

# Réactions de précipitation

## Réactions d'agglutination et d'hémagglutination

### I. La réaction anticorps –antigène :

L'immuno-analyse est basée sur la formation des complexes immuns in vitro c'est-à-dire la combinaison d'un épitope d'un antigène avec le paratope d'un anticorps dirigé contre cet antigène de façon **spécifique**.

Cette réaction est mise à profit pour la recherche et/ou le dosage d'un antigène (ou d'un anticorps) dans un milieu biologique.

La mise en évidence de la réaction Ac-Ag peut être faite d'une manière :

- Directe : Soit physique, généralement visible à l'œil nu, sous forme d'une précipitation ou d'une agglutination soit à l'aide d'un marquage de l'un des deux réactants (antigène ou anticorps) par marqueur radio-isotopique, fluorescent ou enzymatique.
- Indirecte : qui est basée sur l'étude des conséquences biologiques d'une telle réaction par ex : l'activation du complément, la cytotoxicité et opsonisation etc.

La liaison Ac-Ag est **réversible**. Elle fait intervenir des interactions de faible énergie comme :

- Les liaisons ioniques : entre deux groupements ioniques de signes opposés ;
- Les liaisons hydrogènes résultant du partage d'hydrogènes entre des atomes électronégatifs (oxygène, azote) ;
- Les forces hydrophobes qui s'exercent entre les groupes hydrophobes pour exclure les molécules d'eau ;
- Les forces de Van der Waals, forces intermoléculaires résultant de la polarisation des molécules dans un dipôle.

### II. **Les techniques d'immunoprécipitation**

#### 1. La courbe de précipitation

L'immunoprécipitation est secondaire à la formation de complexes immuns (anticorps-antigène) de grande taille qui se précipitent sous une forme visible à l'œil nu suite à l'augmentation de leur densité.

Si l'on mélange dans une série de tubes des quantités croissantes d'un antigène à une quantité constante d'immun sérum (anticorps), on constate que dans les premiers tubes (où l'antigène est en faible quantité et l'anticorps est en excès) aucun précipité se forme ; un trouble commence à apparaître dans les tubes suivants et se rassemble en flocons qui sédimentent. L'analyse du surnageant y décèle la présence d'anticorps libres (zone d'excès d'anticorps).

Pour une proportion optimale d'antigènes et d'anticorps, la quantité du précipité est maximale et on ne décèle plus ni antigènes ni anticorps libres dans le surnageant, cette zone est appelée zone d'équivalence.

Si l'on continue à ajouter de l'antigène, la quantité du précipité obtenue diminue, le précipité tend à se dissoudre, et on détecte de l'antigène libre dans le surnageant (zone d'excès

d'antigène). La courbe décrivant l'évolution de la quantité du précipité en fonction de la quantité de l'antigène ajouté est appelé courbe de précipitation.

## **2. Mécanisme de la précipitation**

La précipitation est secondaire à la formation de complexes immuns de grande taille entre un antigène multivalent (possède plusieurs épitopes) et un immun sérum (de préférence polyclonal).

Lorsque les épitopes de ces antigènes sont différents et éloignés, chaque anticorps ne se fixe que par un seul paratope et l'autre paratope reste libre. Dans la zone d'excès d'anticorps, le paratope libre ne s'engage pas dans une nouvelle interaction puisque l'antigène est en très faible quantité. Au fur et à mesure que la quantité d'antigène augmente, le paratope disponible peut se lier à l'épitope homologue d'une autre molécule d'antigène. Il se forme ainsi un édifice macromoléculaire tridimensionnel (réseau) où les molécules d'antigène sont réunies entre elles par des molécules d'anticorps d'où la formation de grands complexes et la précipitation dans la zone d'équivalence.

Mais l'interaction entre l'antigène et l'anticorps étant réversible, et les complexe antigènes-anticorps se dissolvent en zone d'excès d'antigènes où un seul anticorps est lié par une molécule d'antigène étant en excès.

Plusieurs conséquences prévisibles résultent du mécanisme de formation des précipités :

- En règle générale, les haptènes (molécule antigénique de petite taille avec un seule épitope) ne donnent pas lieu à la formation de précipités
- Il faut qu'un nombre élevé de molécules d'antigène et d'anticorps se soient associées avant qu'apparaissent les premières traces de précipités (défaut de sensibilité).
- La nature des forces stabilisant les complexes immuns rend compte de l'influence marquée du milieu de réaction (la température, le pH, les forces ioniques...) sur la cinétique et le rendement de précipitation.

## **3. Les différentes techniques d'immunoprécipitation**

Les techniques d'immunoprécipitation peuvent être :

- Qualitatives : Le résultat est exprimé en « présence » ou « Absence » de l'antigène ou l'anticorps recherché. Ces techniques qualitatives peuvent se faire en :
  - o Phase liquide :
    - test de la précipitation en anneau (ring test)
  - o En phase solide (en milieu gélifié) : L'intérêt du milieu gélifié est de permettre l'instauration de gradients réguliers de concentration décroissante à partir des réservoirs d'antigène ou d'anticorps. les complexes immuns restent immobilisés dans les mailles du gel ce qui autorise l'élimination par lavage des réactifs non précipités et permet une meilleur lecture des zones de précipitation.
    - Immunodiffusion double en gel (technique d'Ouchterlony)

- Electrosynérèse
  - Immunoélectrophorèse
  - Immunofixation
- Quantitatives Le résultat est exprimé en quantité (généralement en mg/l). ces techniques quantitatives peuvent se faire en :
- Phase liquide :
    - néphélométrie et turbidimétrie laser
  - En milieu gélifié :
    - Immunodiffusion radiale (technique du Mancini)
    - Electroimmunoquantification (technique de Laurel)

### 3.1 Techniques immunoprécipitation qualitative:

#### *Précipitation en anneau (ring test)*

C'est une technique d'immunoprécipitation qualitative en milieu liquide.

L'antisérum (l'anticorps) (ou l'antigène si on veut rechercher un anticorps) est introduit au fond d'un microtube sur une hauteur d'environ 1cm. À chaque tube est ajoutée la solution d'antigène (ou d'anticorps dans le cas inverse) en prenant soin de ne pas perturber l'interface.

Une réaction positive (présence de l'antigène recherché) se traduit par l'apparition d'un anneau de précipitation à l'interface en moins de 5 minutes. Aucun précipité ne doit apparaître dans les tubes témoins négatifs.

#### *Immunodiffusion double en gel (technique d'Ouchterlony)*

C'est une technique d'immunoprécipitation qualitative en milieu gélifié. La diffusion de l'antigène et de l'anticorps a lieu à partir de réservoirs distants de quelques mm à 2cm. A la zone d'équivalence entre les deux réservoirs, une ligne ou arc de précipitation se forme. Il y a autant de lignes de précipitation qu'il y a de systèmes antigène anticorps dans la réaction.

Il est possible de comparer les arcs de précipitation de plusieurs préparations antigéniques vis-à-vis d'un même antisérum, ou de plusieurs antisérums vis-à-vis d'un même mélange d'antigènes. on constate que :

- Les lignes issues de deux systèmes antigènes-anticorps identiques fusionnent et se raccordent pour ne plus former qu'une seule ligne continue : **réaction d'identité** antigénique.
- Les lignes issues de deux systèmes antigènes-anticorps, qui partagent une partie des épitopes reconnues, se raccordent en donnant une image « en éperon » : **réaction d'identité partielle**.
- Les lignes formées par 2 systèmes antigènes anticorps indépendants se coupent sans interférer : **réaction de non identité** antigénique.

### *Electrosynérèse*

C'est une technique d'immunoprécipitation qualitative en milieu gélifié. Les antigènes et anticorps sont déposés dans des réservoirs distants de 1cm, creusés dans une plaque de gel où ils migrent à la rencontre les uns des autres sous l'influence d'un champ électrique. Les conditions doivent être telles que les charges des anticorps et des antigènes soient de sens inverse.

Cette migration forcée accélère et renforce l'apparition des lignes de précipitation surtout quand l'antigène ou l'anticorps sont en faible quantité. Donc l'électrosynérèse est une technique plus sensible que la technique d'Ouchterlony.

### *Immunoélectrophorèse*

C'est une technique d'immunoprécipitation qualitative en milieu gélifié qui se fait en deux temps :

- un mélange d'antigènes est soumis à un champ électrique le long duquel des constituants se répartissent en fonction de leur mobilité électrophorétique selon leur poids et leur charge.
- En deuxième temps, une fente allongée, large d'environ 1mm, est découpée dans le gel parallèlement à la piste d'électrophorèse. La fente est remplie d'antisérum polyspécifique ou monospécifique qui est mis à diffuser dans le gel dans un sens perpendiculaire à celui de la piste électrophorétique.
- Après incubation (48 à 72 h), des lignes et des arcs de précipitation apparaissent dans les zones d'équivalence pour chaque système. L'identification des arcs et l'interprétation des résultats reposent sur les mêmes bases que dans la technique d'Ouchterlony

### *Immunofixation*

C'est une technique d'immunoprécipitation qualitative en milieu gélifié. C'est une technique proche de l'immunoélectrophorèse qui se fait en deux temps :

- En premier temps, un mélange antigénique est soumis, en plusieurs pistes, à une séparation électrophorétique en pH légèrement alcalin (pH=8.2)
- En deuxième temps, chaque piste électrophorétique est incubée avec un immun sérum monospécifique qui précipite les fractions correspondantes. Après lavage, seules ces dernières restent dans le gel où elles sont révélées par un colorant des protéines.

L'immunofixation est plus sensible que l'analyse immunoélectrophorétique classique, elle est réservée à la révélation des immunoglobulines monoclonales. Il suffit d'analyser les pistes des différents immuns sérums pour déduire la classe de l'immunoglobuline monoclonale.

### **3.2 Techniques d'immunoprécipitation quantitatives**

Sont des techniques adaptées au dosage de nombreuses protéines en milieu biologique, tel que des protéines plasmatiques comme les protéines de l'inflammation (haptoglobine, la protéine C réactive, ...) les facteurs du complément, les immunoglobulines.

La concentration de la protéine dosée doit dépasser le seuil de détection des techniques d'immunoprécipitation qui est dans les meilleurs des cas de 1mg/l. Les concentrations physiologiques très faibles d'IgE par exemple lui échappent.

#### *Immunodiffusion radiale (technique de Mancini)*

C'est une technique d'immunoprécipitation quantitative en milieu gélifié, où l'un des partenaires de la réaction de précipitation, habituellement l'antigène, migre concentriquement à partir d'un réservoir dans une plaque mince de gel où l'autre partenaire, habituellement l'anticorps, est déjà incorporé. L'anticorps inclus dans le gel doit être monospécifique si l'on doit doser un antigène présent dans un milieu de composition complexe.

Au fur et mesure que l'antigène diffuse à partir du réservoir, il interagit avec l'anticorps déjà présent dans le gel, et on voit se former un cercle de précipitation partant du réservoir et s'élargissant au cours du temps, jusqu'à atteindre une dimension fixe après 48 heures à plusieurs jours selon la taille de l'antigène (les petits antigènes diffusent rapidement).

La surface de ces cercles est directement proportionnelle à la concentration en antigène. Il est donc possible de déterminer la concentration d'une solution inconnue d'antigène en reportant la surface de son cercle de diffusion sur une courbe d'étalonnage.

#### *Electroimmunodiffusion (méthode de Laurell)*

C'est une technique d'immunoprécipitation quantitative en milieu gélifié, qui à la différence de la méthode de Mancini, dans laquelle l'antigène diffuse simplement à partir du puits, l'antigène migre sous l'effet d'un champ électrique dans un gel contenant l'anticorps.

La migration de l'antigène se fait selon une piste allongée dans le sens du champ électrique, les précipités prennent la forme de fuseaux (« rockets » en anglais) partant des réservoirs d'antigène et allant en se rétrécissant jusqu'à leur extrémité.

La migration forcée de l'antigène sous l'effet du champ électrique rend la technique de Laurell plus sensible que la technique Mancini (Le seuil de détection du Laurell est d'environ 1 mg/l / le Mancini est d'environ 5mg/l).

## *Immunonéphélémétrie et immunoturbidimétrie*

C'est des techniques d'immunoprécipitation quantitatives en milieu liquide. Les complexes antigènes anticorps dans cette technique restent en solution et ne précipitent pas, pour cela on travaille en zone d'excès d'anticorps si on veut doser des antigènes. La réaction se fait dans des cuves de mesure traversée par une lumière.

Deux techniques se différencient par l'angle d'observation sous lequel la lumière dispersée est mesurée, par rapport à l'axe de propagation de la lumière incidente :

- La néphélémétrie : elle s'applique à la mesure de la diffusion de la lumière sous un angle différent de l'angle 0 qui est l'angle de la lumière incidente. Le néphélémètre est l'appareil quantifiant l'intensité lumineuse dispersée.
- La turbidimétrie : détection selon l'axe de la propagation de la lumière incidente, c'est-à-dire pour un angle d'observation nul. La fraction transmise de la lumière incidente correspond à la lumière résiduelle qui n'a été ni absorbée ni dispersée par la suspension de complexes immuns.

Le seuil de sensibilité de la néphélémétrie est meilleur que celui de la turbidimétrie.

### **III. Les techniques d'immunoagglutination**

#### **1. Principe de l'agglutination**

L'agglutination immunologique est un phénomène caractérisé par la réunion en amas de particules à la suite d'une réaction d'antigène-anticorps. La suspension de particules, d'abord homogène, devient alors le siège d'agrégats visibles à l'œil nu ou au faible grossissement d'un microscope ordinaire.

Le phénomène d'agglutination nécessite des particules de taille comprise entre quelque dixième à quelques dizaines de microns (globules rouges, globules blancs, plaquettes, microorganismes, particules de latex etc.)

#### **2. Les différentes techniques d'agglutination**

Les techniques d'agglutination peuvent être actives (directes) ou passives (indirectes).

##### **a. Techniques d'agglutination « directes » ou « actives » :**

Techniques d'agglutination dites « actives » ou « directes » : elles sont

utilisables qu'en cas où l'antigène fait partie de la particule agglutinée (exemple d'antigène situé sur la surface externe d'une membrane cellulaire ou bactérienne) et est directement accessible par l'anticorps.

Exemples de techniques : le groupage sanguin ABO, le test de Coombs directe.

- Le groupage sanguin : les hématies du sujet sont mélangées avec des anticorps anti-A, anti-B et anti-AB. Selon les antigènes du groupe sanguin du sujet, les hématies agglutinent en présence de l'anticorps correspondant.
- Le test de Coombs directe : les hématies du patient sont utilisées en présence d'anticorps agglutinants anti-immunoglobulines (test à l'anti-globuline). Une agglutination positive témoigne que les hématies du patient ont déjà fixé des anticorps pathogènes (c'est le cas d'anémie hémolytiques auto-immunes par autoanticorps anti érythrocytes, ou les anémies hémolytiques du nouveau-né par anticorps maternels anti-Rhésus du nouveau-né par exemple)

### **3.1.1 Techniques d'agglutination « indirectes » ou « passives »**

Techniques d'agglutination « passives » ou « indirectes » : elles sont utilisables qu'après fixation de l'antigène sur une particule qui va servir de support pour la réaction d'agglutination. On utilise pour cela des hématies résistantes comme les globules rouges d'homme, de mouton ou de dinde. La fixation de l'antigène peut se faire spontanément ou par un procédé physicochimique.

Exemple de techniques :

- Test de Coombs indirect : le sérum du patient (dont on veut rechercher la présence d'autoanticorps anti-érythrocytes ou des anticorps anti-rhésus (anti-D) chez la mère) est traité avant avec des hématies de groupe sanguin O. les hématies sensibilisées sont ensuite mise en réaction avec des anticorps agglutinants (l'anti-globuline). Une réaction positive se traduit par l'agglutination des hématies sensibilisées.
- Test du latex et Waaler-Rose pour la recherche du facteur rhumatoïde (FR) <sup>4</sup> : tout d'abord, des IgG humaines sont fixées des particules de latex (test de latex), et des IgG de lapin sont fixées sur des hématies de mouton (test de Waaler-Rose). Ces supports sont mis à réagir avec le sérum du patient. S'il contient (le sérum du patient) le FR, les particules du latex s'agglutinent sous forme d'agrégats (test du latex), et les hématies sensibilisées s'agglutinent sous forme d'un tapis au fond des puits des microplaques en V (test de Waaler-Rose).

### **3.1.2 Techniques d'inhibition d'agglutination**

Cette méthode permet de déceler la présence d'une substance soluble dans un milieu biologique. Celle-ci entrainera la disparition de l'agglutination d'un système normalement agglutinant par captation d'une partie des anticorps agglutinant sous forme de complexes solubles



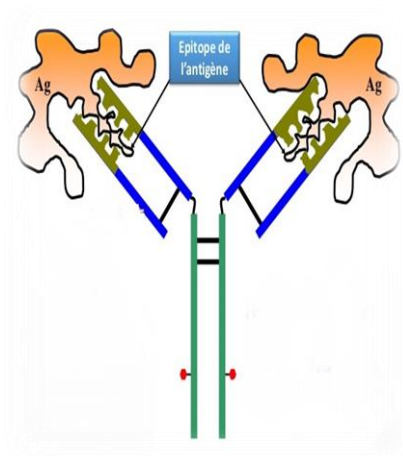


Figure 2: Fixation à l'image de la clef dans la serrure

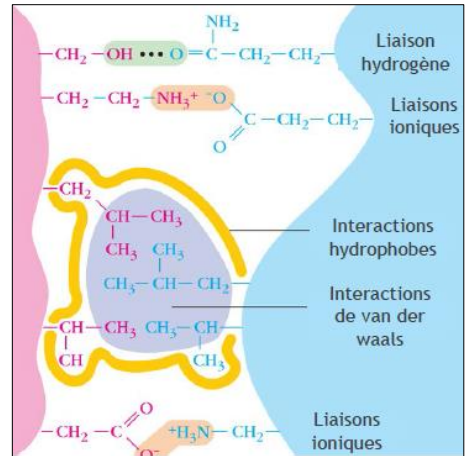


Figure 1: types de liaisons entre antigène-anticorps

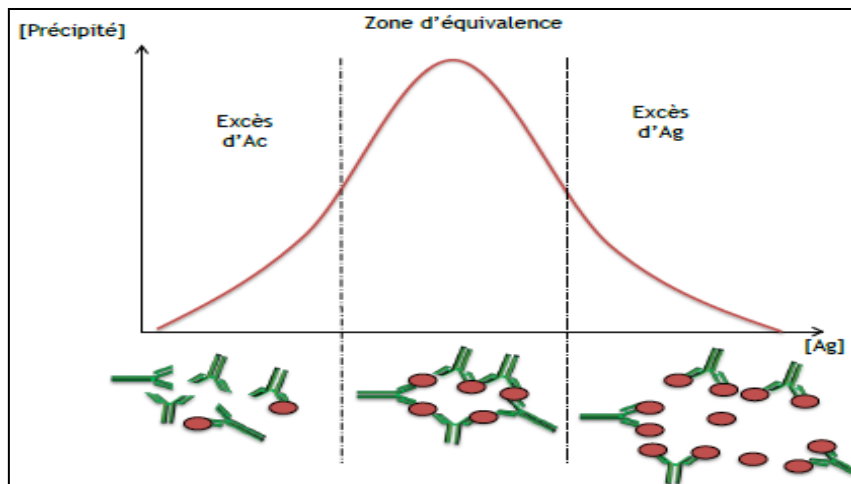


Figure 3: Courbe de précipitation

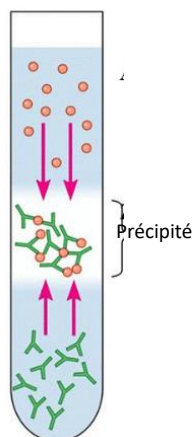
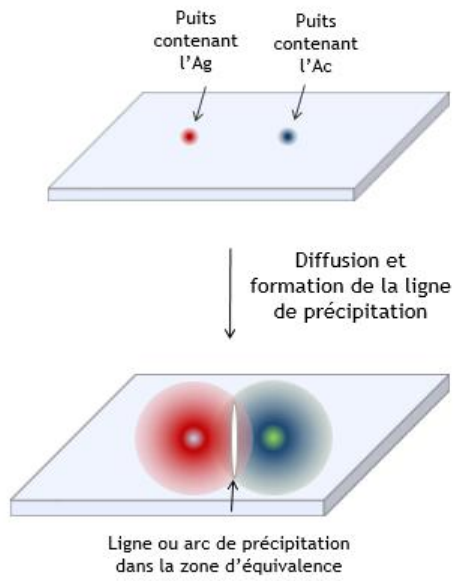


Figure 4: test de l'anneau (Ring Test)

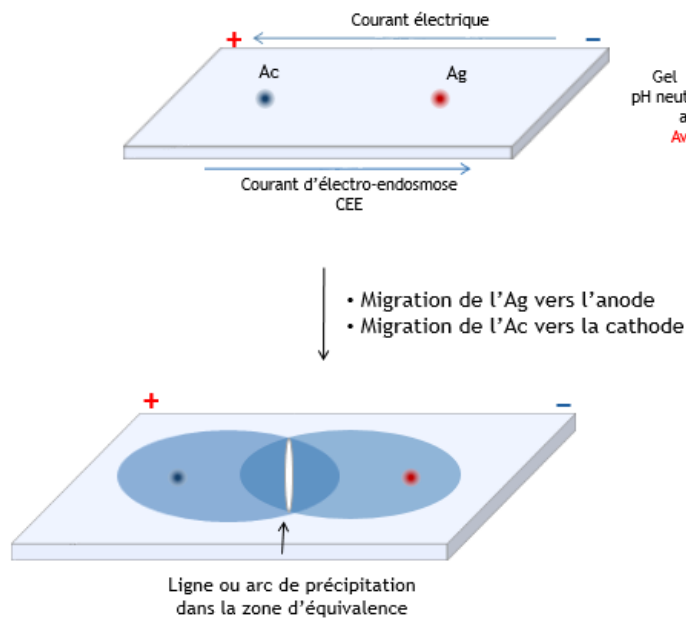
## TECHNIQUE D'IMMUNODIFFUSION DOUBLE EN GEL

### (TEST D'OUCHTERLONY)



Exemple d'application :  
recherche de la protéine de Bence Jones

### ELECTROSYNERESE

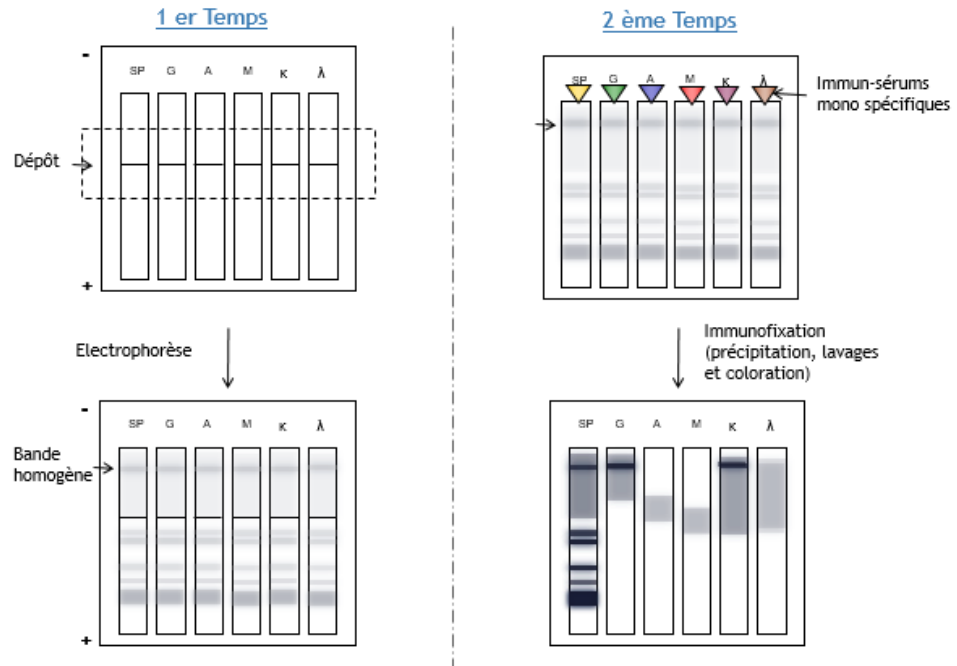


Gel avec tampon à pH neutre ou légèrement alcalin (8-9)  
Avec CEE ++++

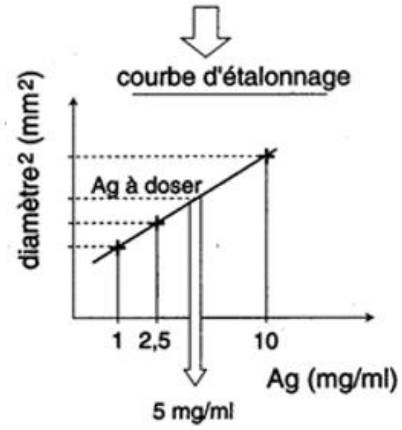
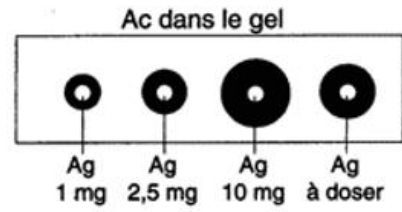
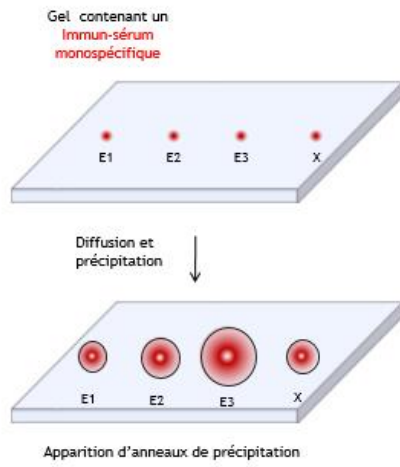
Exemple d'application :  
recherche des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires solubles



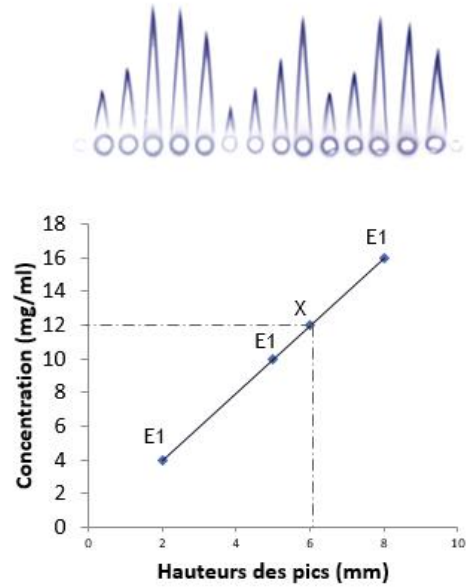
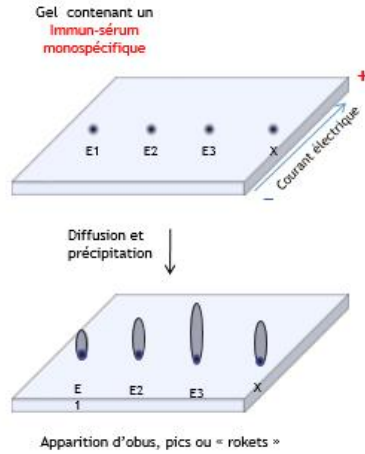
## TECHNIQUE D'IMMUNOFIXATION

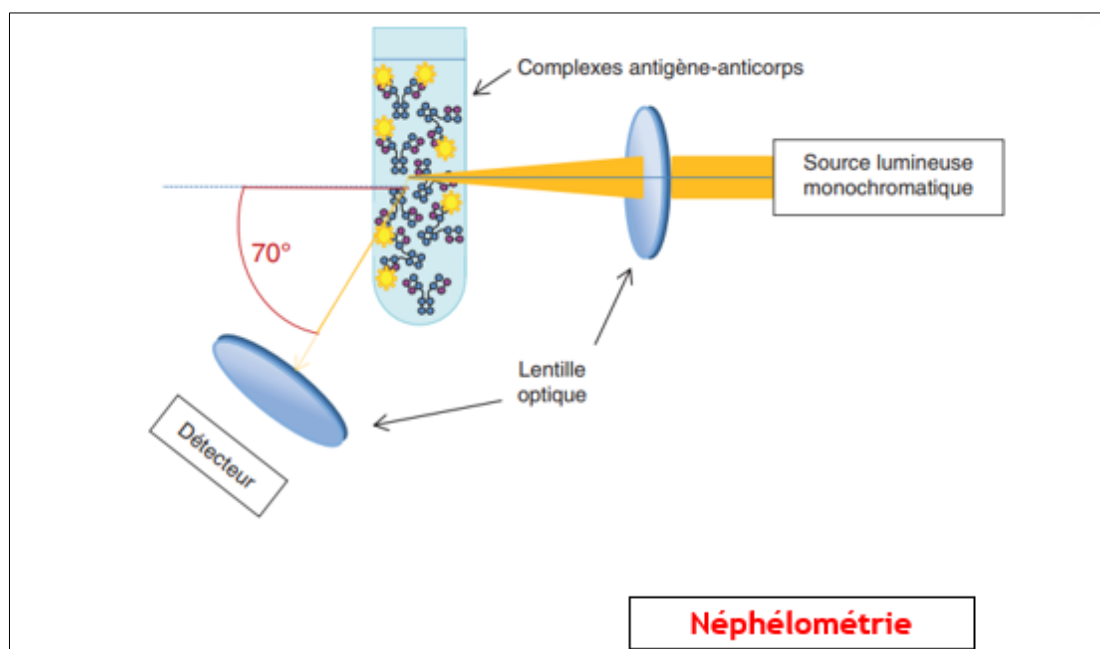
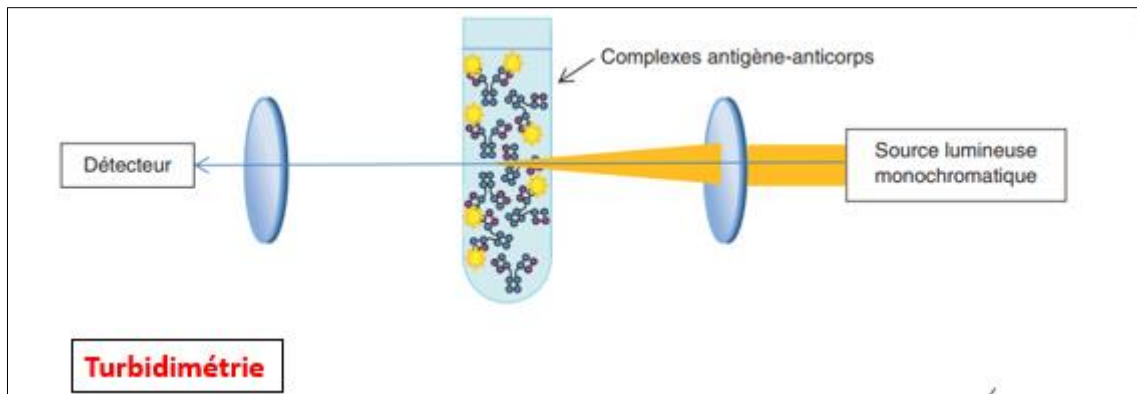


## IMMUNODIFFUSION RADIALE SIMPLE



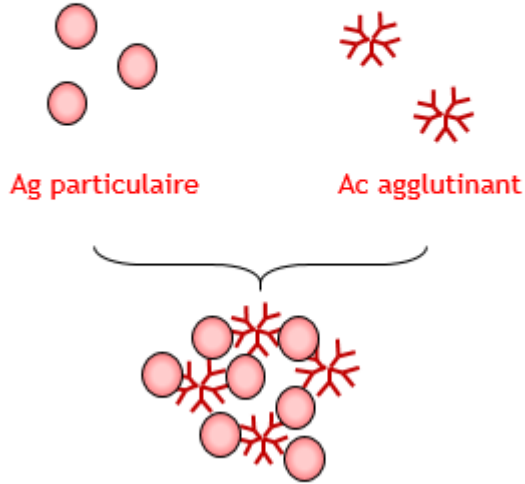
## ELECTROIMMUNOQUANTIFICATION (LAURELL)





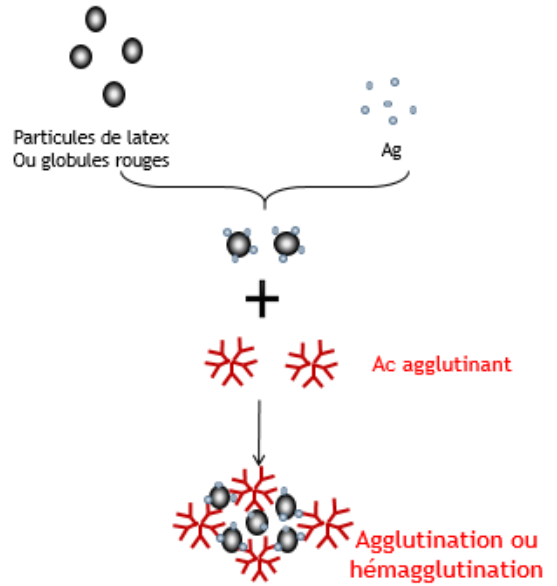
Agglutination directe active

Antigène directement particulaire ex :  
hématie, bactérie



Agglutination indirecte ou passive

Antigène est préalablement fixé sur une  
particule inerte ex : latex, hématie



	Anti-B	Anti-A	Anti-A+B
Groupe sanguin 1 A			
Groupe sanguin 2 O			
Groupe sanguin 3 B			
Groupe sanguin 4 AB			

**Test de Coombs direct / Test direct à l'antiglobuline**

**Réaction positive**

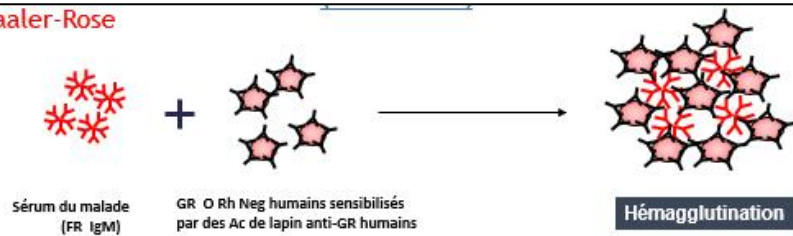
Agglutination : Ponts formés par l'antiglobuline fixée aux anticorps humains.

**Legende**  
 ● Antigène à la surface du globule rouge  
 Y Anticorps humain anti-érythrocytaire  
 Y Antiglobuline (AGH, Réactif de Coombs)

Globules rouges sensibilisés (GRS), chez un patient ayant une anémie hémolytique immunologique. Anticorps humains fixés aux antigènes des globules.

Ajout de l'antiglobuline aux GRS lavés.

**Exemple : test du Waaler-Rose**



Patient	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	Pos.	Neg.	Titer
1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	64
2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	8
3	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	512
4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	<2
5	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	32
6	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	128
7	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	32
8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	4

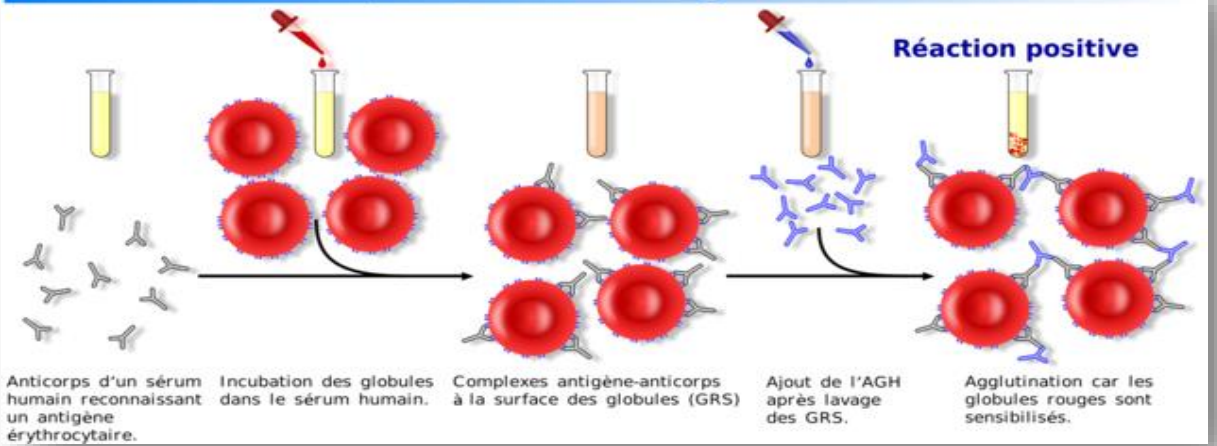


Réaction Positive    Réaction Négative

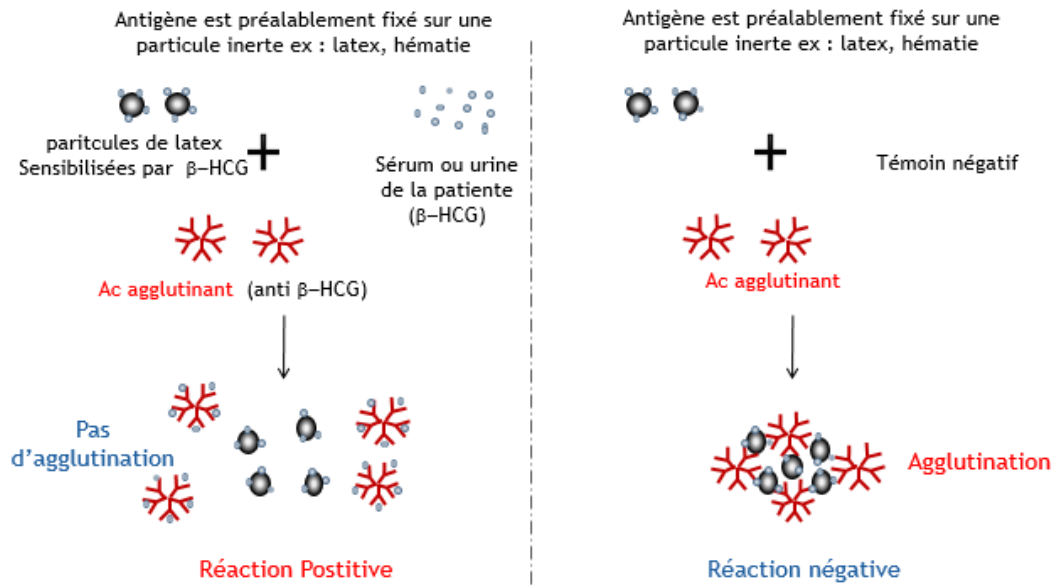
**Titre : l'inverse de la plus grande dilution donnant encore une réaction positive**



### Test de Coombs indirect / Test indirect à l'antiglobuline



### 3- Inhibition d'agglutination passive



Exemple d'application : test de grossesse.