'ag est figuré ou particulaire: cad fixé sur un GR ou une particule de latex)
- ☐ L'apparition d'un précipité est due à la formation d'un réseau tridimensionnel qui n'existe qu'en présence d'Ag à épitopes multiples et d'Ac multivalents.
- ☐ La solubilité des complexes immuns **(CI)** formés diminue avec la taille du réseau formé.

B- Précipitation en milieu liquide :

•Notion de zone d'équivalence : (voir prochaine diapo)

Pour une quantité fixe d'Ac, on ajoute une quantité croissante d'Ag, la liaison Ag-Ac passe par 3 phases physiques :

- 1^{ère} phase : en excès d'Ac, chaque Ag est recouvert de plusieurs molécules d'Ac
- 2^{ème} phase : rapport Ag-Ac optimal, c'est la zone d'équivalence où se forme un réseau (précipité).
- 3^{ème} phase : la quantité du précipité diminue, ceci s'explique par le déplacement de la liaison Ag-Ac du fait de l'excès d'Ag, il y a plusieurs sites d'Ag libres d'où rupture du réseau.



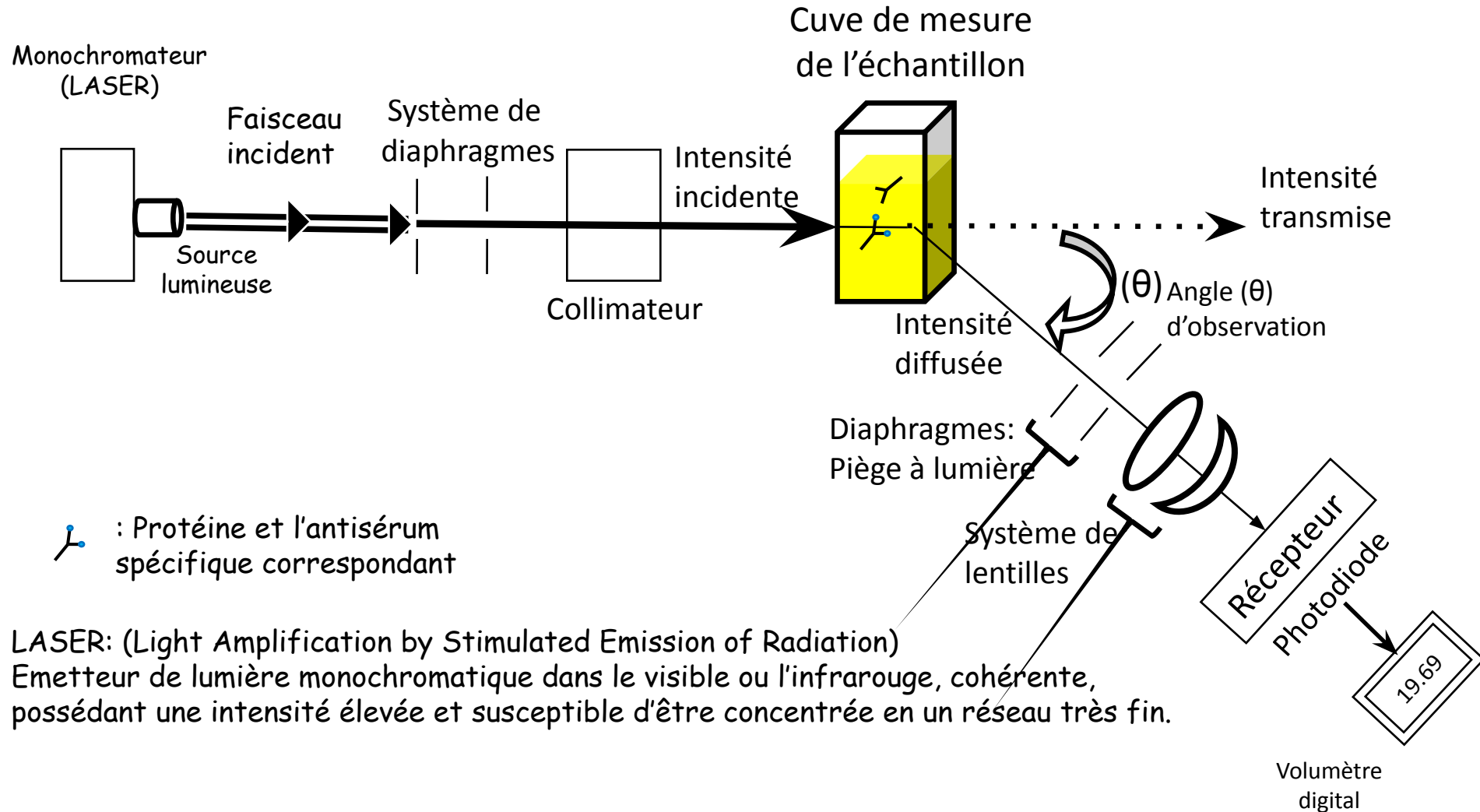
- **Techniques utilisant la précipitation en milieu liquide :**

-La néphélémétrie : mesure de la lumière (laser) dispersée par la formation de complexes immuns, méthode utilisée pour le dosage de protéines spécifiques dans les différents liquides biologiques (serum, urines, LCR):

- C'est une technique automatisée
- Permet le traitement de plusieurs échantillons en simultané
- Permet de doser plusieurs protéines dans le même échantillon

Méthodes

Néphélémétrie Laser



C- Précipitation en milieu gélifié :

- On utilise la gélose comme milieu solide dans lequel soit l'Ag, soit l'Ac soit les 2 diffusent
- Les gels les plus utilisés sont ceux issus d'une algue rouge marine : l'agar ou sa forme purifiée : l'agarose.

1- Immunodiffusion double ou méthode d'Ouchterlony : (prochaine diapo)

-Méthode purement *qualitative*

-Les Ag et les Ac sont déposés dans les puits et diffusent passivement dans la gélose .



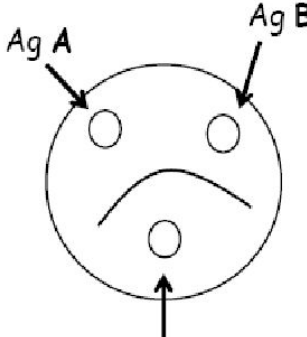
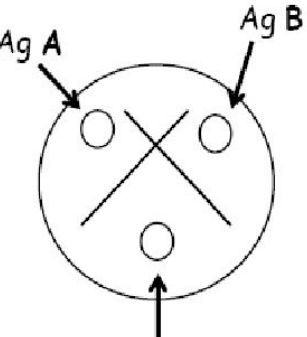
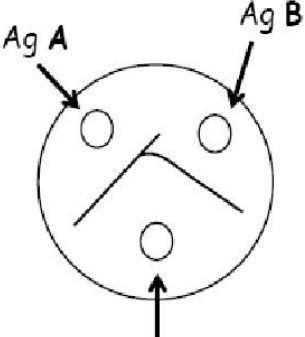
-La diffusion dure 24h-48h , aux concentrations optimales (zone d'équivalence), il y a formation d'une ou plusieurs lignes de précipitation.

Cette technique permet la détection et la comparaison de plusieurs systèmes Ag-Ac.

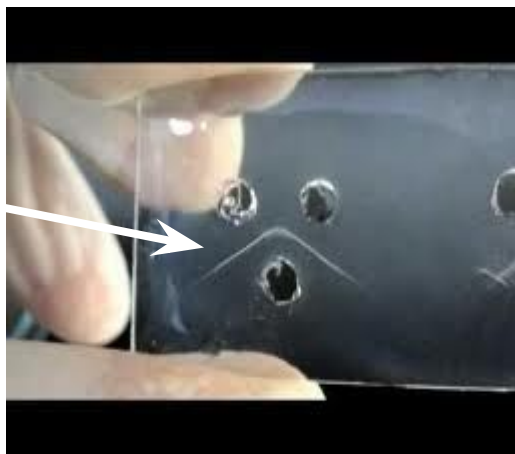
-Elle permet de:

- déterminer la pureté d'une solution antigénique ;
- déterminer l'identité (totale ou partielle) ou la non identité entre 2 solutions antigéniques.

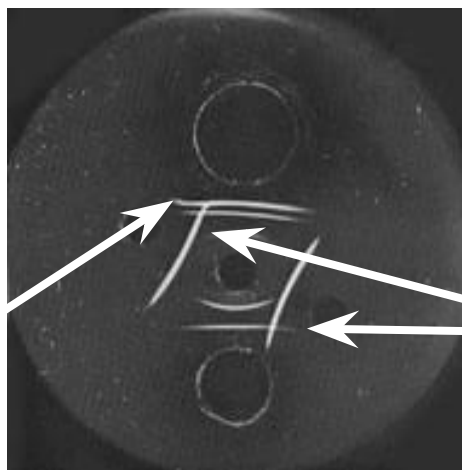
Exemple d'application : la recherche de protéines de Bence-Jones.

IDENTITE	OUI	NON	PARTIELLE
<p data-bbox="568 486 708 518">Antigènes</p> <div data-bbox="598 539 670 601">  </div> <p data-bbox="621 625 647 654">↓</p> <div data-bbox="598 675 670 736">  </div> <p data-bbox="621 761 647 789">↑</p> <p data-bbox="568 801 708 832">Anticorps</p>	 <p data-bbox="794 486 868 518">Ag A</p> <p data-bbox="1039 468 1113 499">Ag B</p> <p data-bbox="886 801 1021 832">Ac anti-A</p>	 <p data-bbox="1184 486 1258 518">Ag A</p> <p data-bbox="1406 468 1480 499">Ag B</p> <p data-bbox="1268 801 1403 832">Ac anti-A</p> <p data-bbox="1268 843 1403 875">Ac anti-B</p>	 <p data-bbox="1567 486 1640 518">Ag A</p> <p data-bbox="1788 468 1862 499">Ag B</p> <p data-bbox="1653 801 1788 832">Ac anti-B</p>
		<p data-bbox="1217 958 1498 1082">Les Ag A et B n'ont aucun déterminant antigénique commun</p>	<p data-bbox="1582 982 1946 1058">Les Ag A et B possèdent des épitopes communs</p>

Identité totale



Identité partielle

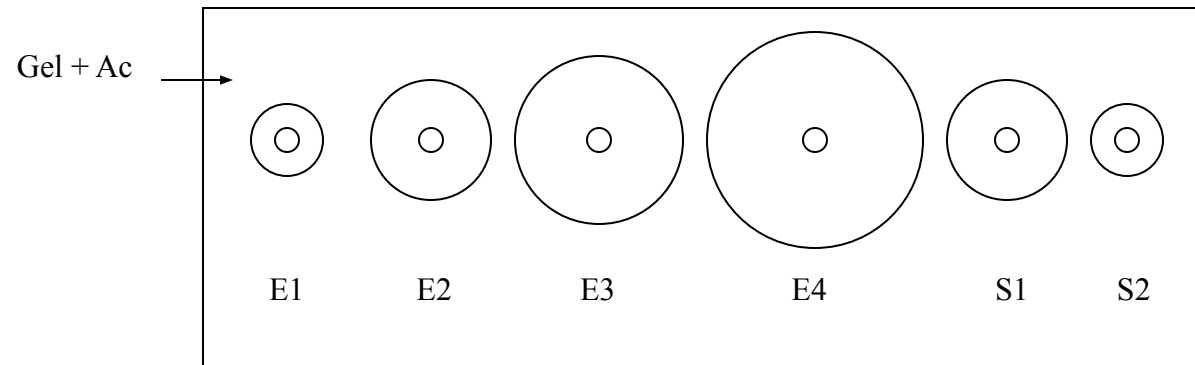


Absence d'identité

2-Immunodiffusion radiale ou méthode de Mancini :

- Méthode quantitative.
- On incorpore l'Ac dans la gélose, l'Ag diffuse à partir du puits. Après 48h, dans la zone d'équivalence se forme un anneau de précipitation dont le diamètre au carré est proportionnel à la quantité d'Ag, on se réfère à une courbe étalon (concentrations connues d'Ag).

Cette technique reste la méthode de choix pour le dosage de protéines de très faible concentration, comme l'IgD.



3-Techniques basées sur l'électroimmunodiffusion :

La diffusion est accélérée par un courant électrique, on parle d'électroimmunodiffusion. La gélose est dissoute dans du tampon alcalin.

Effet d'électro-endosmose :

Notamment en gel d'agar pur il est dû à la nature du support, où il y a formation de H_3O^+ qui vont ***inverser le sens de migration*** de certaines protéines faiblement chargées négativement à pH alcalin et qui vont donc migrer vers la cathode donc en sens inverse du courant électrique, c'est le cas des immunoglobulines. L'effet d'électro-endosmose permet une meilleure séparation antigénique.

a-Immuno-électrophorèse :

☐ IEP ou méthode Grabar:

- Technique ***qualitative et semi-quantitative*** ,, se déroule en 2 étapes :
- Séparation électrophorétique (1 à 2h) à PH alcalin (8,6).
- Immunoprécipitation des Ag séparés : on creuse une rigole centrale, on y dépose l'immunsérum monospécifique ou polyspécifique (détection d'une vingtaine de protéines sériques)

☐ La rencontre Ag-Ac se traduit par la formation d'une ligne de précipitation.

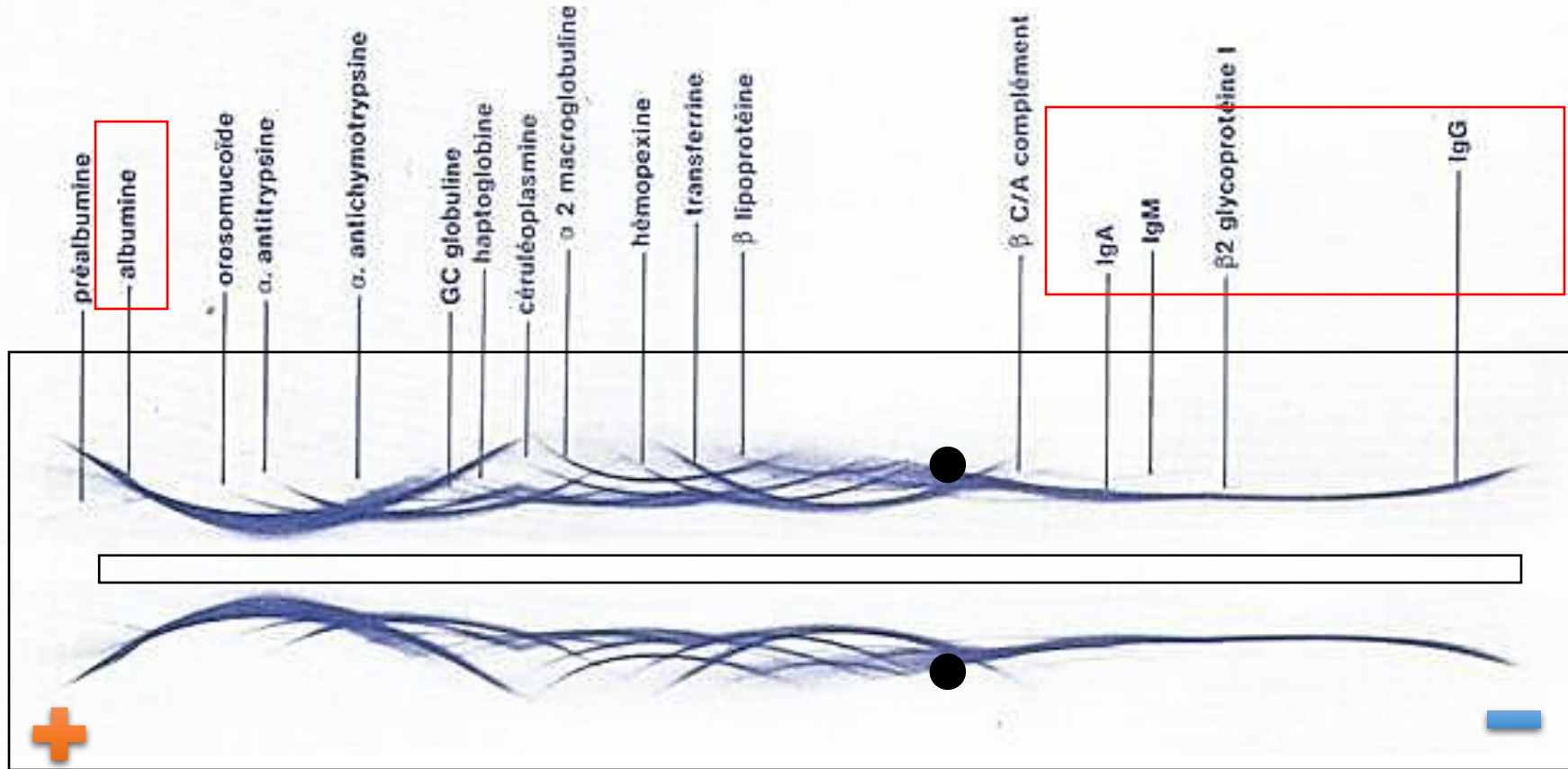
NB: l'analyse du sérum du malade se fait en parallèle avec un sérum témoin

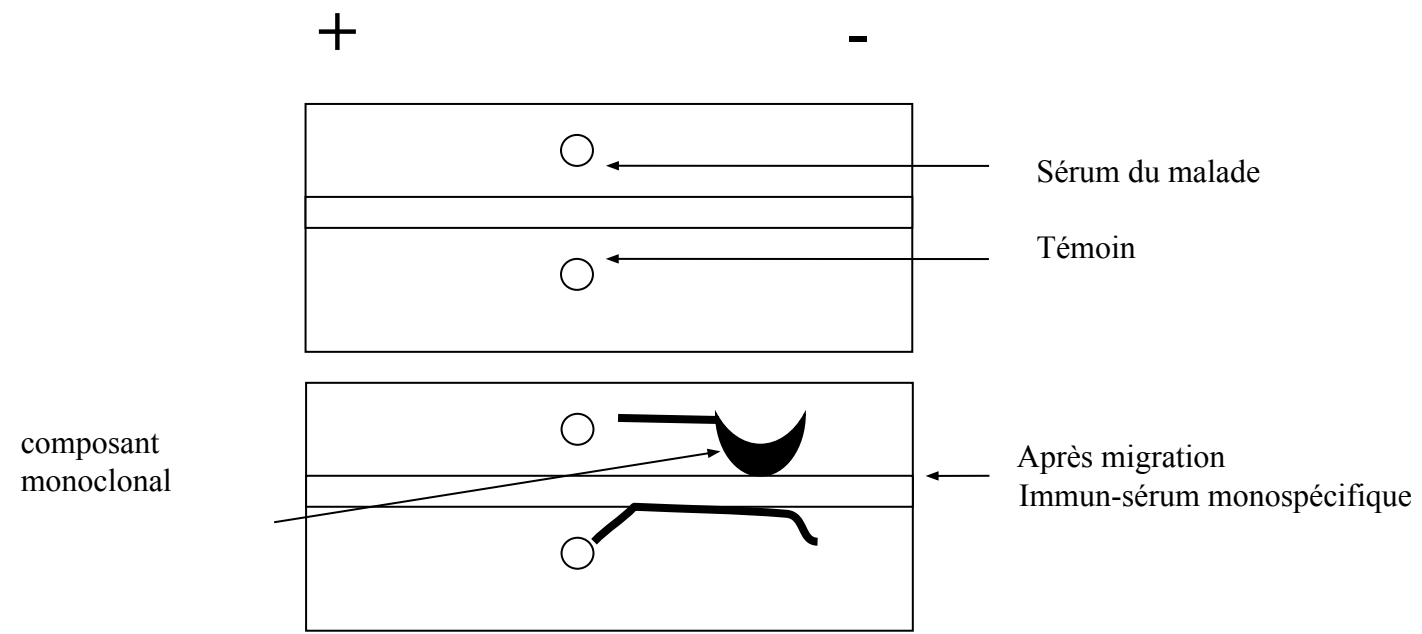
☐ Cette technique permet :

- de détecter plusieurs systèmes Ag-Ac
- de confirmer le ***caractère monoclonal d'un composant*** par l'apparition d'une ligne de précipitation anormale : sous forme d'arc, de cuillère, de dédoublement, d'une ligne de précipitation supplémentaire.
- une appréciation semi-quantitative : épaisseur de la ligne de précipitation (faible coloration : concentration faible)

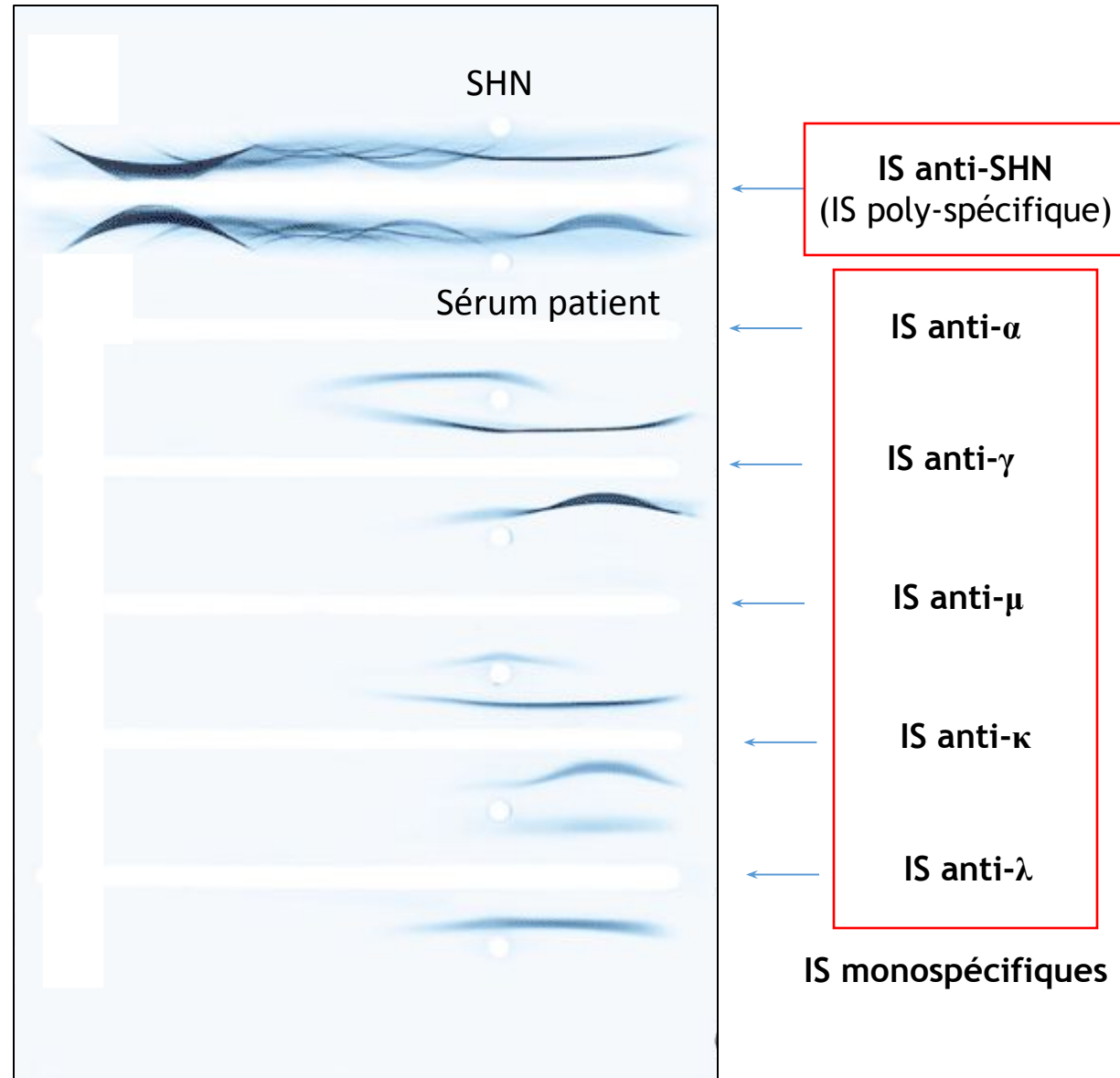
Cette technique reste une méthode de référence mais tend de plus en plus à être remplacée par l'immunofixation, plus rapide, plus performante et d'interprétation plus aisée , plus sensible.

ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE





ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE



b- Immunosélection : utilisée pour mettre en évidence des chaînes lourdes non associées à des chaînes légères

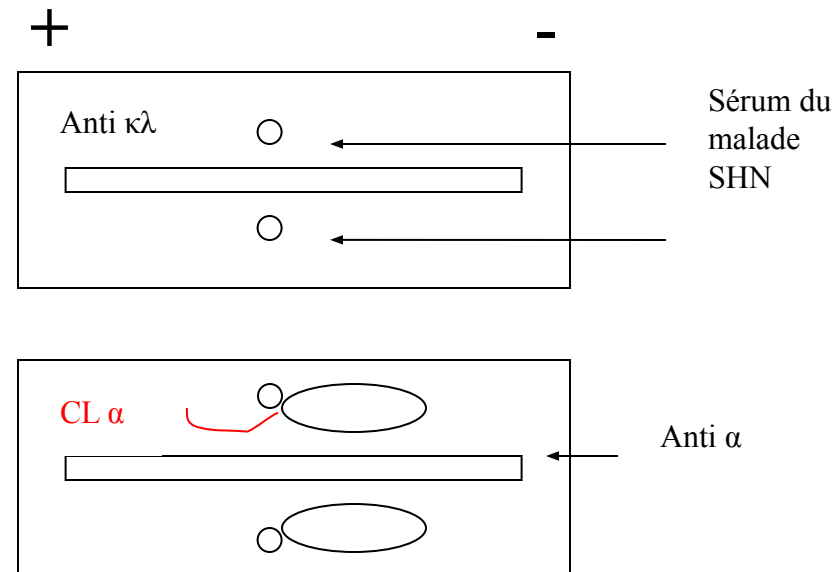
Exemple : maladie des chaînes lourdes alpha

☐ On coule un gel d'agar dans lequel on incorpore des chaînes légères kappa et lambda

☐ On creuse un puits pour y déposer le sérum du malade , en parallèle un autre puits pour le témoin (sérum humain normal : SHN)

(sérum humain normal : SHN)

☐ Après séparation électrophorétique, on dépose dans la rigole centrale des antichaînes lourdes alpha. Après diffusion et coloration, la présence de la chaîne lourde alpha est objectivée par la présence d'une ligne supplémentaire de migration anodique (les Ig entières ayant été précipité par les anti chaînes légères).



c-Immunofixation :

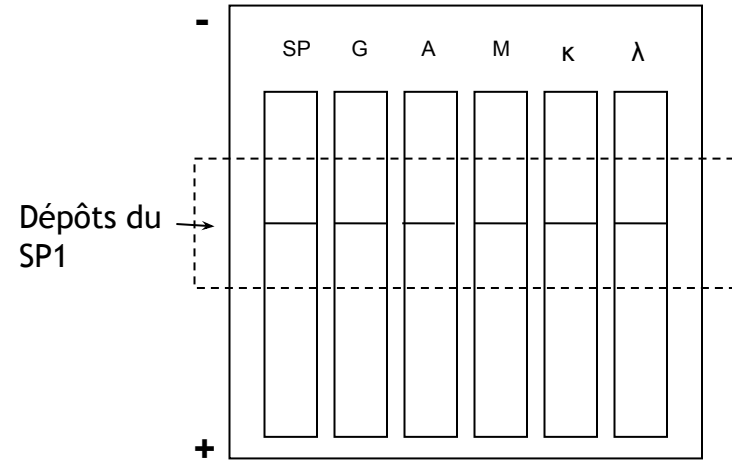
-Une électrophorèse de 6 dépôts du même sérum est réalisée sur gel d'agarose. Après la migration les 5 dernières pistes sont recouvertes d'un immunsérum spécifique (anti IgG, A, M, κ et λ respectivement) , la 1^{ère} piste est recouverte d'une solution de fixation des protéines.

-Après lavage et coloration, on objective les complexes immuns formés

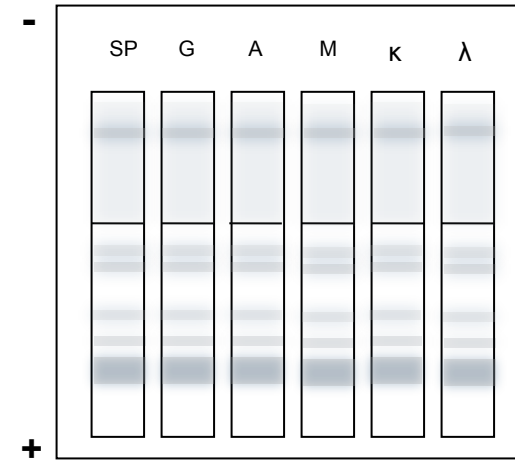
-Cette méthode est plus rapide et d'interprétation plus aisée que l'immunoélectrophorèse pour le diagnostic des immunoglobulines monoclonales (apparition d'une bande homogène)

TECHNIQUE D'IMMUNOFIXATION

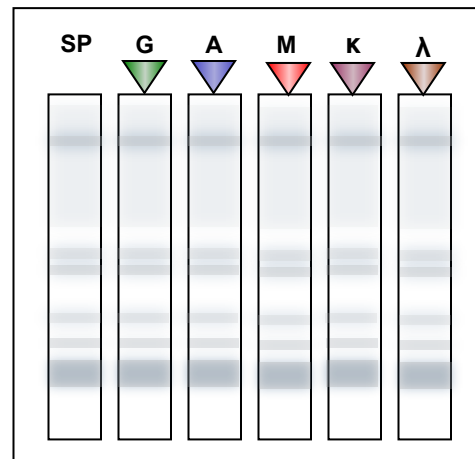
1^{er} Temps : Dépôt du SP1



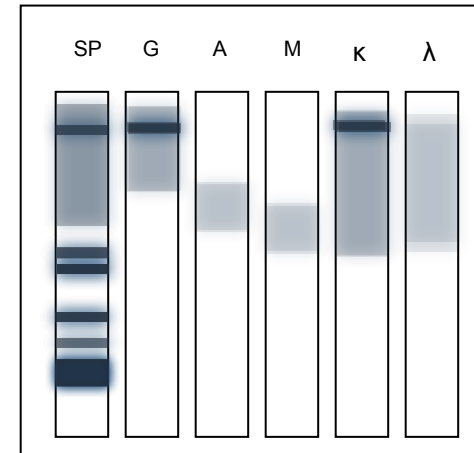
2^{ème} Temps : Electrophorèse



3^{ème} Temps : Dépôt IS



4^{ème} Temps : Révélation



Immunofixation
(précipitation,
lavages et
coloration)

▼ ▼ ▼ ▼ ▼ : IS mono-spécifiques

REACTIONS D'IMMUNO-AGGLUTINATION

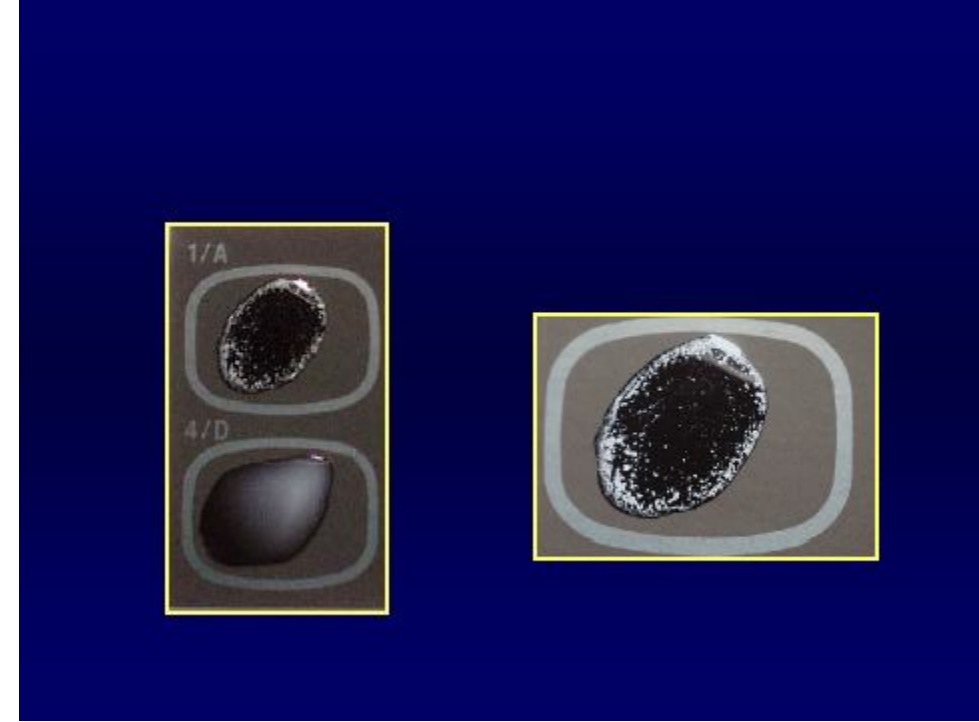
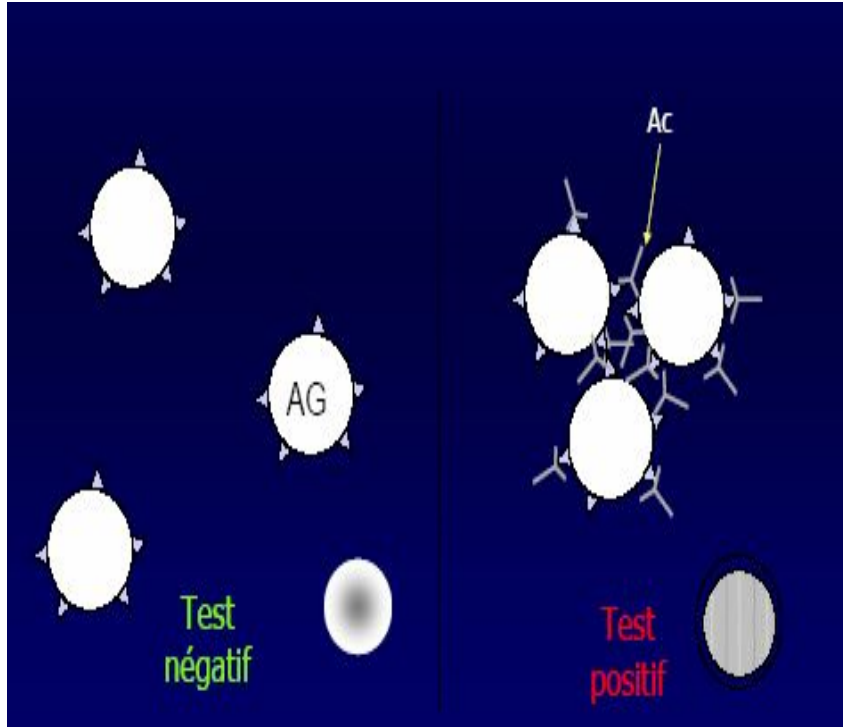
A) Définition:

- ❑ Formation d'un complexe immun entre des antigènes particuliers et les anticorps spécifiques agglutinants.
 - ❑ Ce complexe immun est visible à l'œil nu sous forme d'amas.
 - ❑ C'est un mécanisme d'agglutination qui a permis de découvrir les [groupes sanguins](#).
 - ❑ Technique de base de l'[immuno-hématologie](#), pour la détermination des [groupes sanguins](#) et la recherche des [anticorps irréguliers](#).
-
- L'agglutination est utilisée comme un test qualitatif de la présence d'Ac dans le sérum.
 - Permet également de titrer les Ac.
-
- Sensibilité = 0,001 à 0,3 mg/l

B) Types d'agglutination immunologique :

- Agglutination directe = active —→ faisant appel à des Ag particulaires —→ bactéries, hématies...
- Agglutination indirecte = passive —→ mettant en jeu des particules support sur lesquelles on fixe les Ag solubles.

C) Principe de la réaction d'agglutination



Formation d'un réseau —→ Pour sa réalisation, il faut ↓ les forces électrostatiques de répulsion entre cellules + création de ponts entre les cellules.

1) Types d'anticorps

Les Ac agglutinants:

- ❑ Agglutinent les cellules dans une solution de NaCl 0,15 mol/l (0,9%)
- ❑ IgM → agglutination directe (ex:test de coombs direct)

Les Ac non agglutinants:

- ❑ IgG (test de coombs indirect)

2) Types de particules

1. Dans le cas de l'agglutination directe
→ l'Ag appartient à la particule.

Si la particule est:

- GR → Hémagglutination
- GB → Leucoagglutination
- Plaquelette → Thromboagglutination
- Bactéries.

→ On connaît l'Ag et on cherche l'Ac.

2. Dans les autres cas —→ il faut fixer l'Ag sur les particules :

- GR de différentes espèces
- Particules inertes —→ cristaux de cholestérol, particules de charbon ou de latex.

3) Paramètres intervenant dans l'agglutination

1-Nombre de sites à la surface de la particule:

Est +++ : Ac agglutinant peut devenir non agglutinant si le nombre de sites est insuffisant.

- Crypto antigènes : inaccessibles à l'Ac

2. Influence de la T°:

T° est directement lié à la structure de l'Ac étudié :

- IgM = Ac à optimum thermique
froid : Ac froids (4°C)
- IgG = Ac à optimum thermique
chaud : Ac chauds (37°C)

3. PH neutre :

Concentrations de l' Ag et de l'Ac

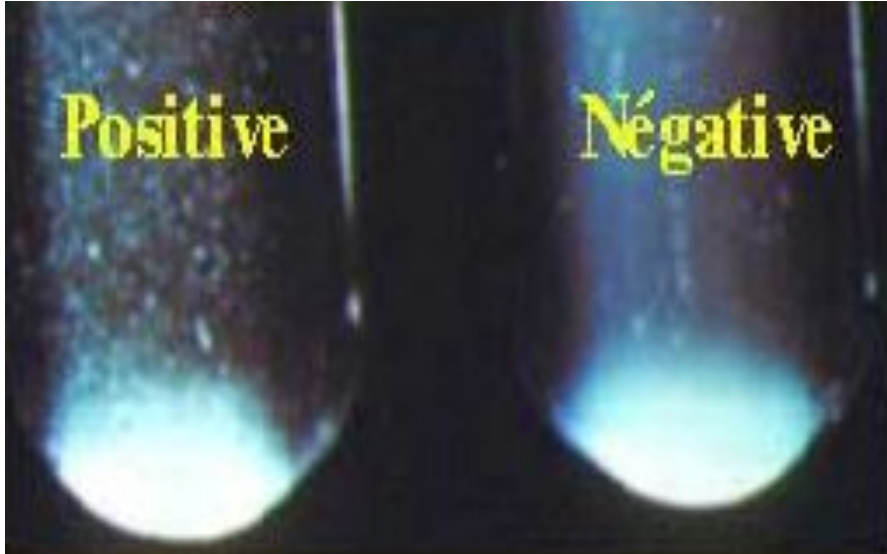
Phénomène de prozone

- A forte concentrations d'Ac, le nombre de sites de liaison de l'Ac peut excéder celui des épitopes antigéniques
- Les Ac ne se lient à l'Ag que d'une façon univalente ,Il n'y a donc pas de formation de l'agglutination
- S'observe avec certains sérums (anti-brucelliques).
- Disparaît en présence de concentrations salines élevées ou après adjonction de certaines protéines telles que l'albumine
- Particularité utilisée pour la titration des Ac dans certaines infections(Brucellose paludisme...)
- Le même phénomène de prozone se produit également en excès d'Ag.

4-Aspect qualitatif

Suivant le système Ag - Ac étudié ,la réaction peut s'effectuer en tubes ou sur lame de verre.

Réaction d'agglutination en tubes



Sérum + Ag figurés (GR, bactéries)

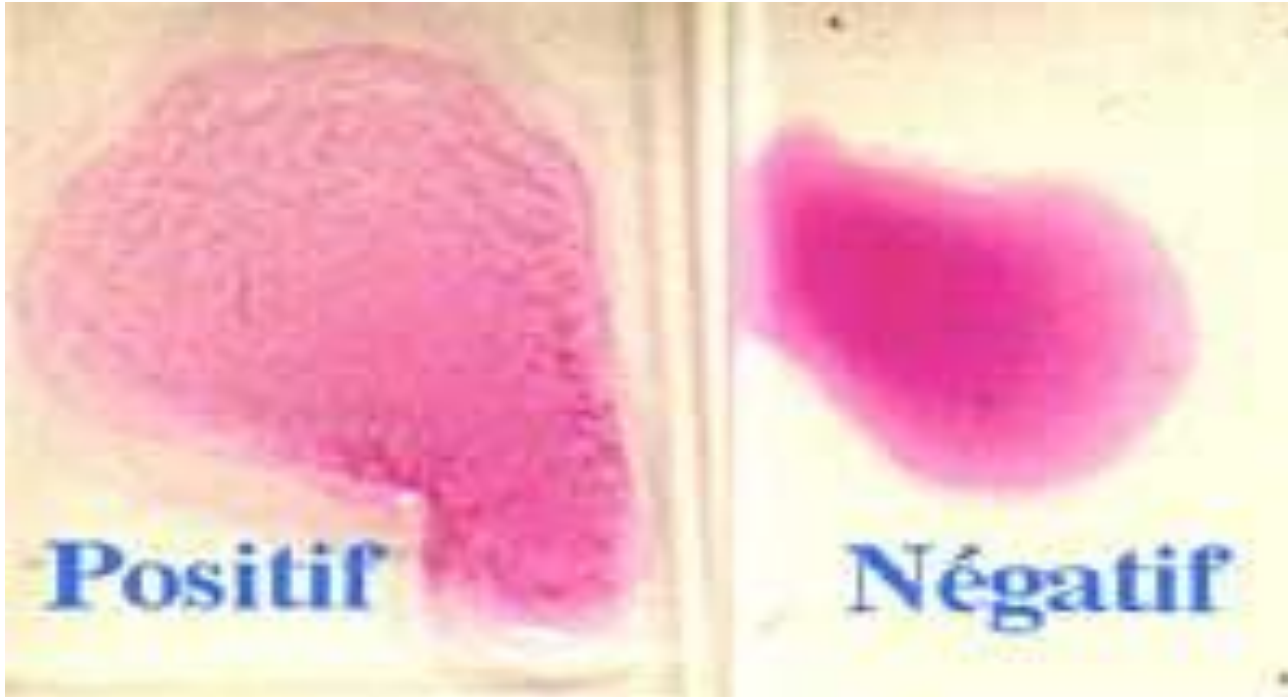
Formation d'un culot de sédimentation.

Après incubation, on agite légèrement le tube.

Lecture se fait à l'œil nu.

Culot se fragmente en amas très nets → Réaction +

Réaction d'agglutination sur lame



1 goutte de sérum
+ 1 goutte de
suspension
antigénique.
Lecture se fait au
microscope

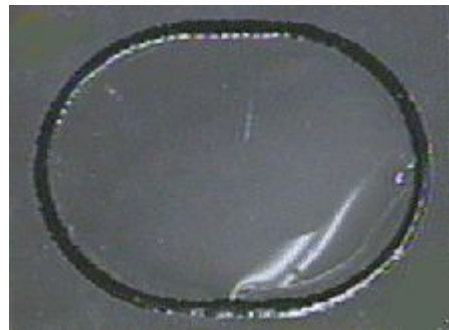
Amas ± volumineux, tandis que le
fond de la préparation s'éclaircit

Préparation reste homogène

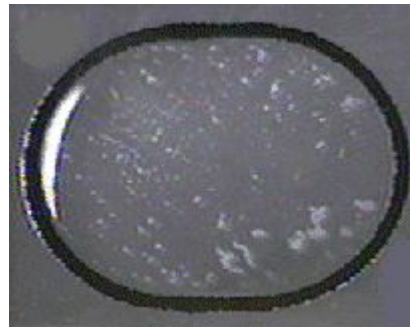
Technique sur lame. Exemple du sérotypage des Ag O, H et Vi chez *Salmonella*

- Si la souche possède l'antigène correspondant à l'antisérum testé, il se forme des agglutinats visibles à l'œil nu (parfois plus visibles si on regarde la lame par dessous)
- cette agglutination repose sur la détermination des antigènes O qui donne une **agglutination grumuleuse**

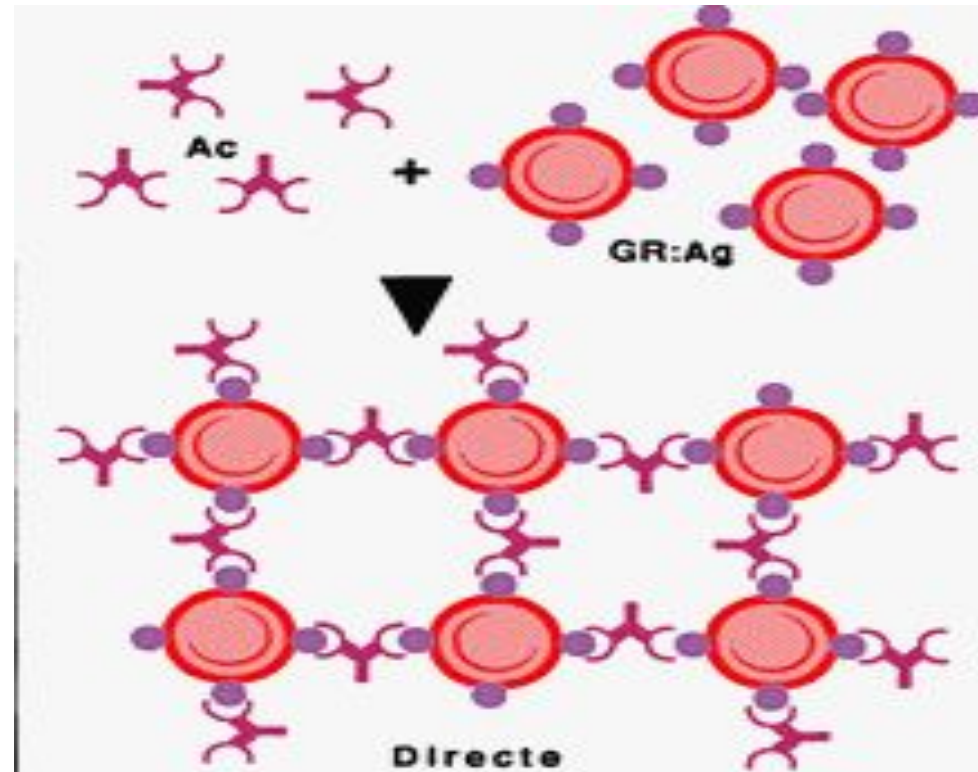
Test négatif



Test positif



REACTIONS D'AGGLUTINATION DIRECTE

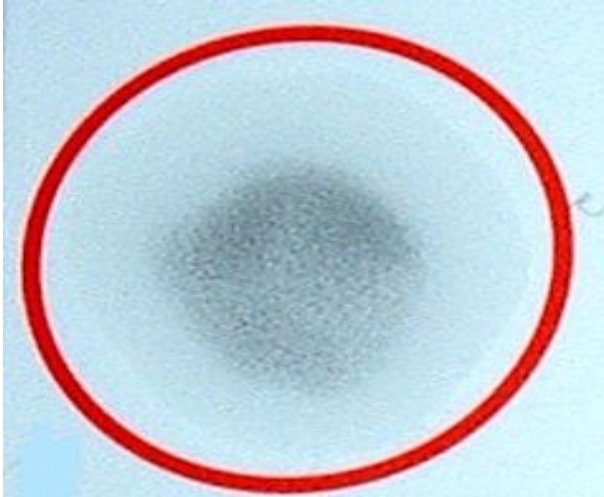


Agglutination directe \longrightarrow l'Ag est
naturellement porté par la particule.

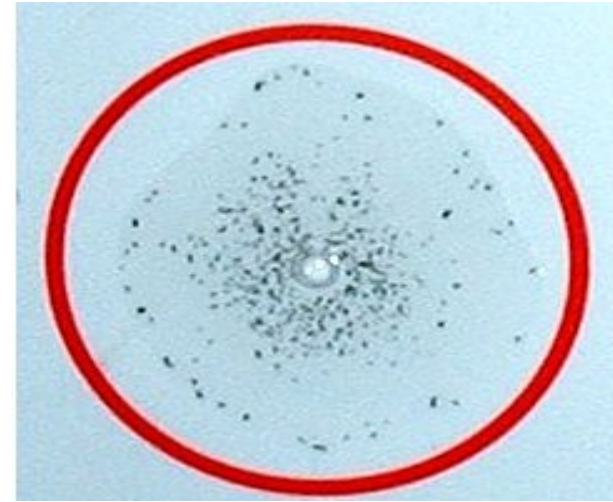
On se place dans un milieu salin (NaCl à 9
pour mille).

- Les Ac mesurés sont des IgM car celles-ci sont pentamériques et permettent donc de plus gros agglutinats.
- Ces IgM sont chargées négativement et vont attirer les cellules positivement chargées.
- On se sert de l'agglutination directe pour la recherche des groupes sanguins.

Comment lire les résultats ?



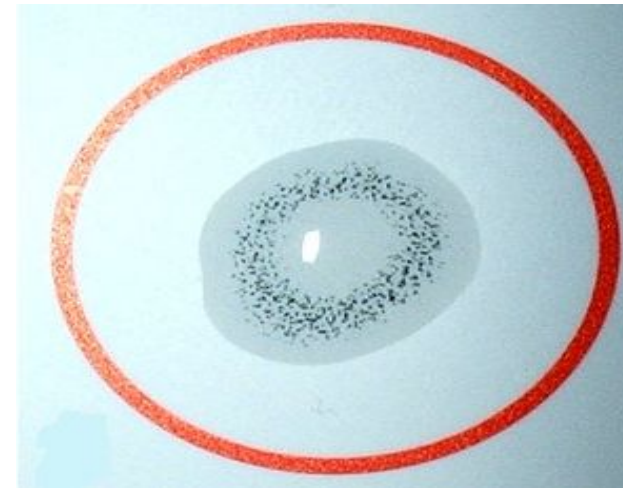
Pas d'agglutination



Agglutination +



Agglutination ++

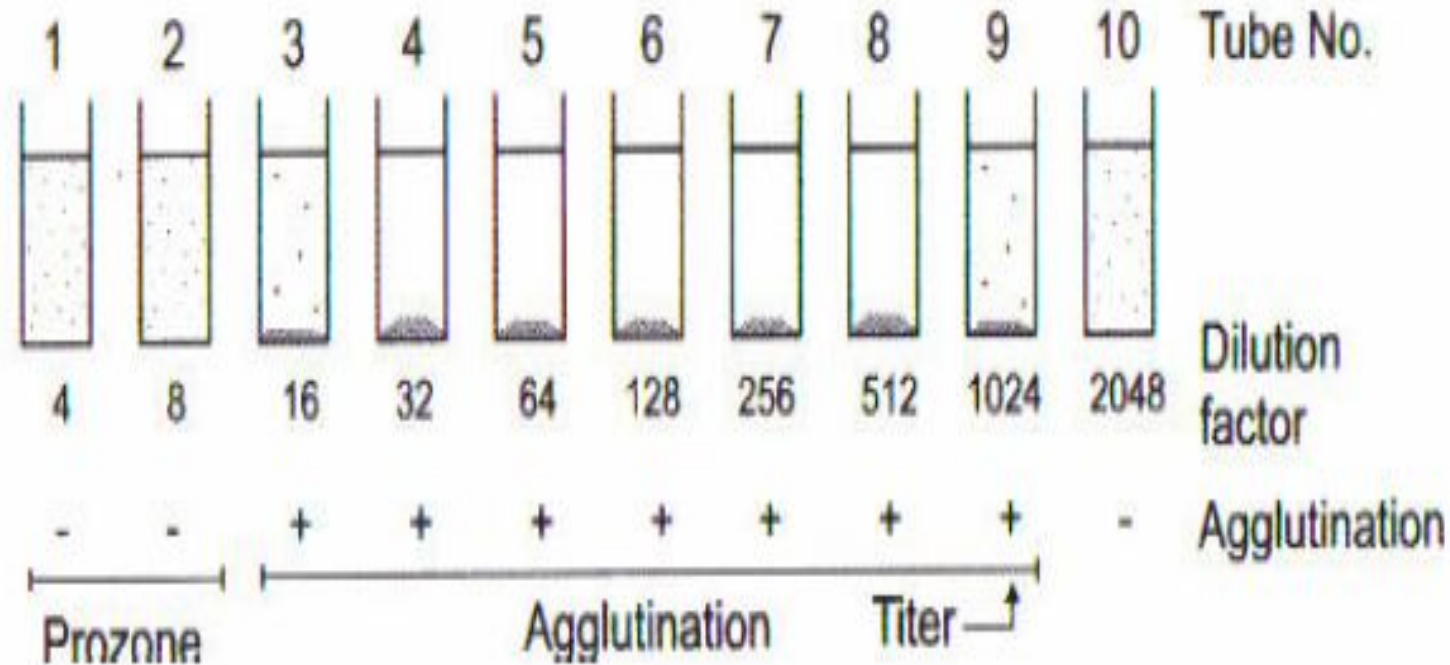


Agglutination +++

5-Aspect quantitatif

- Réactions d'agglutination, très sensibles, permettent de détecter de très faibles quantités d'Ac.
- Méthode de dilutions successives est semi quantitative.

Titration des réactions d'agglutination sur tubes



Série de tubes dans lesquels on introduit des quantités fixes d'Ag + dilutions successives du sérum.

Si Ac est présent dans le sérum → Agglutination

Titre en Ac du sérum correspond à la dilution la plus grande associée à une agglutination franche.

D-Applications

La réaction d'agglutination est à la base de nombreuses techniques sérologiques utilisées à des fins de diagnostic ou de recherche.

a. Hémagglutination directe :

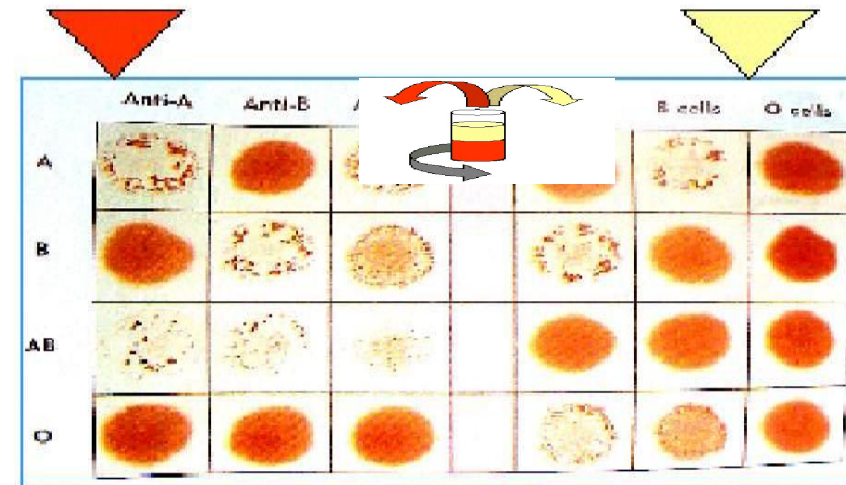
- Groupage ABO et Rhésus
- Etudes des Ag érythrocytaires
- Recherche d'Ac anti-érythrocytaires pathologiques: auto-Ac au cours de certaines AH et Ac immuns post-transfusionnels ou par iso-immunisation fœto-maternelle
- Dosage des Ac anti-A et anti-B.

Groupe sanguin ABO

- Les anticorps anti ABO **IgM** naturels sont chargés négativement et vont attirer les cellules positivement chargées.
- Ce sont des Ac réguliers (présents quand l'Ag correspondant est absent et inversement.)
Les globules rouges du sang possèdent à leur surface l'épitope A et/ou B ou aucun de ces deux épitopes. Ce qui permet la détermination des groupes sanguins dans le système ABO selon les méthodes de Beth Vincent et Simonin

Hemagglutination

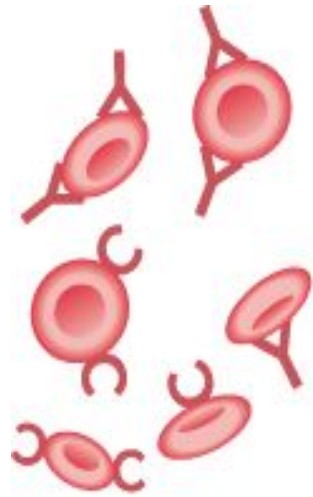
	red blood cells from individuals of type			
serum from individuals of type	AB	O	B	A
A Anti B antibodies	agglutination	no agglutination	agglutination	no agglutination
B Anti A antibodies	agglutination	no agglutination	no agglutination	agglutination
O Anti A + B antibodies	agglutination	no agglutination	agglutination	agglutination
AB no antibodies to A or B	no agglutination	no agglutination	no agglutination	no agglutination



Test de Beth-Vincent
identification des AG
érythrocytaires

Epreuve de Simonin-Michon
identification des AC
sériques

Direct Coombs' Test.



RBCs with IgG (Y)
or C3 (C) bound to
membrane



Incubation with
antibodies to
human Ig (X)
and C3 (C)



Agglutination
(positive direct
Coombs' test)

Indirect Coombs' Test.



Patient's serum
with IgG (Y)



Incubation with
reagent RBCs

Binding of any
IgG to reagent
RBCs



Incubation with
antibodies to
human Ig (X)



Agglutination
(positive indirect
Coombs' test)

b. Réactions d'agglutination directe de bactéries :

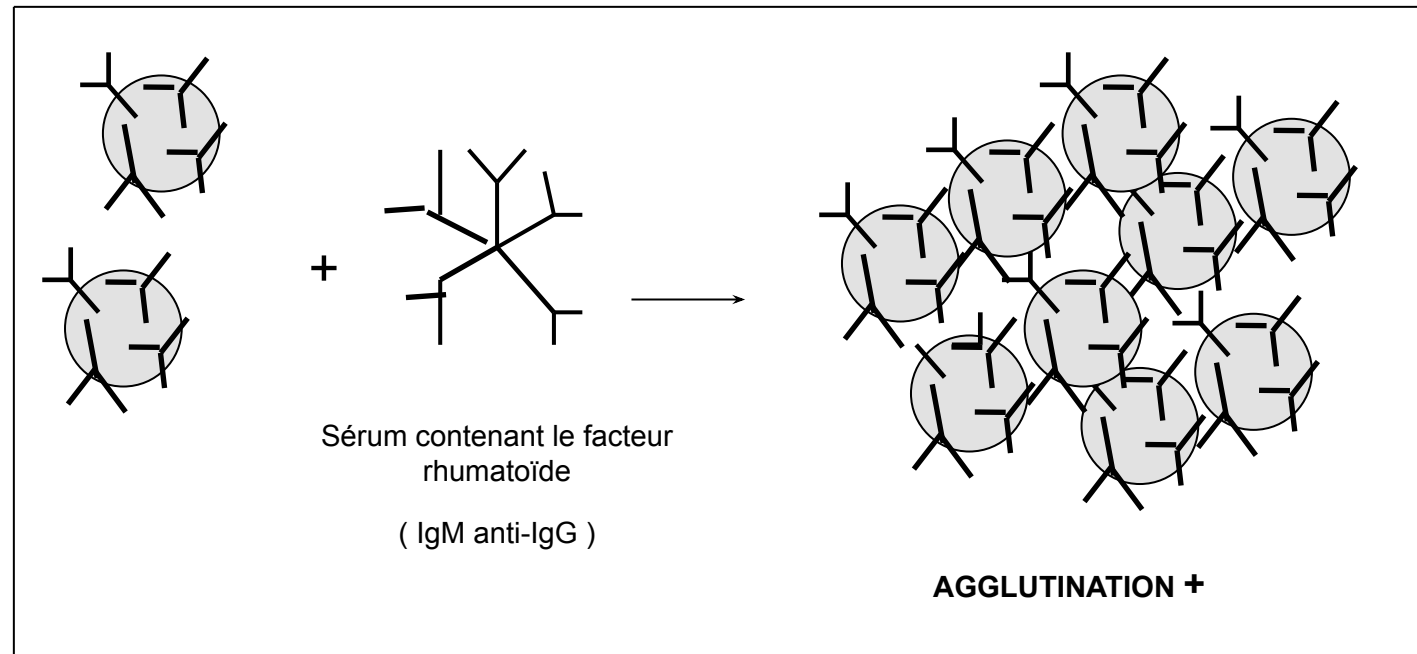
- Réaction de Whright : brucellose
→ agglutination d'une suspension de brucelles par le sérum de malade atteint de fièvre de Malte.
- Réaction de Widal et Felix salmonelloses.
- Typage et recherche de germes E. Coli, streptocoques.

c. Applications courantes

1-Dosage du facteur rhumatoïde :

IgM rencontrée tout particulièrement chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde. Différents tests permettent de le mettre en évidence :

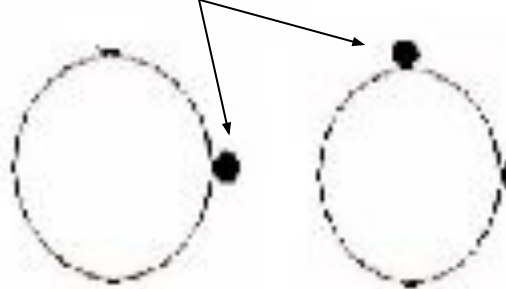
L'Ag est fixé aux particules de latex par simple contact à pH 8,2



Réaction de Waaler-Rose

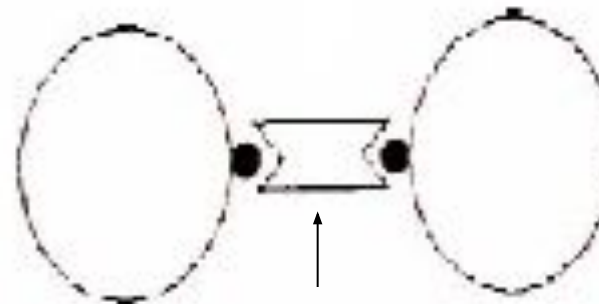
Réaction négative

Ac anti-GR humains (IgG de lapin)



GR humains (O Rh⁻)

Réaction positive



IgM anti-IgG

2. Réaction de Kline → Ac sériques

dirigés contre certains Ag lipidiques du

tréponème de la syphilis en présence de

particules de cholestérol

3. VDRL (veneral disease research laboratory):

- Réaction à Ag non tréponémique
- Méthode plus sensible
- Ag utilisé est d'origine cardiolipidique constitué de microcristaux de cholestérol sur lesquels sont adsorbés les molécules de cardiolipide.

4.TPHA: (Treponema pallidum hemagglutination assay):

- Réaction à Ag tréponémique
- confirme le diagnostic de syphilis (si douteux)
- Ag utilisé est un lysat de tréponema pallidum adsorbé sur des hématies.