

Techniques d'immunoagglutinations

Applications à la recherche et caractérisation de molécules, de cellules ou de virus

I. Introduction

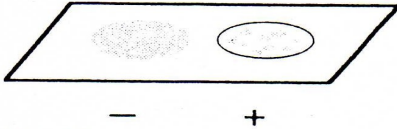
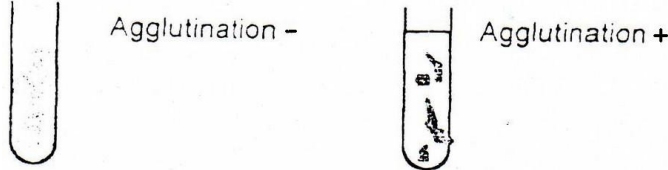

1. Principe

La réaction antigène-anticorps lorsqu'elle met en œuvre un antigène insoluble (comme des cellules bactériennes, comme des hématies portant naturellement des antigènes, comme des hématies ou des billes de latex sur lesquelles on a fixé artificiellement un antigène) peut conduire à la formation d'un agglutinât. On parle d'agglutination active ou passive, directe ou indirecte (voir cours correspondant).

Ces réactions d'agglutinations peuvent être lues à l'œil nu. On les pratique :


- sur lame (voir TP groupages sanguins sur lame, sérotypage des Salmonella ou autres microorganismes ...)
- en tube (voir TP groupages sanguins, sérodiagnostic de la Brucellose...)
- en microplaques (voir TP groupages sanguins, sérodiagnostic de la Syphilis...).

2. Lecture des agglutinations


| Agglutination sur lame | |
|--|--|
| Après mélange, agiter doucement la lame par un mouvement de va-et-vient. Une agglutination s'observe par la présence d'amas : | |
|  | |
| Agglutination en tube | Agglutination en microplaque à fonds en V |
| <p>Laisser la réaction se développer puis centrifuger puis secouer légèrement les tubes et observer</p> <ul style="list-style-type: none"> - si les particules peuvent être aisément remises en suspension, absence d'agglutination, - si le culot se décolle difficilement en 1 ou plusieurs blocs (ou ne se décolle pas) par agitation douce, présence d'une agglutination <p>On peut qualifier l'intensité d'agglutination. Par exemple +++ si le culot se fragmente en moins de 3 fragments lors du décollement, ++ si les fragments sont nombreux, + si les amas sont de très petite taille, (+) si les amas sont innombrables à la limite de visibilité mais le «fond» entre les agglutinats reste bien clair.</p> | <p>Laisser la réaction se développer puis observer (la centrifugation améliore la lecture)</p> <ul style="list-style-type: none"> - une agglutination + donne un tapis continu (ou voile ou crêpe) de particules agglutinées à la base de la cupule, - une agglutination négative donne un bouton de sédimentation centré en fond de cupule. |
|  <p>(lectures après agitation douce)</p> |  |
| | Agglutination en microplaque à fonds en U |
| | <p>Les agglutinations avec microplaque à fonds en U conduisent à un aspect visuel pas évident à lire. Néanmoins pour des réactions mettant en œuvre des hématies un petit artifice permet des lectures aisées: en inclinant la plaque à 80° (donc en la mettant en position</p> |

quasi verticale), on constatera que les cellules non agglutinées «roulent en larme» à l'inclinaison alors que les cellules agglutinées sont «fixées» en place par les anticorps. Évidemment, laisser la réaction se développer avant d'observer.
 Si on tient à une observation purement visuelle et a plat (pas évident), voici l'aspect :


- laisser la réaction se développer et observer ;
- une agglutination négative donne un anneau en circonférence de la cupule ;
- l'agglutination positive donne un voile centré.
- Le voile d'agglutinat est parfois entouré d'un anneau de particules (hématies) non agglutinées si la réaction d'agglutination n'est pas totale, on peut ainsi qualifier l'intensité d'agglutination en +++,++,+



Agglutination -



Agglutination +++



Agglutination +. Souvent pas aisé à différencier à l'oeil d'une agglutination négative.

L'objectif de la séance est de s'initier à l'observation d'une agglutination sur lame, en tube et sur plaque.

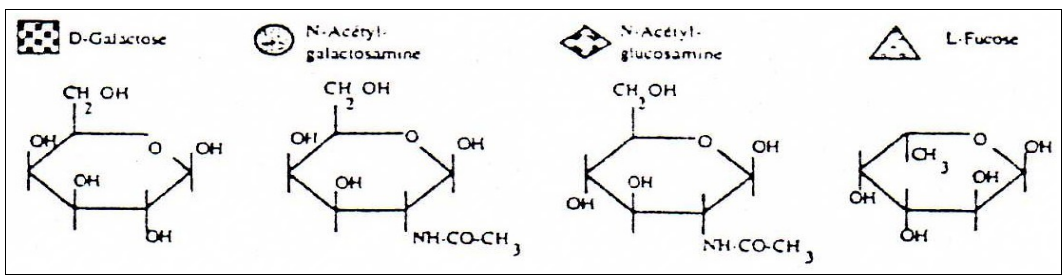
II. Agglutination active directe: caractérisation des antigènes ABO des hématies humaines

1. Rappels sur les groupes ABO Les groupes ABO se définissent :

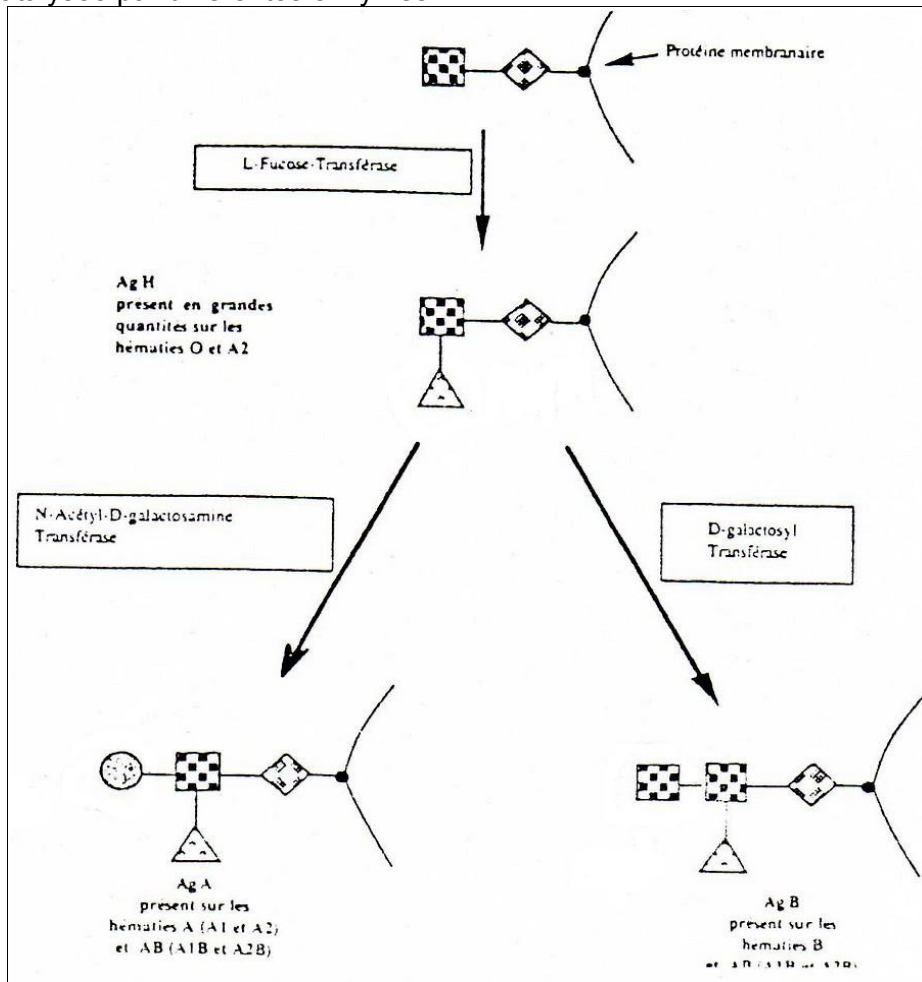
- par la présence ou l'absence à la surface des hématies d'alloantigènes particuliers appelés également agglutinogènes
- par la présence ou l'absence dans le plasma d'anticorps, agglutinines, apparaissant dans les 3 à 6 premiers mois de la vie.

| Groupe | A | | B | AB | | O |
|---------------------|----------------|----------------|-----|------------------|------------------|------|
| | A ₁ | A ₂ | | A ₁ B | A ₂ B | |
| Ag érythrocytaire | | | | | | |
| Ac plasmatique | | | | | | |
| Fréquence en France | 45 % | | 9 % | 3 % | | 43 % |

Ces antigènes érythrocytaires sont des glycoprotéines transmembranaires. La spécificité A, B ou H est portée par la partie glucidique et résulte de l'association de 2 ou 3 oses de façon précise. Les oses concernés sont :



Leur union est catalysée par différentes enzymes :



2. Mise en évidence des antigènes érythrocytaires

2.1. Principe

La mise en évidence des antigènes érythrocytaires se fait par une technique d'agglutination active directe entre les hématies à tester et des anticorps sériques connus: on parle d'épreuve globulaire directe ou épreuve de Beth Vincent.

Cette technique peut être réalisée sur plaque, en tube ou en microplaque.

2.2. Protocole

a) Technique sur plaque d'opaline

Préparations des échantillons de sang

- centrifuger le sang et séparer les hématies et le plasma
- diluer les hématies au 1/10ième en eau physiologique

Réalisation de, témoins

Sur une plaque d'opaline propre et sèche: déposer dans l'ordre

- témoin auto: 1 goutte de plasma à tester + 1 goutte d'hématies à tester
- témoin AB: 1 goutte de sérum de groupe AB + 1 goutte d'hématies à tester

Épreuve globulaire directe de Beth Vincent

- 1 goutte de sérum test anti-A
- 1 goutte de sérum test anti-B
- 1 goutte de sérum test anti-A + anti-B

Ajouter à côté de chaque goutte de sérum test, 1 goutte de culot d'hématies diluées.

Mélanger les 2 gouttes à l'aide de l'agitateur.

Animer la plaque d'opaline d'un mouvement de va-et-vient.

Rechercher s'il y a ou non agglutination au bout d'une minute.

b) Technique en tube

Préparations des échantillons de sang

- A partir du sang centrifugé, diluer les hématies au 1/5^{ième} en eau physiologique

Réalisation des témoins

Mettre dans des tubes distincts à hémolyse :

- témoin auto : 2 gouttes de plasma à tester + 2 gouttes d'hématies à tester
- témoin AB: 2 gouttes de sérum de groupe AB + 2 gouttes d'hématies à tester

Épreuve globulaire directe de Beth Vincent

- 2 gouttes de sérum test anti-A
- 2 gouttes de sérum test anti-B
- 2 gouttes de sérum test anti-A + anti-B

Ajouter à chaque tubes de sérum test, 2 gouttes de culot d'hématies diluées.

Centrifuger 1 minute à 1000 tours par minute.

Après centrifugation, secouer légèrement les tubes et observer la présence ou l'absence d'agglutination.

c) Technique en microplaque

Préparations des échantillons de sang

- Le test se fera à partir des hématies diluées au 1/10^{ième} ou au 1/5^{ième} en eau physiologique

Réalisation des témoins

Sur une microplaque à fond en V: déposer dans l'ordre dans des puits différents

- témoin auto: 50µL de plasma à tester + 50µL d'hématies à tester
- témoin AB : 50µL de sérum de groupe AB + 50µL d'hématies à tester

Épreuve globulaire directe de Beth Vincent

- 50µL de sérum test anti-A
- 50µL de sérum test anti-B
- 50µL de sérum test anti-A + anti-B

Ajouter à chaque puit de sérum test, 50µL de culot d'hématies diluées.

Centrifuger 1 minute à 1000 tours par minute.

Observer s'il y a ou non agglutination.

III. Agglutination active indirecte: recherche de l'antigène Rhésus des hématies humaines

1. Rappel sur le système Rhésus

1.1. Historique de la découverte du système Rhésus

Ce système découvert en 1939 par Lévine et Steton découle des observations suivantes: une mère venait d'accoucher d'un fœtus mort-né suite à un accident hémolytique grave après une transfusion par du sang de son mari pourtant de même groupe ABO. Il expliqua ce phénomène par la présence dans le plasma de la mère d'anticorps spécifiques d'antigènes présents sur les hématies du père mais aussi du fœtus ; antigènes autres que les antigènes du groupe ABO.

En 1940, Lansteiner et Weiner constatent qu'un sérum de lapin immunisé avec des érythrocytes d'un singe (*Macacus Rhésus*) agglutine les érythrocytes du singe et 85 % des érythrocytes humains. Ils en déduisirent que la majorité des érythrocytes humains (85%) sont porteurs d'antigènes communs au singe *Macacus Rhésus*, ces antigènes furent appelés Ag Rhésus.

Ces antigènes sont responsables d'accidents transfusionnels et d'incompatibilité fœto-maternelle.

1.2. Principales propriétés du systèmes Rhésus

On connaît 47 alloantigènes Rhésus différents mais les plus importants sont les Ag D (Rhésus standard), les Ag C, c, E et e.

L'antigène D est le plus immunogène, c'est celui qui est recherché systématiquement en routine et il définit le phénotype Rhésus standard. L'antigène est un antigène protéique comportant plusieurs épitopes.

Les anticorps dirigés contre le système Rhésus ne sont jamais naturels. Ils n'apparaissent qu'après immunisation et sont dits anticorps irréguliers. Ces anticorps sont presque toujours des IgG capables de traverser la barrière placentaire et ne sont capables de former un complexe Ag/AC qu'à des températures voisines de 37°C: ce sont des AC dits chauds.

| Groupe | Rhésus + | Rhésus - |
|---|----------|----------|
| Ag D érythrocytaire | | |
| Ac anti D irrégulier | | |
| Fréquence parmi les individus de race blanche | 85% | 15% |

2. Détermination du phénotype Rhésus

2.1. Principe

La détermination du phénotype Rhésus consiste à rechercher si les hématies du sujet possèdent ou non les antigènes du système Rhésus en mettant en contact les hématies avec des anticorps spécifiques des antigènes connus.

Du fait de la particularité des anticorps utilisés, la réaction d'agglutination nécessite l'ajout de sérum albumine (bovine le plus souvent) : on parle d'agglutination active indirecte.

D'autre part, on utilise le plus souvent une plaque chauffée à environ 40°C pour favoriser la réaction de complexation entre les anticorps et les antigènes.

2.2. Protocole

Préparations des échantillons de sang

Vérifier que le sang à examiner a un volume globulaire sensiblement égal au volume plasmatique.

Réaliser une suspension concentrée d'hématies à 30% dans son plasma.

Agiter le tube pour remettre les hématies en suspension homogène dans le plasma.

Phénotypage Rhésus standard

Délimiter 4 espaces sur le rhéscope.

Déposer rapidement sur la plaque chauffante du rhéscope

- En 1: 2 gouttes de sang à examiner
- En 2: 2 gouttes de sang témoin O Rh+
- En 3: 2 gouttes de sang témoin O Rh-
- En 4: 2 gouttes de sang à examiner

Sans attendre, déposer rapidement :

- En 1: 1 goutte de sérum albumineux témoin AB (sérum albumineux sans anticorps anti-D)
- En 2, 3, 4: 1 goutte de sérum albumineux anti-D

Mélanger à l'aide d'un agitateur propre.

Agiter en inclinant doucement la plaque sur le rhéscope par des mouvements lents de balancier 1 à 3 minutes.

Observer la présence ou non d'agglutination.