

Université Ahmed Zabana de Relizane-
Faculté des sciences et de la technologie
Département des sciences agronomiques

L2- Sciences alimentaires



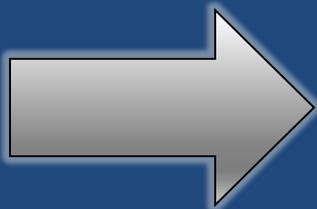
TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES: La précipitation

Dr. D. YSSAAD

2021/2022

TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

- ❑ Les techniques immunologiques reposent sur une **réaction antigène-anticorps**.
- ❑ Ces techniques sont utilisées pour mettre en évidence, **des antigènes ou des anticorps**.



on doit disposer d'anticorps spécifiques correspondant à la spécificité antigénique recherchée

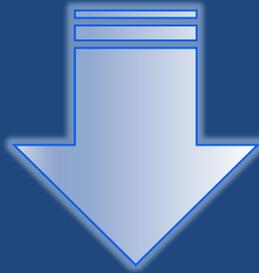
Principe de la réaction Ag-Ac- Rappel

La réaction Ag-Ac est une réaction **exothermique, réversible et spécifique.**

Principe de la réaction Ag-Ac- Rappel

- **Exothermique** : la réaction est caractérisée par la formation d'une liaison libérant de l'énergie, ce qui a pour conséquence une influence de la température sur le bon déroulement de la réaction.
- **Réversible** : la liaison qui s'effectue entre l'Ac et l'Ag sont des liaisons faibles (hydrogène, hydrophobe ...), elle peut donc être rompue assez facilement (variation du pH, température, force ionique).
- **Spécifique** : le site d'une immunoglobuline (**paratope**) peut se combiner avec un **épitope** et un seul.

La réaction Ag-Ac aboutit à la formation d'un complexe appelé **immuncomplexe**.

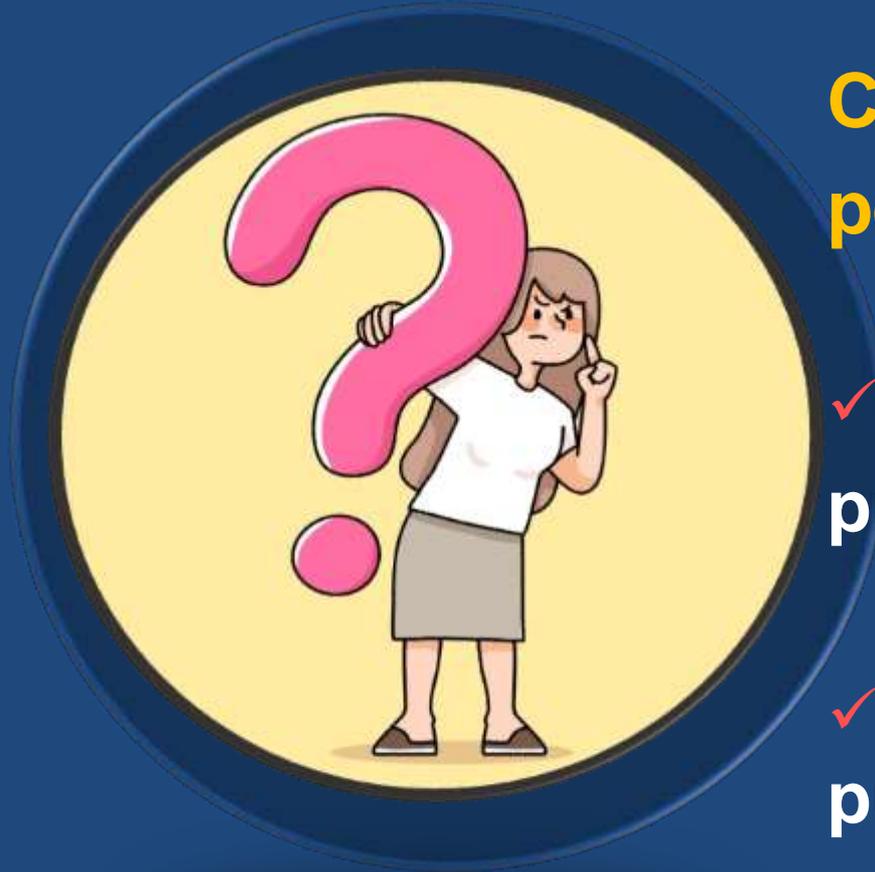


L'immuncomplexe est le produit qui sera mis en évidence dans toutes les techniques immunologiques.



La réaction Ag-Ac a deux grands types d'applications :

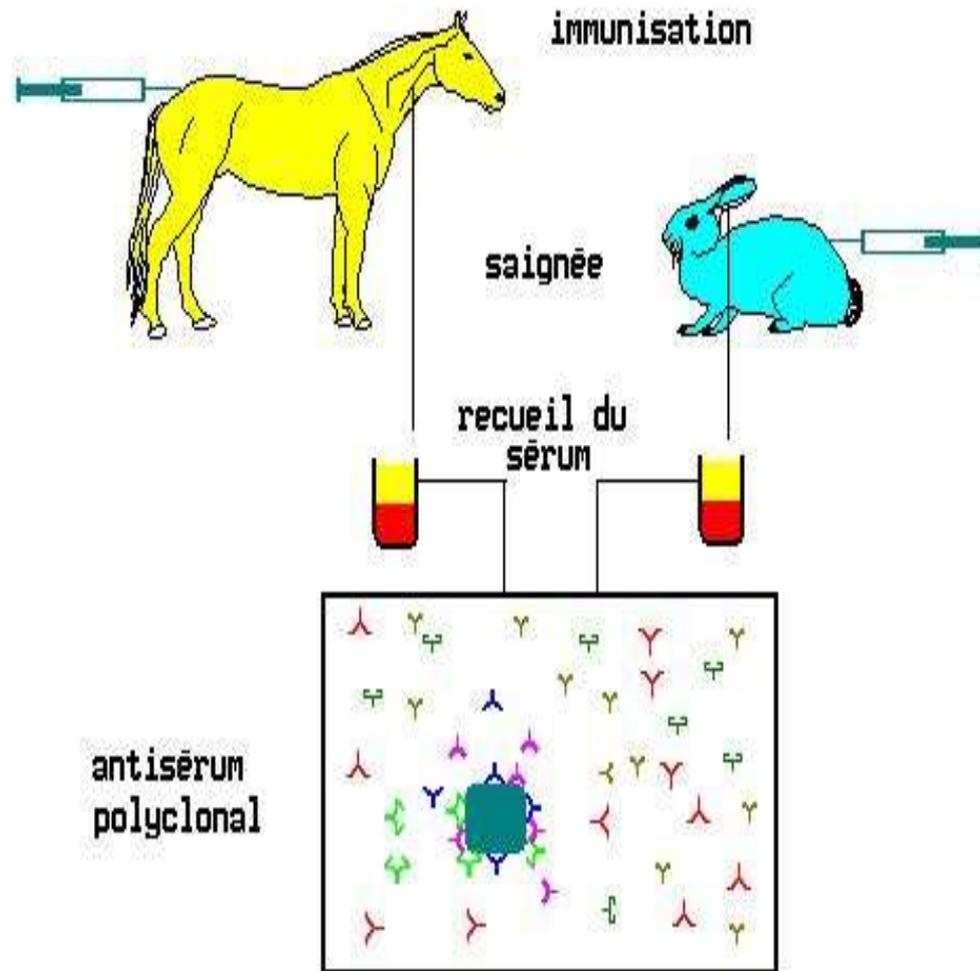
- ⊙ **La détection et le dosage des antigènes** (par des méthodes dont il faut vérifier la spécificité, la reproductibilité et la sensibilité).
- ⊙ **La détection et le titrage des anticorps** (vis-à-vis d'un Ag ou d'un mélange d'Ag).



**Ces anticorps
peuvent être :**

- ✓ des sérums polyclonaux préparés chez l'animal
- ✓ des immunoglobulines purifiées
- ✓ des anticorps monoclonaux.

**Sérums
polyclonaux
préparés
chez l'animal**





Le but de l'immunisation est l'obtention d'un immunsérum (antisérum) riche en anticorps spécifiques de l'antigène et de forte affinité



- **Voies d'administration**

C'est plus immunogène par **voie parentérale** (c'est toutes les voies sauf orale)

- Voie d'administration : Intra musculaire et Sous cutanée, Intra veineuse.

- Les antigènes cellulaires sont injectés par voie veineuse ou dans certains cas par **voie intrapéritonéale.**

Voie d'immunisation intrapéritonéale chez la souris Balb/c



Exp: Souris immunisée à la β -lactoglobuline + Adjuvant



Obtention d'immunsérum

❑ Les tests immunologiques ayant été utilisés historiquement pour détecter la présence d'anticorps dans le sérum de patients, on les appelle communément **tests sérologiques**.

❑ La quantité d'anticorps présente dans le sérum est déterminée par **titrage** de celui-ci en dilution limite. Le **titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution positive**.

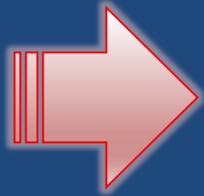
La technique d'immunoprécipitation

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

L'immunoprécipitation



Technique sans marquage



La formation de complexes immuns de grande taille entre **un antigène multivalent (possède plusieurs épitopes)** et un immun sérum (de préférence polyclonal):

- ✓ Un Ag moléculaire multivalent peut être précipité par des Ac multivalents spécifiques : formation d'un complexe immun qui évolue dans le temps pour formé un réseau : **Le précipité**
- ✓ Plus on a de sites de liaisons sur les Ac, + ils seront précipités.

Les techniques d'immunoprécipitation peuvent être:

- **Qualitatives** : Le résultat est exprimé en « **présence +** » ou « **Absence -** » de l'antigène ou l'anticorps recherché.
- **Quantitatives** : Le résultat est exprimé en quantité (généralement en **mg/l**).

Réaction de précipitation

1- Immunoprécipitation en milieu liquide

- Test de l'anneau (ring test)
- Techniques de Heidelberg et Kendall
- Expérience d'immuno-néphelométrie

2- Immunoprécipitation en milieu gélifié

- Immunodiffusion simple
- Immunodiffusion double
- Immunodiffusion radiale
- Immuno-électrophorèse

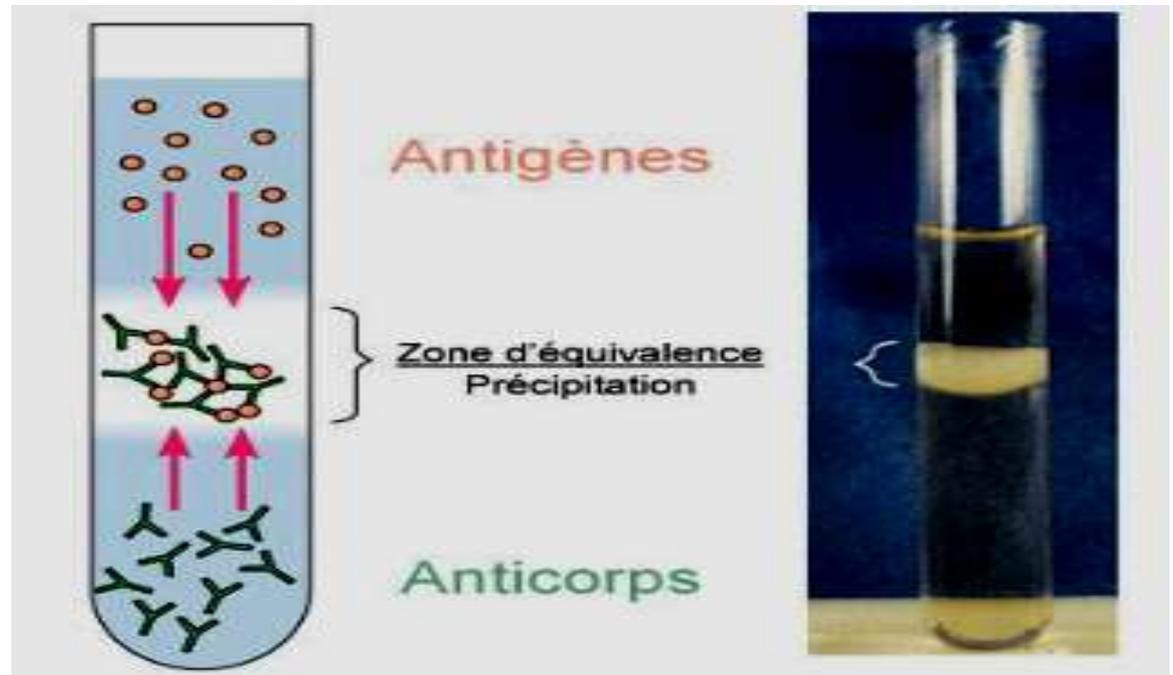


1. Immunoprécipitation en milieu liquide

A) Test de l'anneau (ring test)

On introduit dans un tube des Ag et des Ac et on laisse reposer. Ils vont lentement diffuser dans le milieu, créant des gradients de concentration. Lorsqu'ils sont à l'équivalence, c'est-à-dire qu'il y a autant de paratope que d'épitopes, ils forment des complexes et précipitent (**un anneau de précipitation**)

Rq: Plus il y a d'antigène, plus l'anneau est bas.

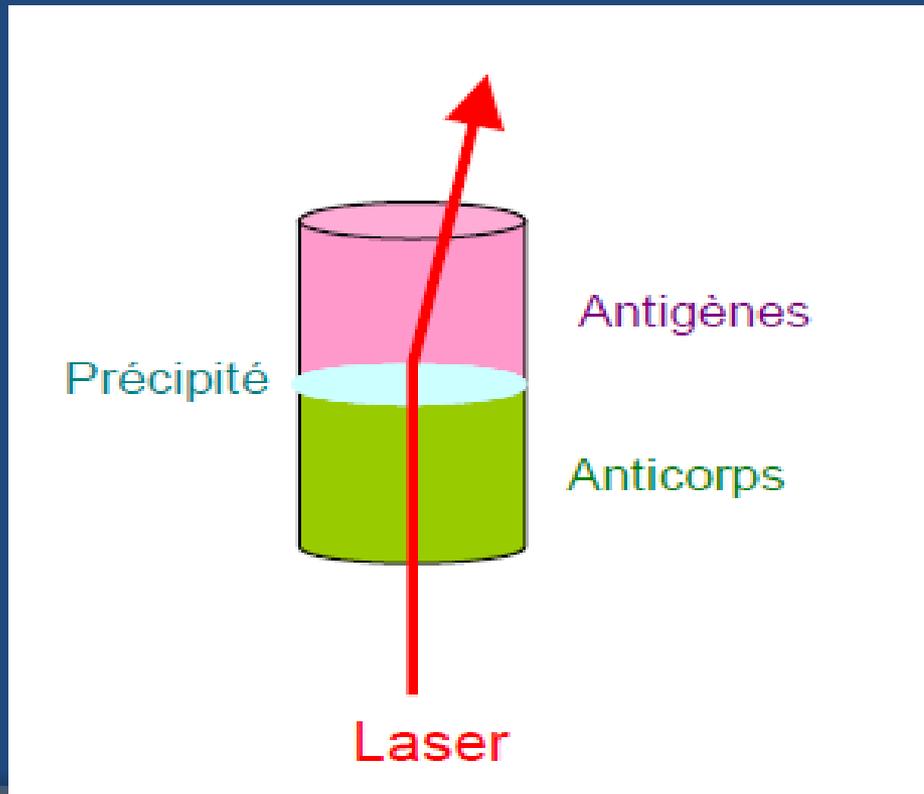


Test de l'anneau (ring test)



B) Expérience d'immuno-néphelométrie

La déviation de la lumière dans un précipité dépend de sa concentration. On peut alors doser les antigènes ou les anticorps.



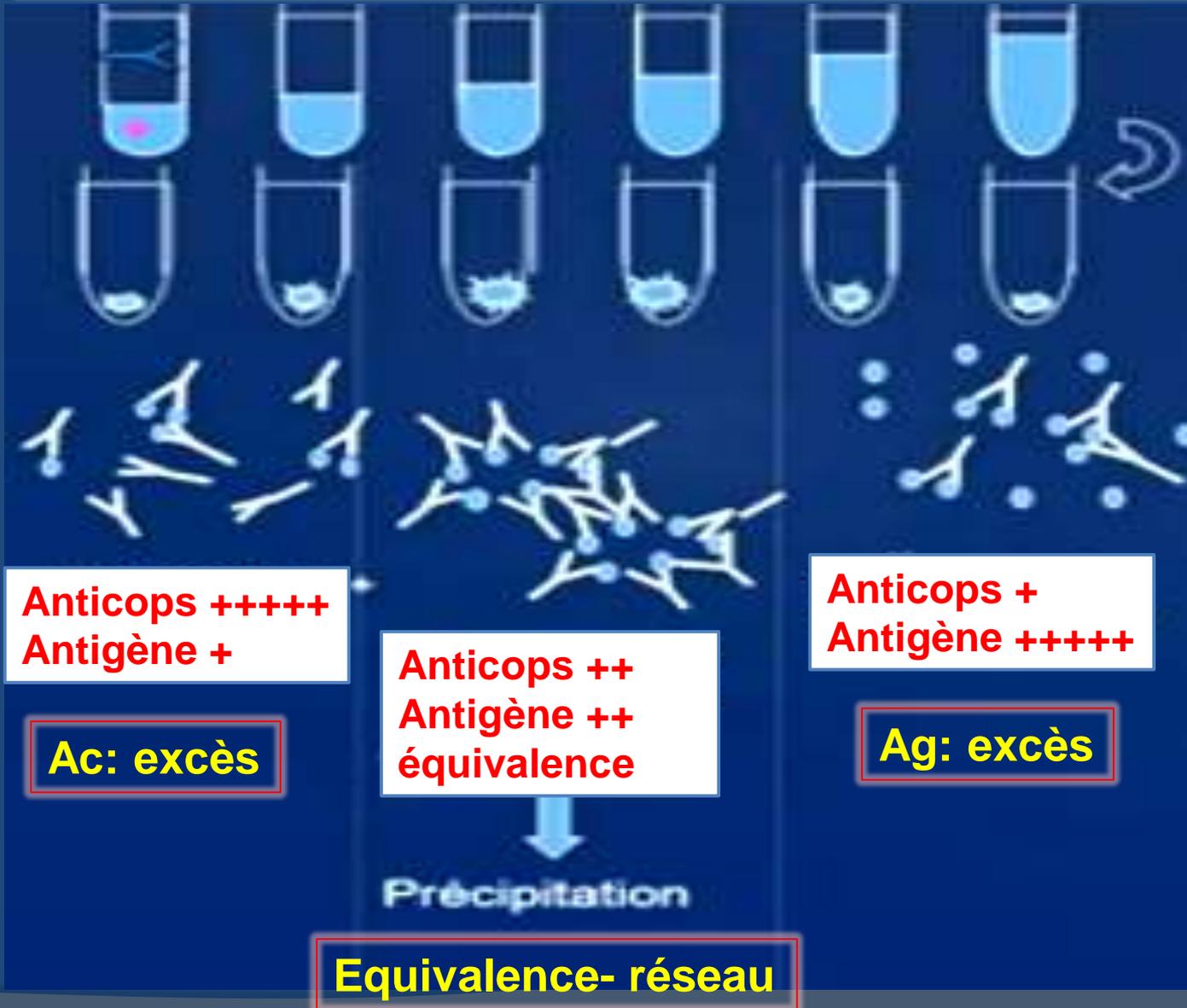
Mesure au Spectrophotomètre de l'absorbance de la lumière par le précipité



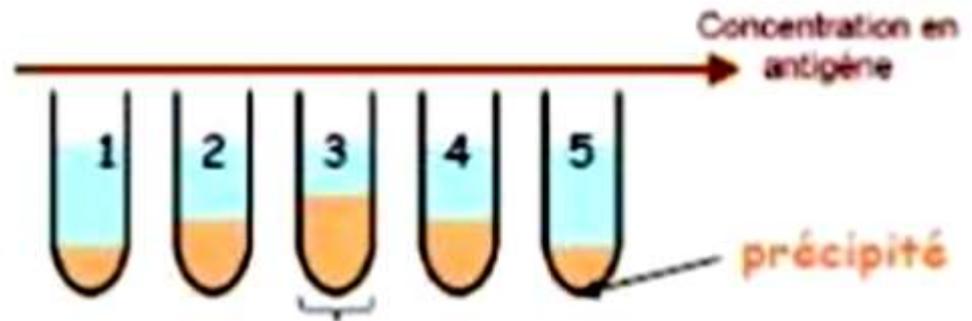
C) Techniques de Heidelberg et Kendall

On verse dans plusieurs tubes une quantité constante d'anticorps, et une quantité croissante (↗) d'antigènes. On centrifuge les tubes, et on compare la quantité de précipité en fonction de la concentration.

Méthode de quantification : $[Ac] = \frac{[Ag]}{n}$, $[Ag] + en + \nearrow$

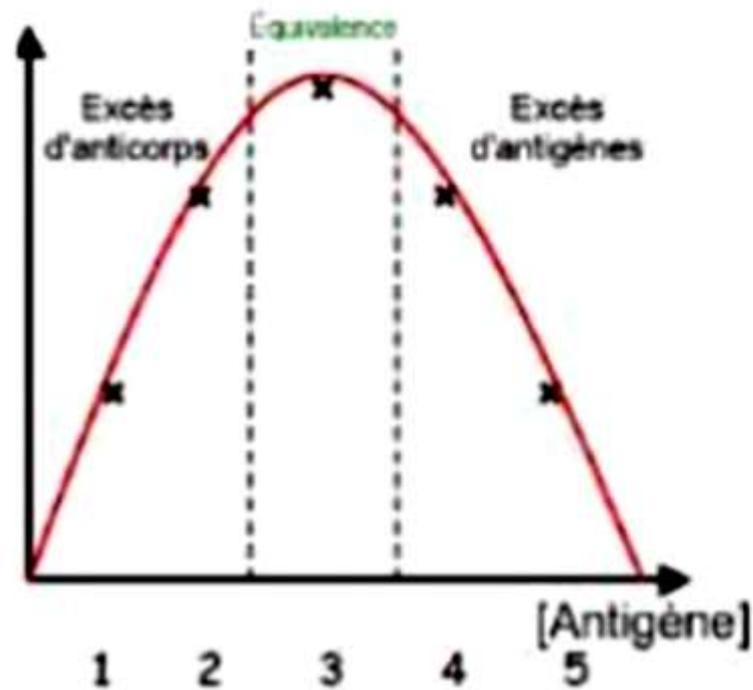


Quantité constante d'Ac
Quantité croissante d'Ag

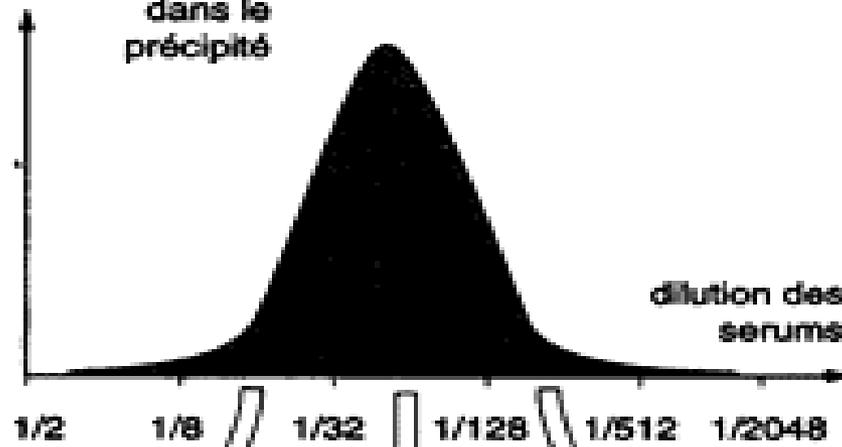


Quantité de précipité
(Do 280nm)

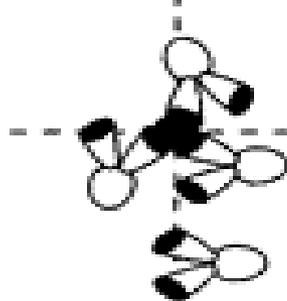
A chaque tube correspond une concentration d'Ag



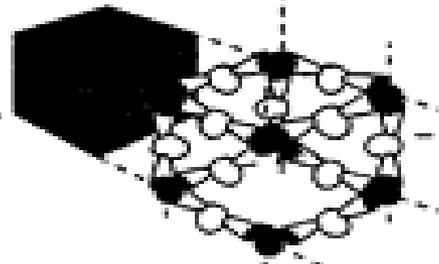
quantité de protéine
dans le précipité



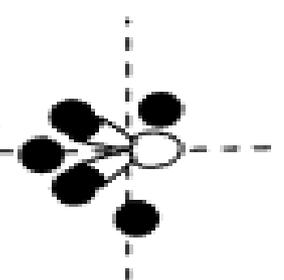
excès d'Ac



équivalence



excès d'Ag



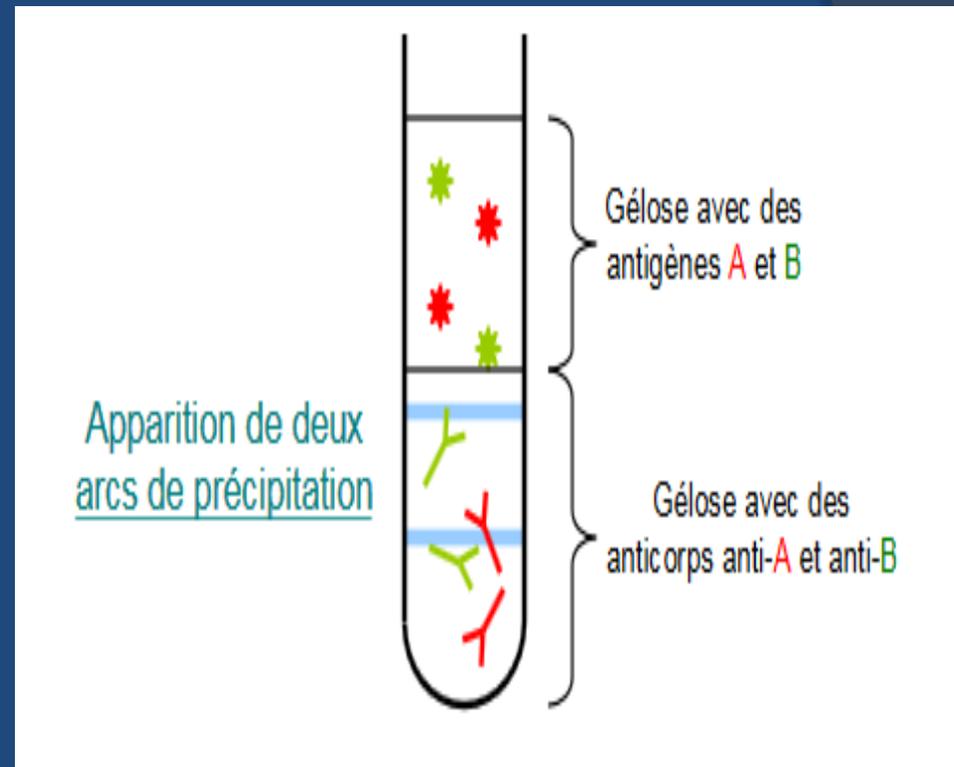
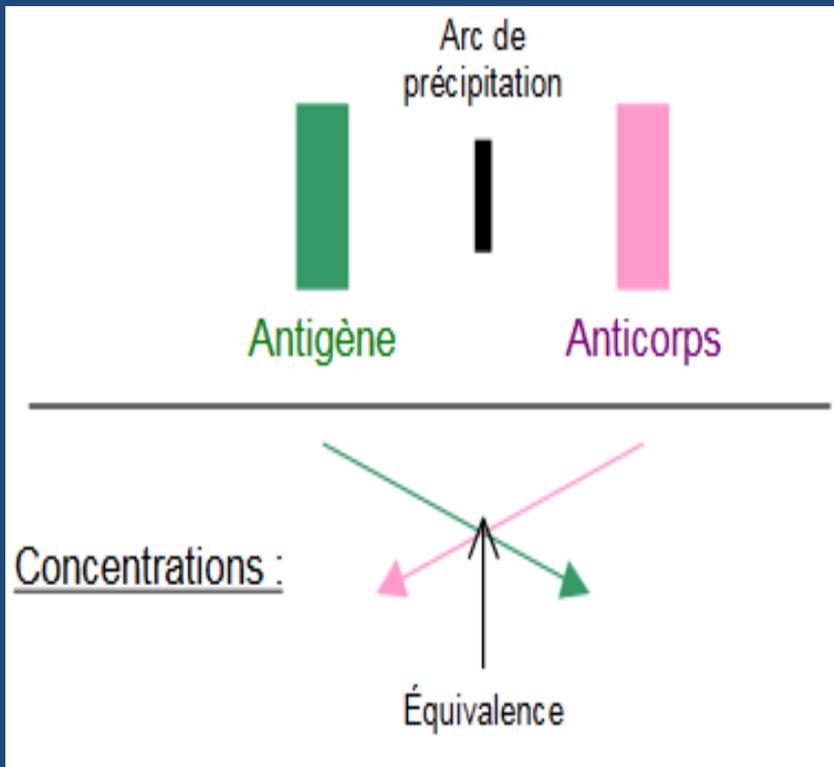
2. Immunoprécipitation en milieu gélifié

A) Immunodiffusion

Simple	radial simple	double diffusion
technique Oudin	technique Mancini	technique d'Ouchterlony
un seul des deux éléments diffuse; la précipitation a lieu à l'endroit où les concentrations en Ag et Ac correspondent à la zone d'équivalence.	Consiste à introduit des Ac spécifique dans le gélose, et de remplit des puits avec un antigène de concentrations différentes, Après la diffusion On observe des cercle de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la concentration d'antigène	C'est une méthode qualitative et semi quantitative Les 2 éléments Ac et Ag diffusent selon leur taille

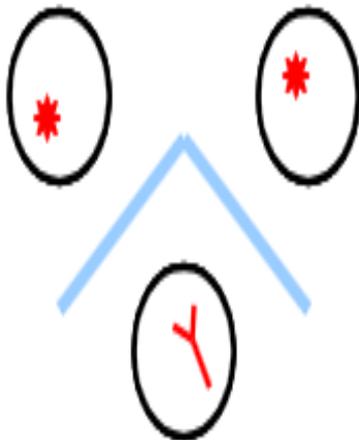
Immunodiffusion simple

On met en contact dans un tube deux géloses contenant chacune des antigènes et des anticorps. Les molécules vont diffuser et former un arc de précipitation à l'équivalence.

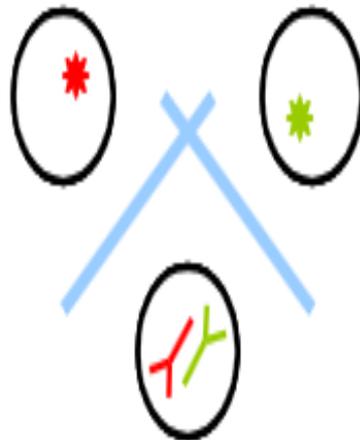


Immunodiffusion double

On fait des puits dans la gélose que l'on remplit de différents antigènes et anticorps. On observe alors des arcs de précipitation qui sont différents en fonction des antigènes et des anticorps présents.



Ce sont les mêmes antigènes, les arcs se complètent.



Les antigènes ne sont pas les mêmes, les arcs ne se complètent pas.



Un des antigènes est partagé car un arc se complète avec l'autre.

Immunodiffusion double

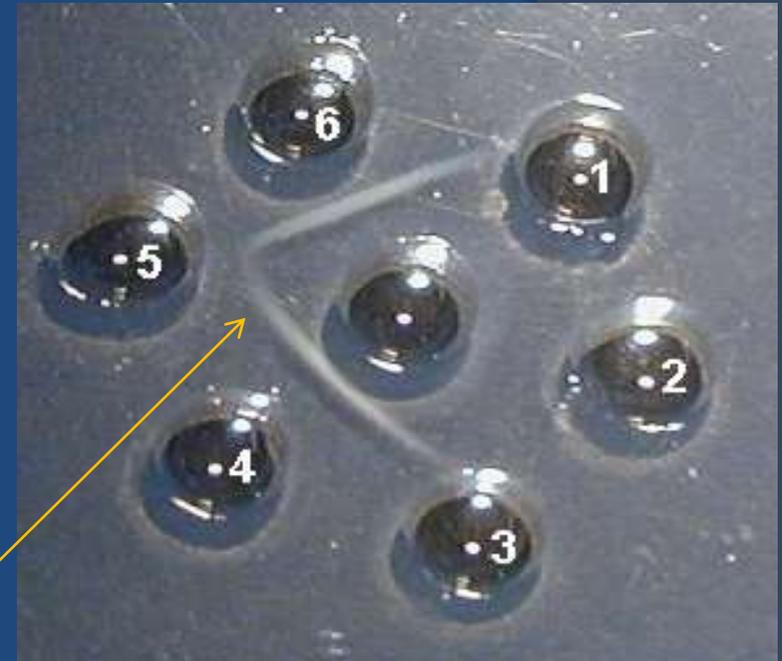


Matériel



Préparation des puits





**Arc de
précipitation
(Puits 6 et 4)**

Numérotation des puits

EXP:

Puits central :

sérum de lapin hyperimmunisé contre la sérum albumine bovine (BSA)

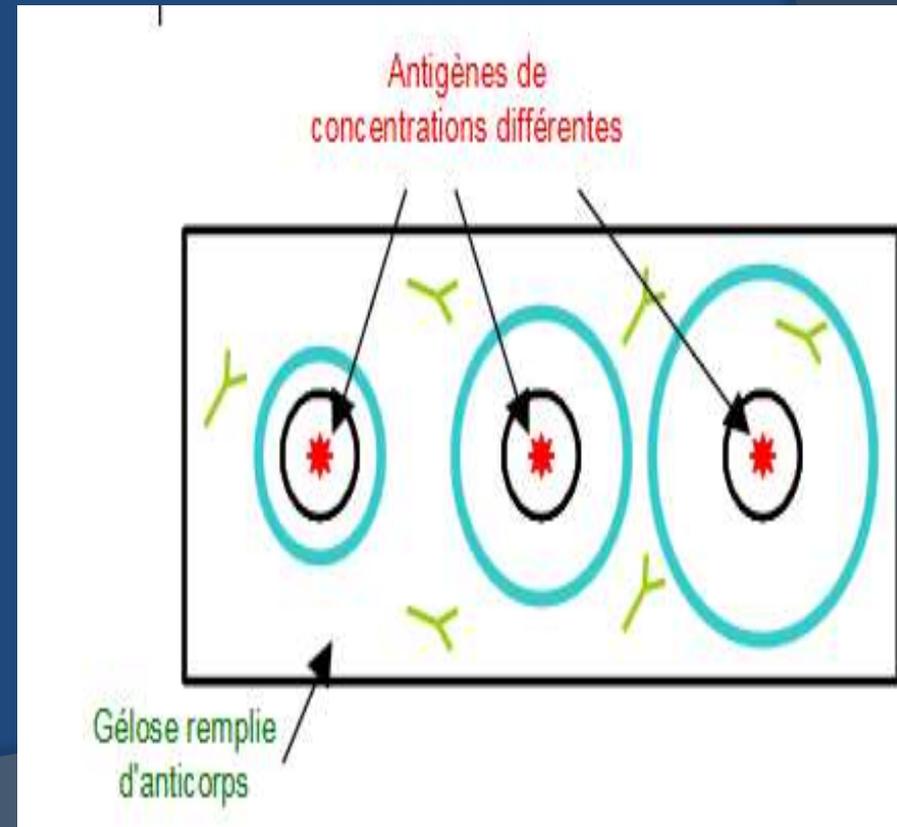
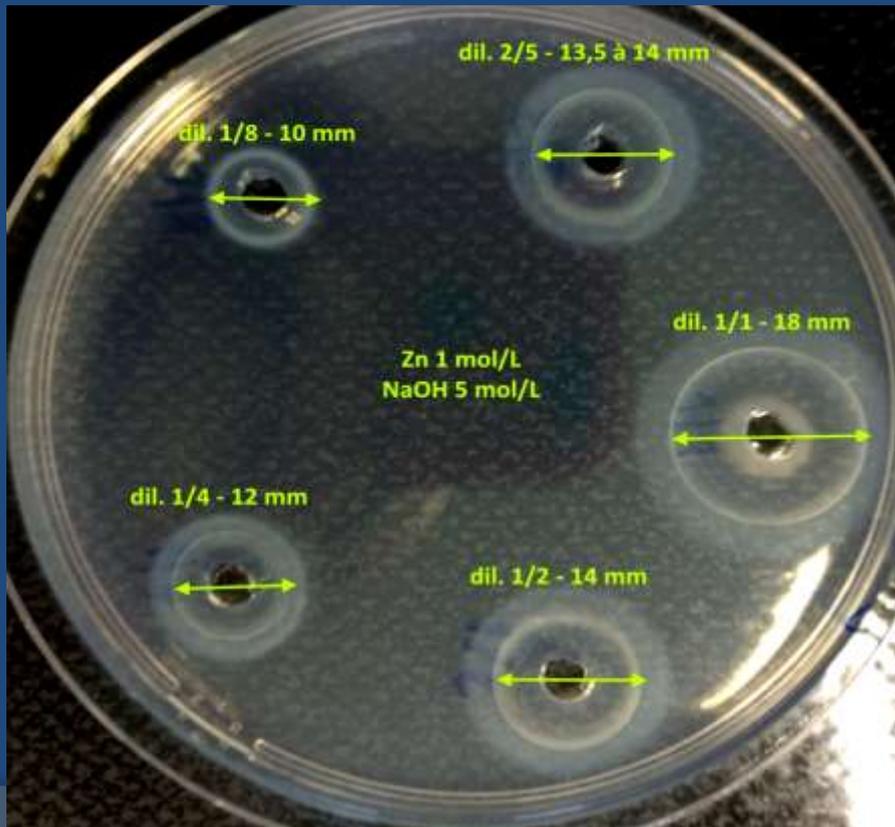
Puits périphériques :

1 : sérum de chèvre ; 2 : sérum de porc ; 3 : sérum de lapin ; 4 : sérum de bœuf ;
5 : sérum de cheval ; 6 : BSA

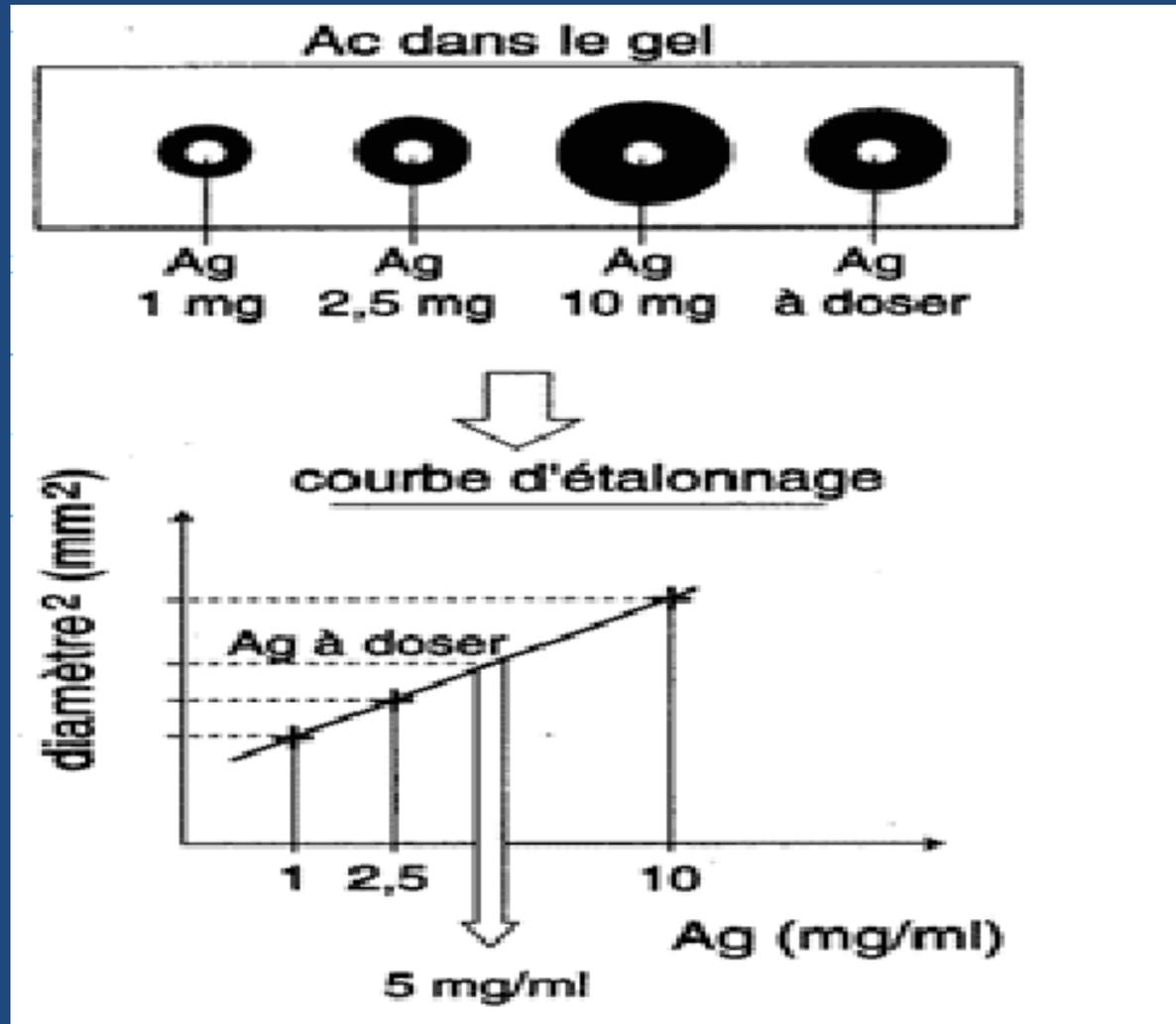
Immunodiffusion radiale

On remplit des puits avec un antigène de concentrations différentes, dans une gélose remplie d'anticorps contre cet antigène.

On observe des cercle de précipitation dont le diamètre est proportionnel à la concentration d'antigène. On peut alors doser l'antigène.



Immunodiffusion radiale



B) Immuno-électrophorèse

Cette technique permet d'analyser des mélanges complexes d'antigène. On effectue une électrophorèse de ce mélange afin de séparer les antigènes (migration dans un champ électrique) et la précipitation des protéines à l'aide d'immun sérums.

Premier temps: Electrophorese



Deuxieme temps: Immunodiffusion



Immuno-électrophorèse

