

TD 02 : Techniques immunologiques: Immunoprécipitation

II-1-1- Réactions de précipitation

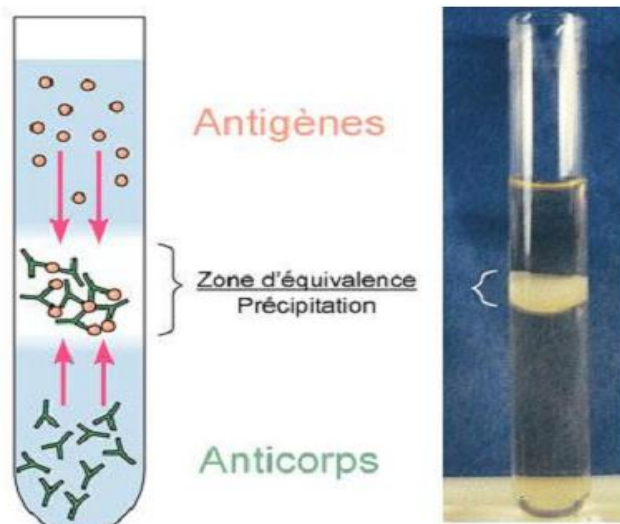
II-1-1-1 Aspects fondamentaux de l'immunoprécipitation

- c'est une réaction qui apparaît dans un milieu liquide ou gélifié entre un antigène soluble et 1 anticorps précipitant (IgM, IgG).
 - le précipité est dû à la formation d'un réseau macromoléculaire tridimensionnel qui est visible à l'œil nu, Plus le réseau macromoléculaire sera de grande taille, plus il aura tendance à précipiter.
 - l'anticorps doit être au moins bivalent (2 paratopes) : Fab ne donne pas de précipité ; seuls les sérums polyclonaux donnent des réactions de précipitation.
- l'antigène doit être au moins bivalent (2 épitopes) : un haptène ne donne pas de réactions (un seul épitope) ; mais si l'haptène est couplé à une protéine porteuse, ça marche.

II-1-1-2 Précipitation en milieu liquide

A- Aspect qualitatif

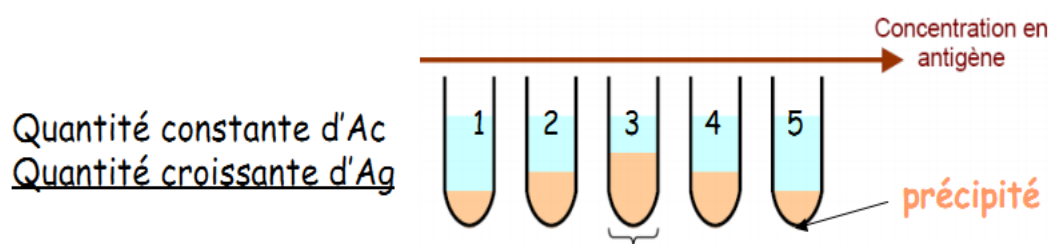
La méthode dite **test de l'anneau** ou « **Ring test** » constitue la technique qualitative la plus simple pour savoir si un sérum contient ou non des anticorps. Elle est basée sur la diffusion des AC et des AG solubles (non mélangé), qui aboutissent, lorsqu'il y a autant de paratopes que d'épitopes (à l'équivalence) à la formation d'un anneau de précipitation correspondant à la formation de complexes en réseau.



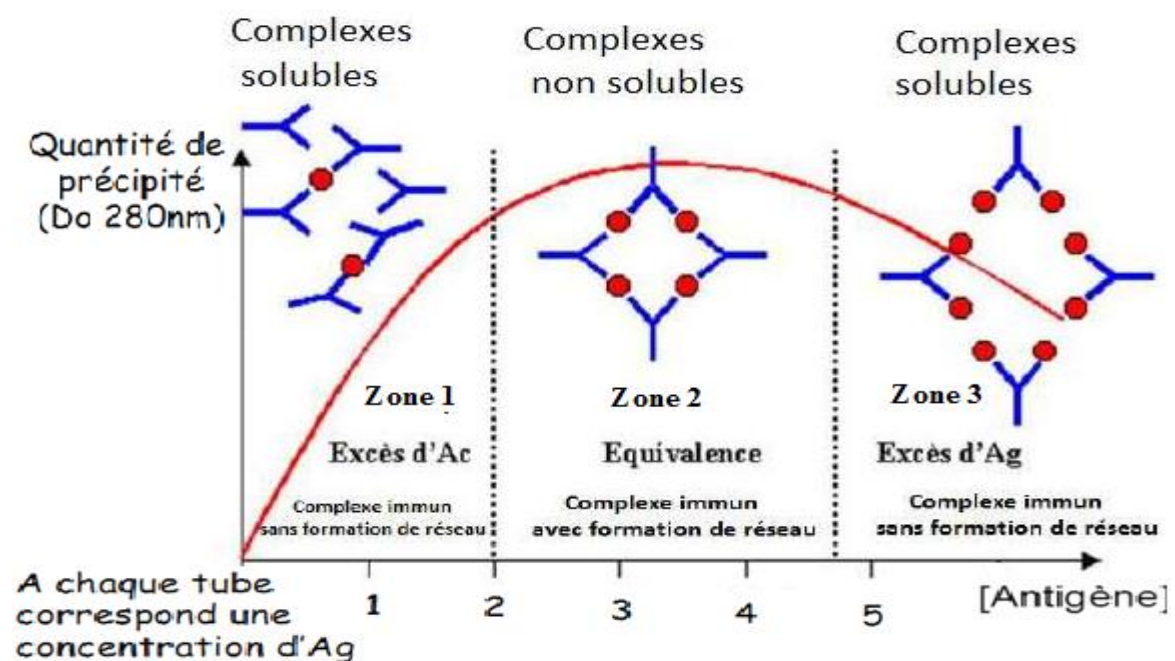
B- Aspect quantitatif

B1- La courbe de précipitation (courbe de Heidelberger et Kendall) et obtention de la zone d'équivalence

Une série de tubes est préparée avec une quantité constante d'AC et des quantités croissantes d'AG, tout en maintenant constant le volume totale. La réaction se déroule pendant une nuit (afin que la précipitation soit complète) puis une centrifugation est réalisée pour recueillir le précipité. On compare la quantité de précipité en fonction de la concentration de l'antigène.



À partir de ces données expérimentales, on détermine une courbe de précipitation.

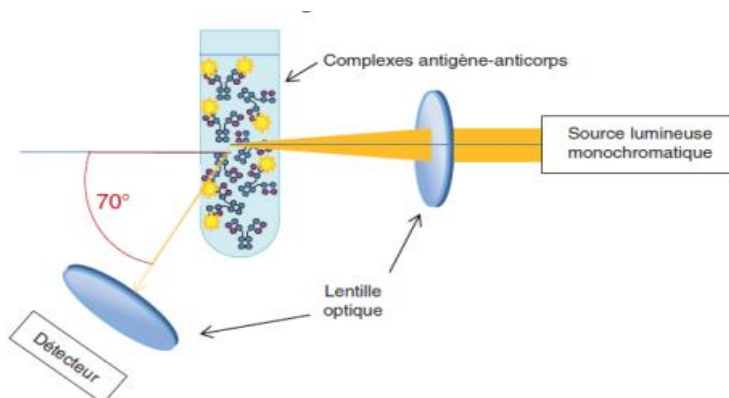


Cette courbe décrit les variations de la quantité de complexe Ag-Ac précipités en fonction de quantité d'Ag ajoutée. En cas d'excès d'Ac par rapport aux Ag (**Zone 1**) ou le contraire (**zone 3**),

il y'a formation de complexes immuns solubles dont la quantité est proportionnelle à la concentration d'Ag. En rajoutant de plus en plus d'Ag (par rapport à la zone 1) on remarque la formation de complexes immuns non soluble (réseau) qui précipitent. On dit alors **que la zone d'équivalence** est atteinte (**zone 2**). Dans cette zone, la relation Ag/Ac possède la valeur optimale pour la formation d'un maximum de précipitants.

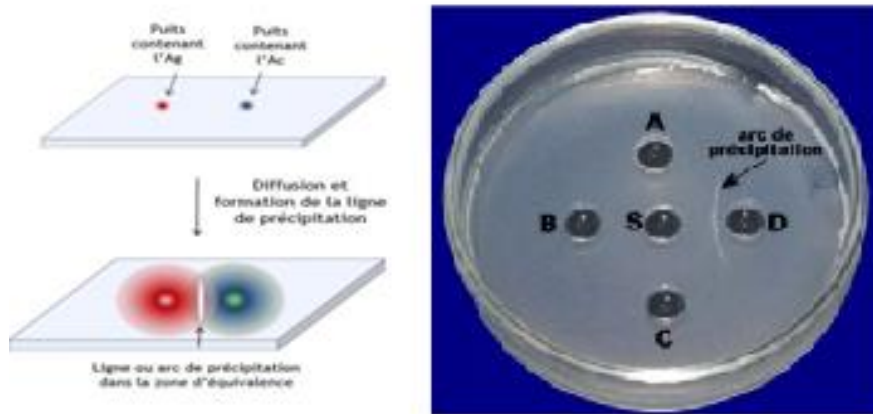
B-2 La technique de Néphélémétrie

La précipitation de complexes antigène/anticorps en milieu liquide peut permettre un dosage très précis des antigènes. En effet, la formation de ces complexes entraîne une augmentation de la turbidité du milieu qui, à concentration d'anticorps constant, ne dépend que de la quantité de l'antigène à doser. Les variations de turbidité du milieu sont mesurées à l'aide d'un néphélémètre. Cet appareil possède un rayon laser dont le faisceau traverse la cuve où à lieu la réaction antigène/anticorps. L'augmentation de turbidité du milieu entraîne une déviation du faisceau qui est analysée par des photomultiplicateurs et comparée à la déviation obtenue avec des quantités connues d'antigène (courbe de calibrage). On en déduit la quantité d'antigène présente dans l'échantillon à doser.



II-1-1-3 Précipitation en milieu gélifié

Lorsqu'un antigène soluble et un anticorps sont introduits dans un milieu gélifié en des points différents, ils diffusent selon **un gradient de concentration** et il y'aura une réaction Ag-Ac avec **une proportion optimale des deux réactifs** (Ag et Ac) qui permettra la formation d'un précipité, au point de rencontre, sous forme d'arc, c'est **la zone d'équivalence**

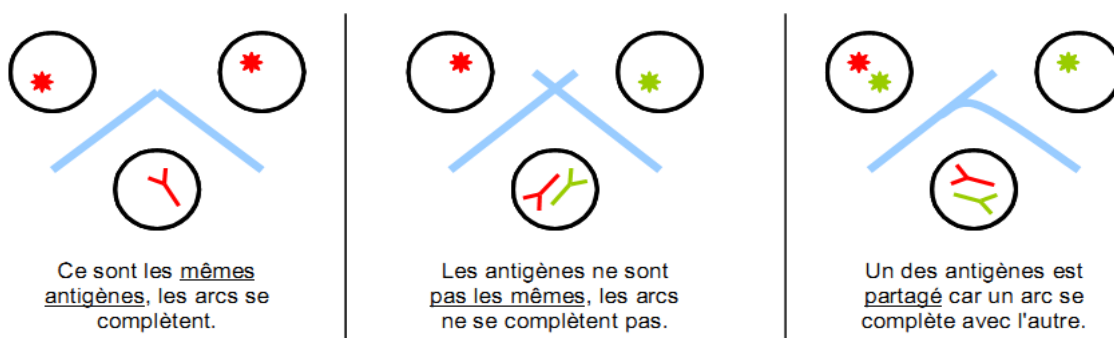


A- Immunodiffusion double (méthode Ouchterlony)

C'est une méthode qualitative utilisée pour différencier et identifier des antigènes dans un mélange. Cette technique est basée sur la double diffusion Ag et Ac dans un gel en fonction de leur poids moléculaire.

Les solutions d'Ag et d'Ac sont déposées dans des puits percés à distance les uns des autres dans un gel d'agarose. Les molécules diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Quand il y a réaction entre les solutions, il se forme un arc de précipitation visible à l'œil nu. Celui-ci est dû à l'interaction entre de nombreux anticorps et les antigènes spécifiques, entraînant la formation de complexes immuns.

Les arcs de précipitation peuvent être de trois types. deux arcs qui fusionnent indiquent une identité entre les antigènes. si les arcs sont indépendants, les antigènes reconnus ne sont pas identiques. En fin, si les arcs fusionnent mais en formant un éperon, les antigènes sont partiellement identiques, l'un d'eux présentant des épitopes absent sur l'autre.



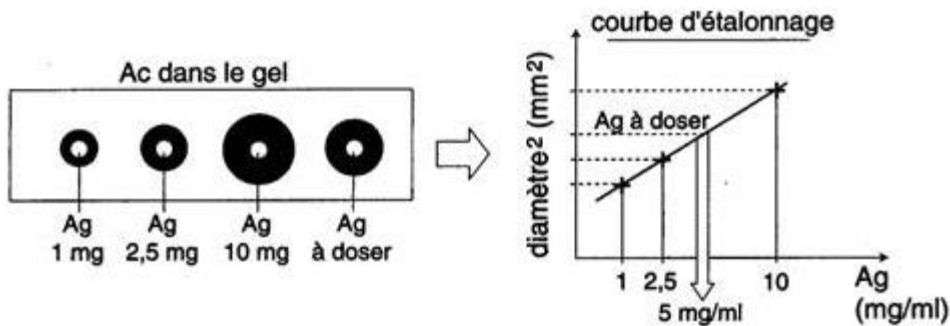
Reaction d'identité

Reaction de non identité

Reaction d'identité partielle

B- Immunodiffusion radiale (méthode de Mancini)

Cette méthode consiste à incorporer un anticorps spécifique dans un gel (agarose) et à déposer la solution d'Ag dans des puits. Après la diffusion et à l'équilibre On observe des cercles de précipitation dont le carré du diamètre est proportionnel à la concentration de l'Ag. La concentration est exprimée par référence à une courbe standard avec un Ag de concentration connue.

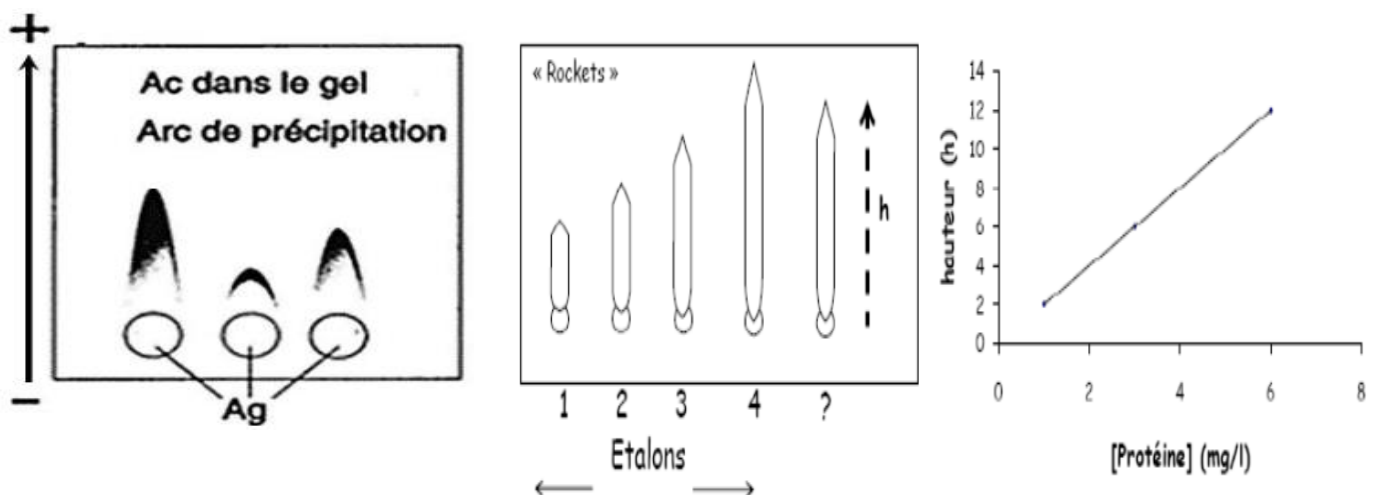


C- Electrophorèse en fusée (Technique de Laurell)

Cette méthode a le même principe que la technique de Mancini mais la réaction est accélérée par un champ électrique.

Dans un gel contenant des anticorps, on y dépose des antigènes dans la cathode et les font migrer vers l'anode (+). Après quelques heures on observe la formation des arcs de précipitations étalées et incurvées sous forme de fusées dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'Ag.

En reportant les valeurs obtenues sur une courbe d'étalonnage établie avec des solutions de concentration connue (comme dans la méthode de Mancini), il est possible de doser les antigènes contenus dans une solution.



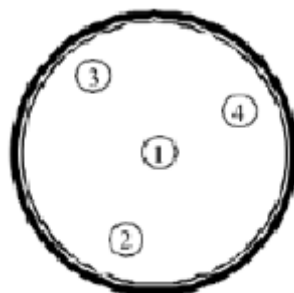
❖ Applications

Exercice 1

L'identité et la pureté d'une solution d'albumine sont vérifiées par la technique Ouchterlony. Des puits sont creusés dans un gel en boîte de pétri. On répartit dans ces puits des réactifs selon le tableau ci-dessous :

| Puits | Solution |
|-------|------------------------------|
| 1 | Albumine à étudier |
| 2 | Sérum anti-albumine humaine |
| 3 | Sérum anti-globuline humaine |
| 4 | Sérum anti-humain total |

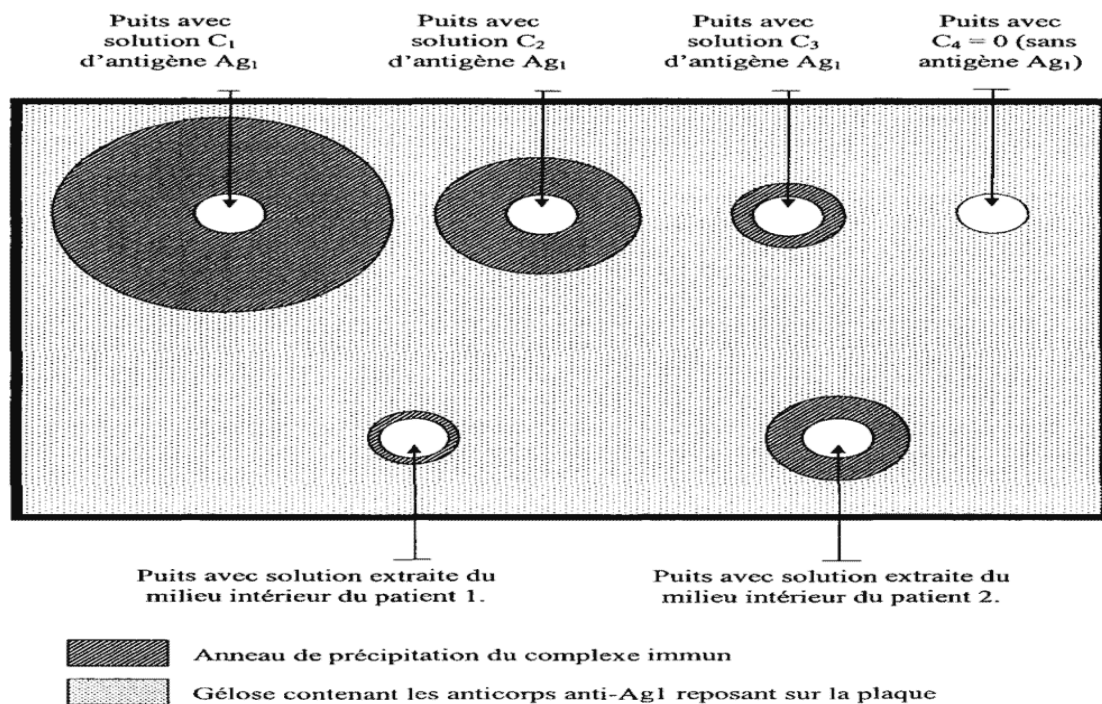
- La solution à étudier ne contenant que de l'albumine,
 - 1- représenter schématiquement l'aspect observé pour la boîte après 48 heures d'incubation, sur la figure ci-dessous.
 - 2- justifier ces résultats.



Exercice 2

On souhaite savoir si deux patients ont été en contact avec des antigènes connus et si ces antigènes sont présents chez eux dans les mêmes proportions. Pour cela on s'intéresse à la formation de complexes immuns. L'utilisation de gélose permet une migration rapide des molécules antigéniques, ce qui facilite ainsi la formation et l'observation de tels complexes.

La formation des complexes immuns selon la technique de Mancini se réalise sur une plaque recouverte d'une gélose, de hauteur constante sur toute la surface de la plaque et à laquelle est mélangé un sérum contenant des anticorps anti-antigène Ag1. Les solutions de concentrations décroissantes (C1, C2, C3 et C4) en Ag1 sont placées dans les puits creusés dans la gélose selon le schéma cidessous. Les antigènes diffusent dans la gélose.



- À partir de l'exploitation du document, fournissez les arguments permettant :
 - 1- d'indiquer si ces patients possèdent dans leur organisme les antigènes Ag1 recherchés;
 - 2 - de préciser lequel des patients 1 ou 2 possède la plus grande concentration d'antigènes.

Exercice 3

Lors de cette technique, l'anticorps (ici : anticorps anti-ovalbumine) est incorporé dans la gélose à une concentration constante. Les antigènes (ici : solutions mère et filles d'ovalbumine et le blanc d'œuf) sont déposés dans des puits creusés dans la gélose d'où ils diffuseront de façon radiale et décroissante : immunodiffusion radiale simple. Dans la zone d'équivalence antigénique, il se forme un anneau de précipitation dont le carré du diamètre est proportionnel à la concentration en antigène. La concentration en antigène de la solution à tester (ici l'ovalbumine du blanc d'œuf) est exprimée par référence à la courbe étalon obtenue grâce à l'antigène de concentration connue (ici les solutions mère et filles d'ovalbumine).

| Solutions | Sol mère | SF1 | SF2 | SF3 | Blanc d'œuf |
|-------------------------------------|----------|-----|-----|------|-------------|
| Diamètre (mm) | 11 | 8 | 6 | 4 | 9 |
| [C] ovalbumine (g.L ⁻¹) | 2 | 1 | 0,5 | 0,25 | X |

- Donnez la concentration de l'ovalbumine du Blanc d'œuf par la méthode de Mancini sachant que la solution de blanc d'œuf correspond à une dilution au 1/10 de la dissolution du blanc d'œuf pur.