

## Réactions de précipitation

### 1° Caractéristiques :

Elles mettent en jeu un antigène soluble. Un précipité correspond à la formation d'un édifice multimoléculaire résultant de l'union spécifique entre de nombreux antigènes et de nombreux anticorps. L'antigène soluble mis en jeu est généralement une protéine ou un polysaccharide.

Elles sont :

- Très spécifiques.
- Assez peu sensibles.
- Soumises au phénomène de zone.
- Ne se développent pas avec certains anticorps dits non précipitant.

On peut les obtenir :

- Soit en milieu liquide.
- Soit en milieu solide.

### 2° Conditions pour qu'il y ait une précipitation :

Dans une série de tubes, une concentration constante de l'anticorps est mise en présence avec une concentration croissante de l'antigène spécifique. Au bout d'un certain temps d'incubation de ce mélange Ag-Ac, on observe la formation d'un précipité que l'on peut doser par néphélométrie ou par un dosage de l'azote protéique.

La courbe de la quantité de précipité en fonction des concentrations en antigène peut avoir deux allures :

- Courbe type Lapin.
- Courbe dites Cheval.

La prézone est due, en présence d'un fort excès d'anticorps, à l'apparition de complexes Ag-Ac très solubles du fait d'une hydrophilie très importante des anticorps de cheval.

Avant une manipulation de précipitation, il faut faire une recherche de concentration optimales afin d'avoir la meilleure image possible.

### 3° Diverses techniques de précipitations :

#### 3.1. Précipitation en milieu liquide :

##### 3.1.1. Le ring test :

C'est une réaction qualitative réalisée en microtubes. La solution d'anticorps est introduite au fond du tube et la solution antigénique est ajoutée au-dessus en prenant soin de la faire s'écouler lentement le long des parois du tube afin d'éviter la formation de bulles et le mélange sérum-solution antigénique à l'interface. Après remplissage, le tube est maintenu vertical en évitant toute perturbation. Si l'antigène et l'anticorps sont spécifiques, là où ils se rencontrent, c'est-à-dire à l'interface, un réseau visible apparaît en moins de cinq minutes sous forme d'un précipité fin et net formant un anneau. Aucun précipité ne doit apparaître dans le tube témoin antigène.

### **3.1.2. L'immunonéphélométrie et turbidimétrie :**

Ce sont des réactions permettant une quantification. Le sérum et la solution antigénique sont introduits dans un tube. Lors de l'incubation, si antigène et anticorps sont spécifiques, un réseau visible apparaît sous forme d'un précipité. Autrefois la quantification des précipités se faisait en dosant :

- Leur teneur en azote protéinique par Kjeldahl après minéralisation.
- Leur teneur en protéines par Biuret.

Ces méthodes sont longues, délicates, mal adaptées aux dosages en série. Actuellement sont utilisées la néphélométrie et la turbidimétrie.

Le néphélomètre permet de mesurer la diffusion de la lumière par le précipité. Le résultat obtenu est apporté à une gamme d'étalonnage. Cette méthode est bien adaptée à l'immunologie : elle permet de détecter des protéines à des concentrations de l'ordre du µg/ml.

La turbidimétrie permet de comparer l'intensité lumineuse transmise par le précipité en suspension dans le milieu liquide à celle du faisceau incident. Une telle situation se prête moins bien à la mesure en cas de valeur faible car, alors, intensité lumineuse résiduelle et intensité lumineuse incidente sont très proches. Il s'agit donc d'une méthode moins sensible que la néphélométrie.

### **3.2. Précipitation en milieu gélifié :**

Certaines de ces réactions occupent une place de choix dans les domaines les plus divers de la recherche ainsi que dans les laboratoires de biologie clinique.

#### **3.2.1. Les gels utilisés :**

Ce sont des gels d'Agar pur.

L'Agar pur est un extrait d'algues marines, purifié, c'est-à-dire débarrassé de ses ions minéraux par des lavages successifs.

L'Agar pur est un mélange de deux polyosides :

- L'agaropactine possédant de nombreux groupements polaires.
- L'agarose dépourvu de groupements polaires, ce qui réduit les interactions avec les protéines et limite les courants d'électro-endosmose.

Ces deux polyosides sont :

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

Le gel d'agarose est surtout utilisé pour l'immunoélectrophorèse.

### **3.2.2. Principe :**

#### **3.2.2.1. La diffusion :**

Lorsqu'un antigène ou un anticorps se trouvent dans un gel, ils vont diffuser dans l'eau d'imbibition du gel. Il se réalise, à partir de la source de diffusion, un gradient de concentration décroissante à partir du point d'introduction.

Cette diffusion dans le milieu gélifié réalise donc une dilution continue du réactif.

#### **3.2.2.2. La réaction antigène-anticorps :**

Lorsqu'à l'intérieur du gel, antigène et anticorps spécifiques se trouvent dans un rapport optimal de concentrations, l'union Ag-Ac aboutit à la formation d'un édifice de grande taille ne pouvant plus diffuser dans le gel. Il se forme alors une ligne de précipitation parfaitement visible avec ou sans coloration.

### **3.2.3. Les deux techniques de précipitation en milieu gélifié :**

#### **3.2.3.1. Technique de diffusion simple :**

Le gradient de concentration est établi pour un réactif seulement. Un des deux produits est mélangé au gel maintenu en surfusion à 50°C à concentration relativement basse. Il est donc régulièrement réparti dans la masse de gel.

Après refroidissement et gélification, l'autre produit est déposé dans un puits creusé dans le gel, à une concentration nettement plus forte que celle des anticorps.

Cette technique est souvent réalisée en boîte. Un anneau de précipité apparaît donc dans le gel à l'endroit où la concentration en antigène a une valeur correspondant à celle de la zone d'équivalence.

#### **3.2.3.2. Technique de diffusion double :**

Le gradient de concentration est établi pour les deux réactifs.

Antigène et anticorps sont introduits chacun dans un puits creusé à l'intérieur d'un gel.

Cette technique peut être réalisée sur lame ou en boîte et un arc de précipité est visible à l'intérieur du gel entre les deux puits dans la zone où concentrations en antigène et anticorps ont des valeurs correspondant à celles de la zone d'équivalence.