

Réaction antigène-anticorps : Définitions, types et applications

OBJECTIFS DES TRAVAUX DIRIGÉS (RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS)

1. Comprendre le principe de la liaison antigène-anticorps
2. Assimiler la différence entre la liaison antigène-anticorps et la réaction anticorps-antigène
3. Définir les caractéristiques d'une réaction antigène-anticorps
4. Connaître les applications de la réaction antigène-anticorps

I. LA LIAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS :

I.1. Définition :

La réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) est un processus bi- ou multimoléculaire qui se traduit par des phénomènes physicochimiques et biologiques d'une grande diversité. La liaison Ag-Ac quant à elle traduit une association à l'échelle moléculaire entre l'Ag et l'Ac.

I.2. Bases moléculaires de la liaison antigène-anticorps :

La liaison Ag-Ac correspond à la formation d'un complexe moléculaire *inclusivement* entre **deux types** de molécules, **l'antigène** et **l'anticorps**. L'anticorps reconnaît spécifiquement son antigène et s'y lie étroitement. À l'échelle supramoléculaire, les antigènes sont connus pour contenir des **déterminants antigéniques spécifiques** (qui sont des **épitopes**), tandis que les anticorps contiennent des **sites de liaison à l'antigène** (qui sont des **paratopes**). Les paratopes et les épitopes sont les régions de liaison **uniques** d'un anticorps et d'un antigène, respectivement.

La liaison Ag-Ac a été découverte à la base du concept élaboré par Ehrlich en 1980. Ce concept fait référence à la reconnaissance d'une clé (en simulant l'antigène) par la serrure (en simulant l'anticorps). Actuellement on connaît que la liaison Ac-Ag met en jeu **une complémentarité spatiale** entre l'épitope et le paratope (Figure 1).

La Clé et la Serrure = L'Antigène et son Anticorps

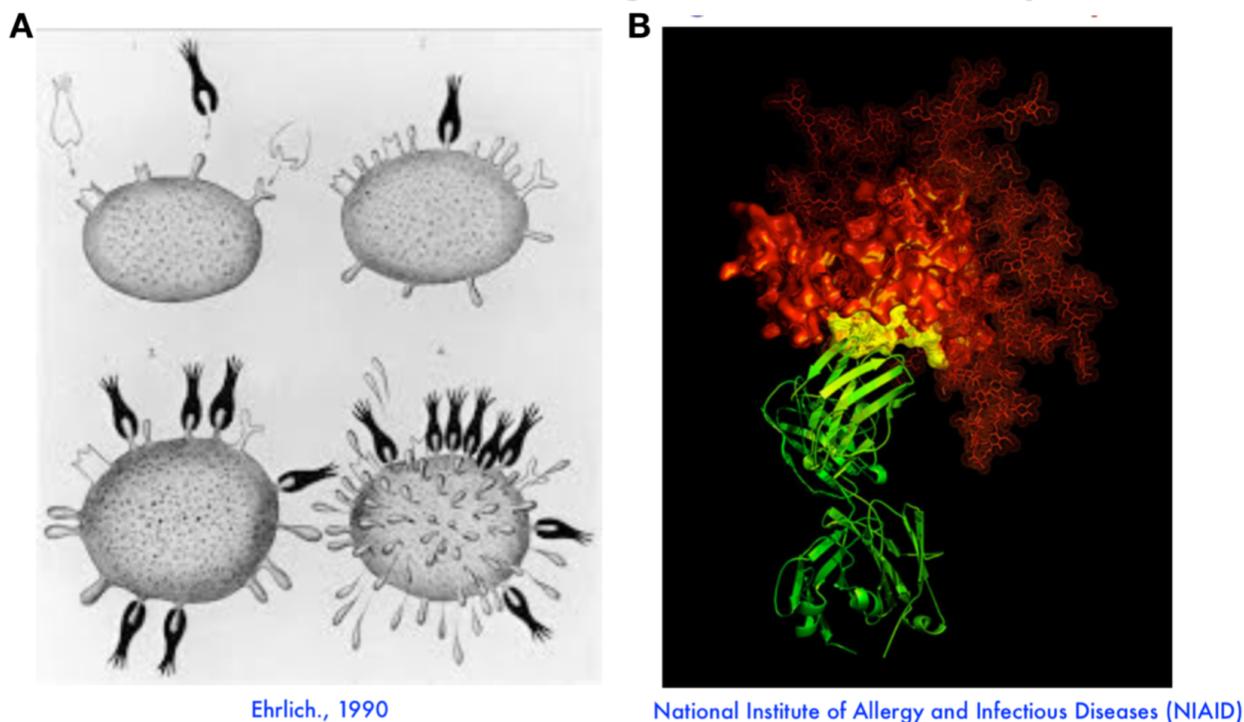


Figure 1. Complémentarité spatiale de la liaison Ag-Ac. (A). Le concept clé-serrure élaboré par Ehrlich en 1980 permet de décrire la clé (qui représente l'antigène) reconnue par la serrure (qui représente l'anticorps). Seule la complémentarité entre l'antigène et l'anticorps permet d'établir la liaison entre les deux molécules. (B) Les études de cristallographie modernes ont permis de confirmer qu'il existe une complémentarité spatiale entre le paratope (en vert) et l'épitope (en jaune).

II. CARACTÉRISTIQUES DE LA LIAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS :

II.1. Caractéristiques communes :

a. Spécificité :

La caractéristique la plus frappante des interactions antigène-anticorps est leur haute spécificité. Les anticorps sont capables de reconnaître des petites différences dans la structure primaire d'un antigène ou des différences de charges, de conformation optique ou stérique. Cependant, la spécificité n'est pas absolue, il existe des réactions croisées.

b. Liaisons non covalentes :

Dans la réaction Ag-Ac, les forces de liaison sont uniquement des interactions faibles dites « non covalentes ». Les forces non covalentes sont aussi indispensables pour réaliser d'autres types de liaison pour plusieurs macromolécules biologiques. On trouve l'exemple de la liaison structurale

pour assurer la configuration tridimensionnelle quaternaire des protéines et autres macromolécules biologiques, ainsi que la liaison substrat-enzyme, ou bien la liaison d'un ligand avec son récepteur. Ces forces sont définies en quatre types (Figure 5) :

- Liaisons hydrogène : elle possède l'énergie de liaison la plus forte et correspondent à des ponts d'hydrogène formés entre deux atomes.
- Liaisons électrostatiques : Cette liaison crée une attraction ionique entre les charges opposées. L'énergie de liaison est inversement proportionnelle à la distance portée au carré.
- Forces de Van der Waals : Elles correspondent à des interactions entre les nuages électroniques qui dérivent d'un déséquilibre de la répartition des électrons autour du noyau. L'énergie est inversement proportionnelle à la distance entre les deux molécules.
- Liaisons hydrophobes : Ce sont des interactions entre des résidus hydrophobes (d'où les molécules d'eau sont exclues). Les liaisons hydrophobes sont les plus importantes et se forment entre des groupements non polaires et hydrophobes et aboutissent à l'exclusion d'eau. De plus elles représentent près de 50% des interactions entre épitope et paratope et contribuent très fortement à la liaison antigène-anticorps.

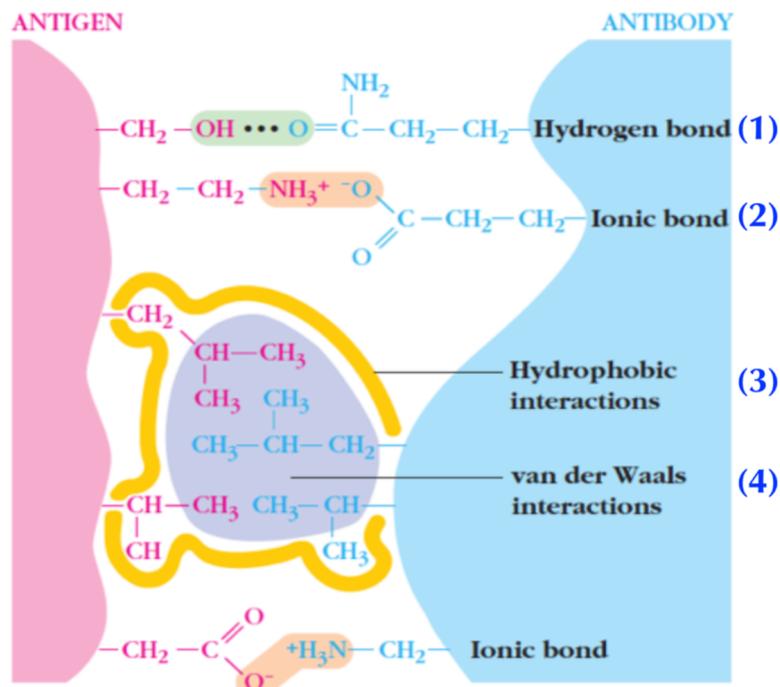


Figure 2. Liaisons non covalentes au sein de la liaison antigène-anticorps.

Ces liaisons requièrent un contact étroit entre l'antigène et l'anticorps. La distance qui sépare les groupements réactifs est un facteur critique pour l'établissement des liaisons. Il existe 4 types de liaisons. **(1)** Les liaisons hydrogène (Hydrogen Bondy). **(2)** Les liaisons électrostatiques (Ionic Bondy). **(3)** Les liaisons hydrophobes. **(4)** Les forces de Van Der Walls.

c. Complémentarité entre l'épitope et le paratope :

La complémentarité structurale stérique est très importante car elle influence l'énergie de liaison entre l'épitope et le paratope. Une bonne complémentarité stérique favorise des forces d'attractions *Fortes*, assurent une énergie globale de liaison *élevée et un* complexe Ag-Ac efficace. S'il y a une mauvaise complémentarité stérique, il y a moins de forces d'attraction et les forces de répulsion s'accroissent. L'énergie globale de liaison est donc très mauvaise et empêche toute liaison.

d. Réversibilité

Les mesures thermodynamiques de la réaction Ag-Ac ont démontré que la liaison entre l'épitope et le paratope est réversible et elle implique une faible énergie de liaison d'environ **34 à 65 kilojoules/mole**. Ainsi, dans un milieu donné, les liaisons non covalentes de la réaction Ag-Ac se forment et se rompent selon un équilibre entre les formes libres de l'Ag ou l'Ac.

II.2. Caractéristiques liées à l'antigène ou à l'anticorps :

a. Affinité :

L'affinité est une caractéristique de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène et elle représente l'intensité de la réaction entre un épitope unique et un seul paratope. La valeur de l'affinité dépend d'un équilibre entre des forces d'attraction et des forces de répulsion entre les deux sites (épitope et paratope). La plupart des anticorps ont une forte affinité pour leurs antigènes. L'affinité des anticorps monoclonaux peut être facilement mesurée car ils ont un seul épitope et sont homogènes. Les anticorps polyclonaux ont une valeur d'affinité moyenne en raison de leur nature hétérogène et de leurs différences d'affinité vis-à-vis des différents épitopes antigéniques.

b. Avidité :

L'avidité est une caractéristique des antigènes possédant des déterminants antigéniques multiples. Dans ce cas, l'avidité représente la force avec laquelle ce type d'antigène peut se lier à des anticorps polyvalents. L'avidité dépend de plusieurs facteurs entre autres l'affinité de l'anticorps envers l'antigène, la valence de l'antigène et de l'anticorps et la conformation spatiale lors de l'interaction. Si l'anticorps et l'antigène sont multivalents et la conformation spatiale est favorable, l'interaction reste très forte en raison d'une forte avidité. L'avidité a toujours une valeur supérieure à la somme des affinités individuelles. La plupart des antigènes possèdent plusieurs sites épitopiques semblables et la plupart des anticorps sont bivalents ou multivalents. Par conséquent, la plupart des interactions Ag-Ac restent fortes et stables en raison de la forte avidité du complexe Ag-Ac.

c. Différence entre affinité et avidité :

L'affinité fait donc référence à la force de liaison entre un déterminant antigénique unique et un site anticorps individuel alors que l'avidité fait référence à la force globale de la liaison entre les antigènes et les anticorps multivalents.

III. APPLICATIONS ANALYTIQUES DES RÉACTIONS ANTICORPS-ANTIGÈNE SECONDAIRES = ESSAIS IMMUNOLOGIQUES:

Lorsqu'on met un anticorps en contact avec l'antigène contre lequel il est dirigé, il se produit deux phénomènes perçus en deux niveaux :

- a. **L'interaction primaire** : une combinaison entre les paratopes et les épitopes assortis, donnant l'immunocomplexe. Cette association est réversible puisqu'elle met en jeu des interactions non-covalentes. L'interaction primaire se produit rapidement et dure *quelques millisecondes*, elle est **macroscopiquement invisible**.
- b. **La réaction secondaire et la révélation des complexes immuns** : elle permet la révélation d'un réseau polymérique formé entre plusieurs antigènes et anticorps. Ce produit est **macroscopiquement visible** et il est stable sur un temps allant de *quelques minutes à quelques heures*.

On utilise les phénomènes sus décrits pour réaliser les essais immunologiques tels que l'agglutination et la précipitation. Ces derniers permettent la détection et/ou la quantification d'antigènes ou d'anticorps. L'analyse immunologique peut être réalisée sur différents échantillons tels que le sang, l'urine, l'expectoration ainsi que d'autres composantes du corps. Les essais immunologiques possèdent un intérêt irremplaçable entre autres dans le diagnostic des maladies, leurs suivis et leurs dépistages ainsi que dans les enquêtes policières.

III.1. Réaction d'agglutination :

L'agglutination se produit lorsqu'un ou plusieurs anticorps interagissent avec **un antigène particulaire** (Figure 3). Certains antigènes particuliers portent naturellement des épitopes tels que les **cellules bactériennes** et les **hématies**, d'autres sont artificiellement combinés aux épitopes comme les **billes de latex**. La technique d'agglutination est largement utilisée avec l'avantage de ne pas être dispendieuse. Le processus d'agglutination passe par les deux étapes suivantes (Figure 4) :

- a. **Étape de sensibilisation** : C'est une étape qui permet aux anticorps spécifiques de s'attacher à leurs antigènes correspondants. Elle nécessite un temps d'incubation variable qui s'étale entre 15 — 60 minutes. En général, les anticorps les mieux agglutinants sont les IgG et surtout les IgM. Cette étape est très sensible aux paramètres qui influencent la réaction Ag-Ac. Par exemple, les IgM sont mieux agglutinants à des températures entre 4-22 °C, tandis que les IgG sont plus efficaces à 37 °C.
- b. **Étape de réticulation** : Les réticulations (ou agglutinats) se forment entre les particules sensibilisées, c'est-à-dire fixées aux anticorps. Cette étape est plus longue que l'étape de sensibilisation. L'IgM vu sa taille est l'anticorps à l'origine de la meilleure réticulation. Les IgG nécessitent un renforcement. Les réticulations sont visibles à l'œil nu et durent quelques minutes, de plus, elles sont sensibles aux conditions physicochimiques dont lesquelles elles sont formées, telles que les concentrations des anticorps et antigènes.

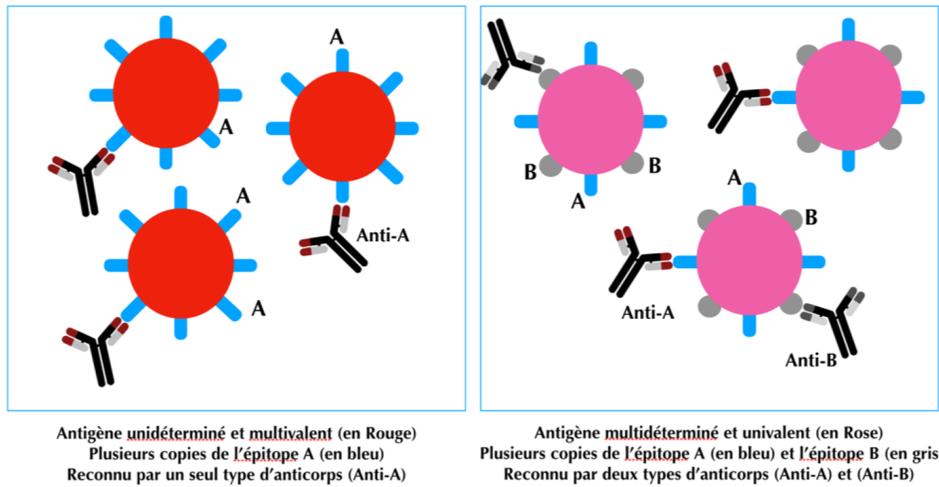


Figure 3. L'antigène particulaire. Les antigènes insolubles ou particuliers (en rouge et en rose) portent des antigènes en surface et sont classés en deux types : l'antigène unidéterminé et multivalent, interagissant avec un seul anticorps ; l'antigène multidéterminé et univalent interagissant avec au moins 2 différents anticorps.

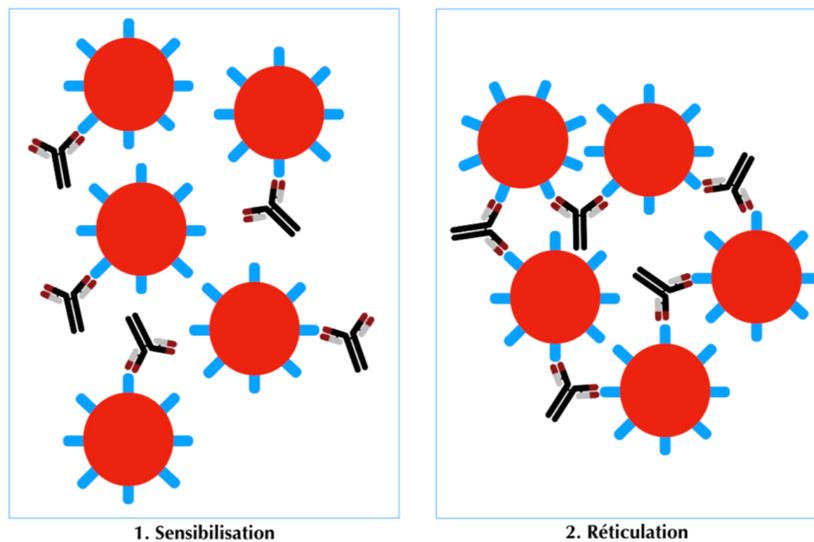


Figure. 4. Étapes de l'agglutination. Lorsque plusieurs antigènes particuliers sont présents en contact des anticorps, ces derniers se fixent à leurs surfaces dans une première étape appelée la sensibilisation. Par la suite, en l'étape de réticulation, les antigènes se lient entre eux par l'intermédiaire des anticorps et forment un réseau visible à l'œil nu.

Parmi les applications de l'agglutination : le groupage sanguin (Figure 5) et le diagnostic en microbiologie des maladies bactériennes.

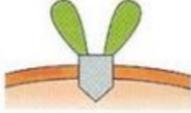
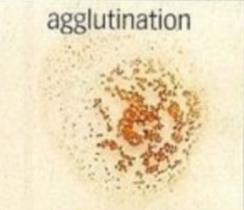
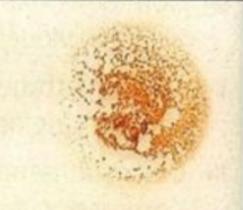
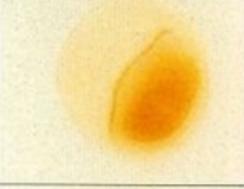
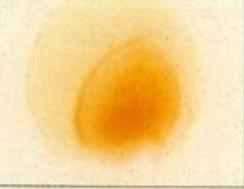
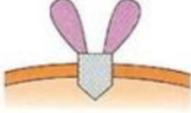
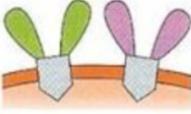
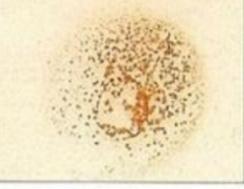
	Anti-B	Anti-A	Anti-A+B
Groupe A 	pas d'agglutination 	agglutination 	
Groupe O 			
Groupe B 			
Groupe AB 			
Identification des groupes sanguins réalisée par un test d'agglutination.			

Figure 5. Test d'agglutination pour le groupage sanguin ou hémagglutination. Pour identifier le groupe sanguin, on utilise une goutte de sang à laquelle on ajoute directement différents types de sérum. Il existe 4 types de groupes sanguins (colonne 1), à savoir les groupes A, O, B et AB tel que schématisé du haut en bas. Les groupes A, B et AB expriment les antigènes de surface A, B ou A et B respectivement, tandis que le groupe O ne possède aucun antigène de surface. Le sérum anti-B (colonne 2) contient des anticorps dirigés contre les antigènes B, dans ce cas les agglutinations se forment uniquement pour les groupes B et AB, et sont distinguées sous forme de réticulations visibles à l'œil nu. Le sérum anti-A (Colonne 3) contient des anticorps dirigés contre les antigènes A, et ne permet l'apparition d'agglutinats qu'en présence des globules rouges des groupes A ou AB. Le sérum anti-AB (Colonne 4) contient des anticorps anti-A et des anticorps anti-B et réagit ainsi en formant des réticulations en présence des antigènes A ou B, et ce pour les groupes A, B et AB. L'utilisation des trois sérums anti-A, anti-B ou anti-AB ne donne aucune réticulation en présence des globules rouges du groupe O, vu l'absence d'antigène à leurs surfaces qui est indispensable pour la réticulation.

III.2. Réaction avec précipitation:

Les réactions avec précipitation sont basées sur un principe semblable aux réactions par agglutination. La différence consiste dans le fait que l'antigène est une **molécule soluble** au lieu d'être une particule. Il existe deux groupes de réaction de précipitations, réaction en milieu gélifié et réactions en milieu liquide.

III.2.1. Pour les réactions en milieu liquide :

La précipitation dépend des quantités d'anticorps et d'antigènes solubles et mélangés. Le mélange de la solution d'antigène et la solution d'anticorps permet l'apparition en premier lieu d'un **agrégat dispersé** dans l'ensemble de la phase liquide, mais il a tendance à se déposer progressivement (quelques minutes à plusieurs heures) sous forme d'un **précipité**. Le précipité consiste en des complexes multimériques d'antigène reliés les uns aux autres par des molécules d'anticorps. Ceci engendre la précipitation d'un antigène multivalent fixant deux segments Fab de deux molécules d'anticorps. La taille du **précipité** obéit au principe de rapport Ac/Ag. Autrement, si les deux solutions de l'anticorps (généralement l'immun sérum) et de l'antigène ne sont pas mélangées et sont plutôt disposées en superposition l'une sur l'autre dans un tube à essai, le précipité prend la forme d'un disque visible à l'interface des deux phases liquides, de l'antigène et l'anticorps. Cet essai est dénommé le « **ring-test** » (Figure 6).

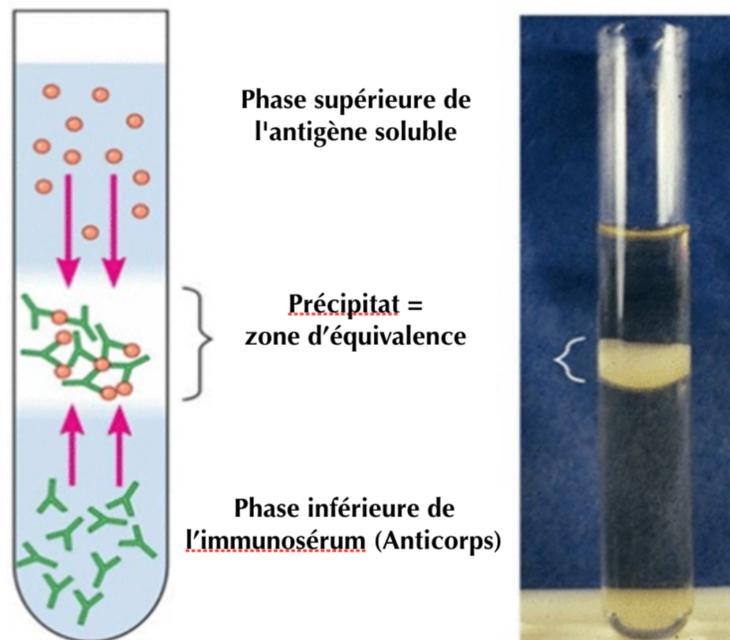


Figure 6. Le précipité du Ring-test ou test de l'anneau.

La taille du précipité dépend entre autres de la quantité d'anticorps et d'antigène et elle est limitée par le rapport Ac/Ag selon le principe de « **la courbe de précipitation** ». Trois cas de figure permettent de dresser cette courbe (Figure 7) :

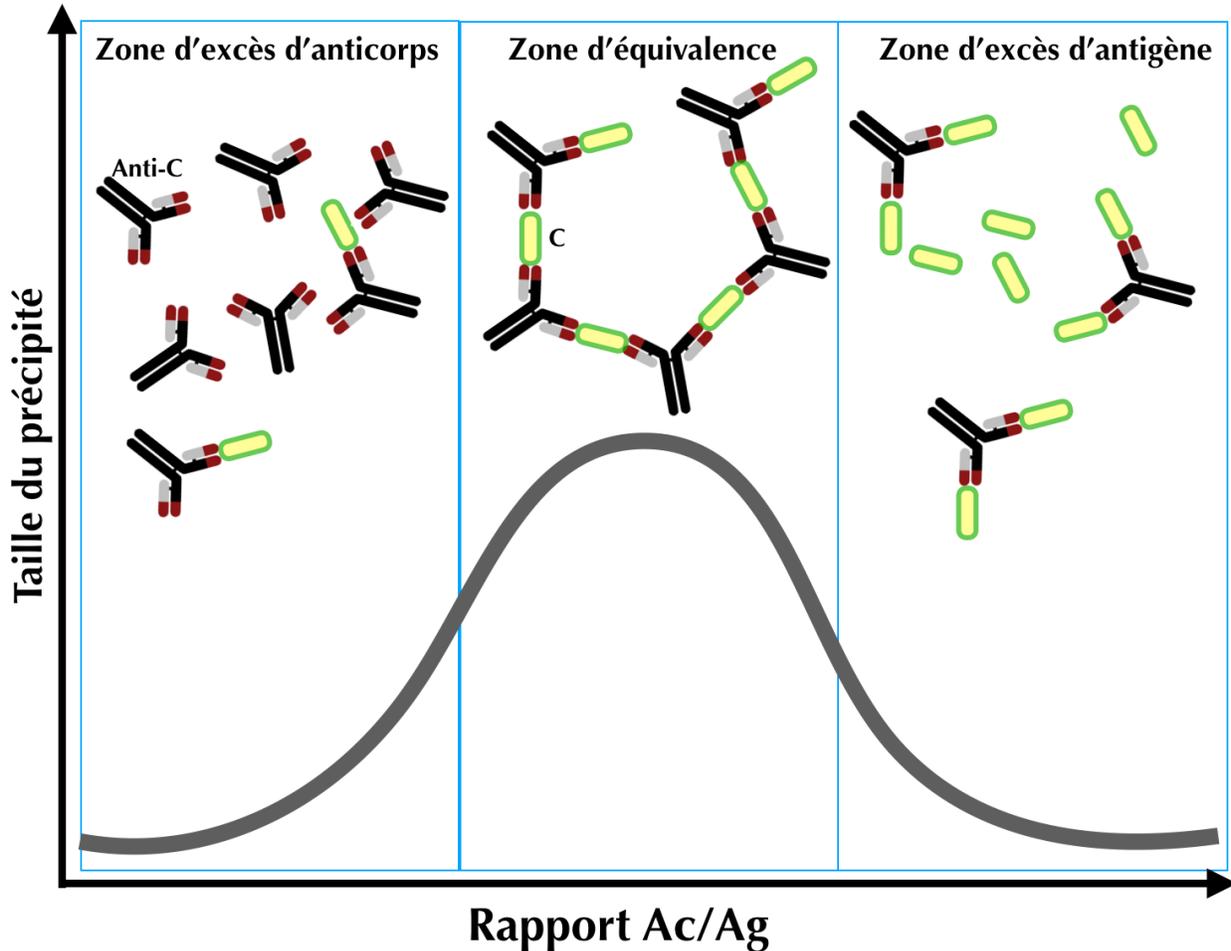


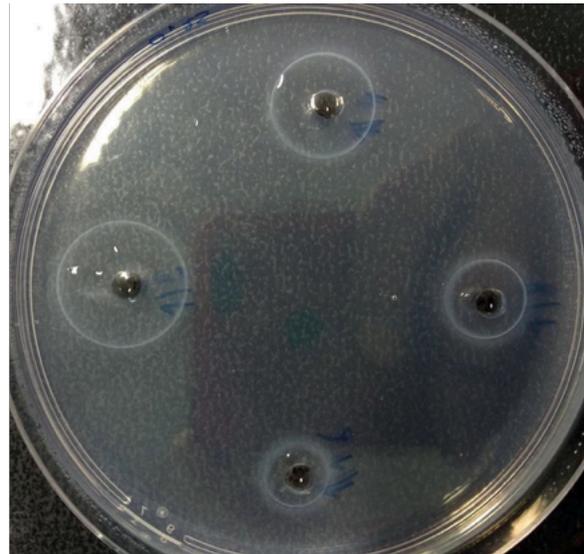
Figure 7. La courbe de précipitation. L'antigène soluble C (en Jaune et vert) est reconnu par l'anticorps précipitant (Anti-C). Le précipité se forme uniquement au niveau de la zone d'équivalence. En effet, si des quantités suffisantes de l'antigène soluble sont présentes avec une quantité adéquate d'anticorps, on se trouve à la zone d'équivalence, lorsque toutes les molécules d'Ac sont liées à deux molécules d'antigènes différentes, il se forme un grand réseau qui favorise l'apparition du précipité et la courbe de précipitation a atteint un maximum dans sa partie centrale. Lorsque de faibles quantités d'antigène sont ajoutées à l'anticorps (*Zone d'excès d'Anticorps*), les complexes Ag/Ac sont formés dans des conditions où l'anticorps est en excès. Ainsi, chaque molécule d'Ag est couplée à plusieurs molécules d'anticorps sans pouvoir former le précipité. Lorsque la quantité d'antigène est très élevée (*Zone d'excès d'antigène*), seuls de petits complexes peuvent se former, la taille réduite de ces complexes favorise leur solubilité expliquant ainsi l'inhibition de la réaction de précipitation observée en excès d'antigène.

III.2.2. Pour les réactions en milieu gélifié :

Lorsque les solutions d'anticorps et d'antigènes solubles sont déposées dans **un milieu solide ou gélifié** (en général un gel d'agarose), d'autres aspects du précipité sont obtenus, par exemple dans la technique de diffusion double d'Ouchterlony ou la technique de Mancini (Figure 8), on trouve **les arcs et les anneaux de précipitation** (respectivement, au lieu d'avoir un précipité). Ces formes de précipitation s'obtiennent lorsque les molécules d'anticorps se complexent avec les molécules d'antigènes dans une **zone de rencontre** où les concentrations des deux solutions sont optimales pour que la quantité d'anticorps sature les sites antigéniques, c'est-à-dire **la zone d'équivalence**. Les précipités se présentent sous la forme d'un arc ou un anneaux blanchâtre visible à l'œil nu.



**Immunodiffusion double
ou test d'Ouchterlony**



**Immunodiffusion radiale simple
ou technique de Mancini**

Figure 8. Résultats de tests de précipitations sur milieux gélifiés. À noter la forme des arcs dans la technique d'Ouchterlony (à droite) et les anneaux (à gauche) formés à distance des puits dans les zones de diffusions radiales.

a. Technique de Mancini :

La technique de Mancini est également appelée l'immunodiffusion radiale simple car un seul composant des deux réactifs Ag ou Ac diffuse dans un milieu gélosé. Cette gélose est mélangée soit à l'anticorps soit à l'antigène selon une concentration définie. Un test de Mancini avec diffusion de l'antigène est très fréquemment étudié au laboratoire, et il est réalisé selon les étapes abrégées suivantes :

1. Une **préparation de gélose** est mélangée à un sérum contenant des anticorps dirigés contre l'antigène étudié.
2. La gélose est coulée en boîte de Pétri à une hauteur déterminée et elle est laissée jusqu'à refroidissement.
3. Dans la gélose refroidie, on peut creuser des puits. Chaque puits est appelé **la zone de dépôt** et il sert à déposer une solution d'antigène d'une concentration C. Le nombre de puits dépend du nombre des concentrations de l'antigène à étudier.
4. Les différentes solutions concentrées de l'antigène sont déposées dans leurs puits correspondants.
5. Dans des conditions déterminées de température et d'humidité, les molécules de l'antigène diffusent à partir de chaque puits dans toutes les directions à l'intérieur de la gélose, en formant un réseau de complexes immuns avec les molécules de l'anticorps.
6. À la fin de cette diffusion, des **disques précipitants** de complexes immuns apparaissent autour des puits à **la zone d'équivalence** = disques de précipitations. Les disques sont visibles à l'œil nu. Le diamètre de chaque disque est proportionnel à la concentration. On peut établir une gamme d'étalonnage en fonction du diamètre des disques et les concentrations et ceci permettra de déduire les concentrations inconnues et testées de l'antigène. Ainsi on décrit le test de Mancini comme un test qualitatif et quantitatif.

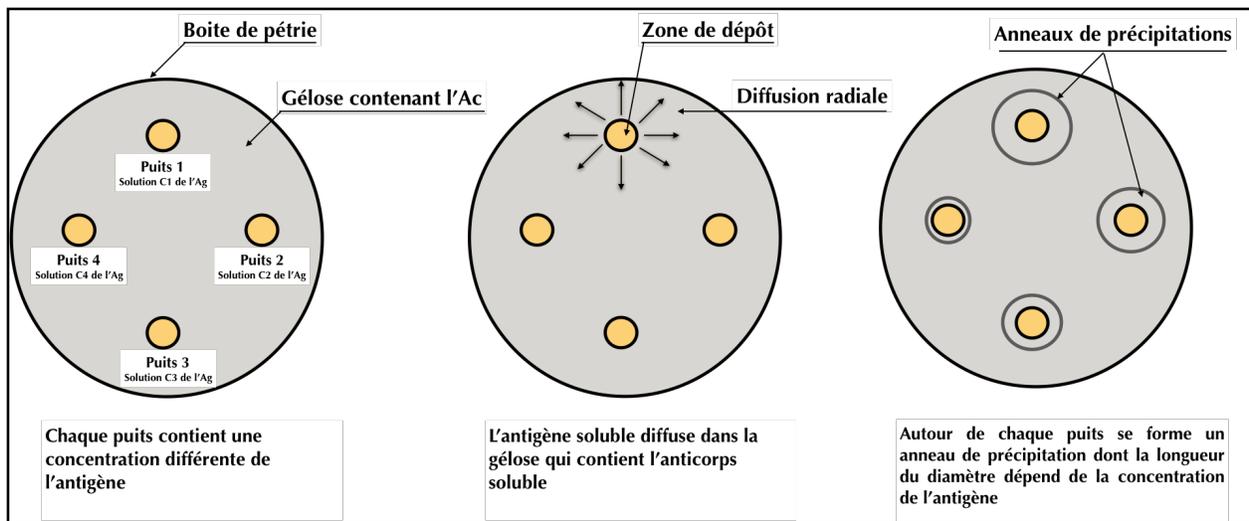


Figure 9. Immunodiffusion radiale simple ou technique de Mancini. Les diamètres des anneaux de précipitations dépendent de la concentration de l'antigène. On peut déduire que les concentrations C1, C2, C3, C4 sont décroissantes.

b. Technique d'Ouchterlony :

Contrairement à la méthode de Mancini, la technique de double diffusion en gel d'Ouchterlony est une méthode d'immunoprécipitation basée sur la diffusion d'antigènes et d'anticorps solubles **simultanément** dans le milieu gélifié, à partir de puits placés **en vis à vis**.

Avec le même principe, lorsque les molécules d'anticorps rencontrent les molécules d'antigènes, la liaison Ac-Ag conduit à la précipitation des complexes immuns dans **la zone de rencontre uniquement** si l'anticorps reconnaît l'antigène.

La méthode d'Ouchterlony peut être utilisée spécifiquement pour détecter la présence d'anticorps spécifiques dans un sérum de malades ou pour déterminer la présence d'un antigène donné dans un liquide biologique. La technique de double diffusion peut être assimilée ainsi :

1. La gélose est coulée en boîte de Pétri à une hauteur déterminée et elle est laissée jusqu'à refroidissement.
2. Dans la gélose refroidie, on creuse des **puits périphériques équidistants** autour d'un **puits central** (Zone de dépôts).
3. Un immunosérum dirigé contre un antigène déterminé est placé dans le puits central.
4. Des solutions de plusieurs antigènes à tester sont déposés dans les puits périphériques.
5. Dans des conditions déterminées de température et d'humidité, les molécules des antigènes qui réagissent avec l'anticorps diffusent à partir de leurs puits dans la direction du puits central en formant un réseau de complexes immuns avec les molécules d'anticorps. Ainsi, les zones d'équivalence permettent de former cette fois-ci **des arcs** et non pas des disques.

La technique d'Ouchterlony est une technique **qualitative**. Même si la position du précipité dépend de la concentration relative des antigènes et des anticorps, cette technique reste une méthode d'analyse semi-quantitative.

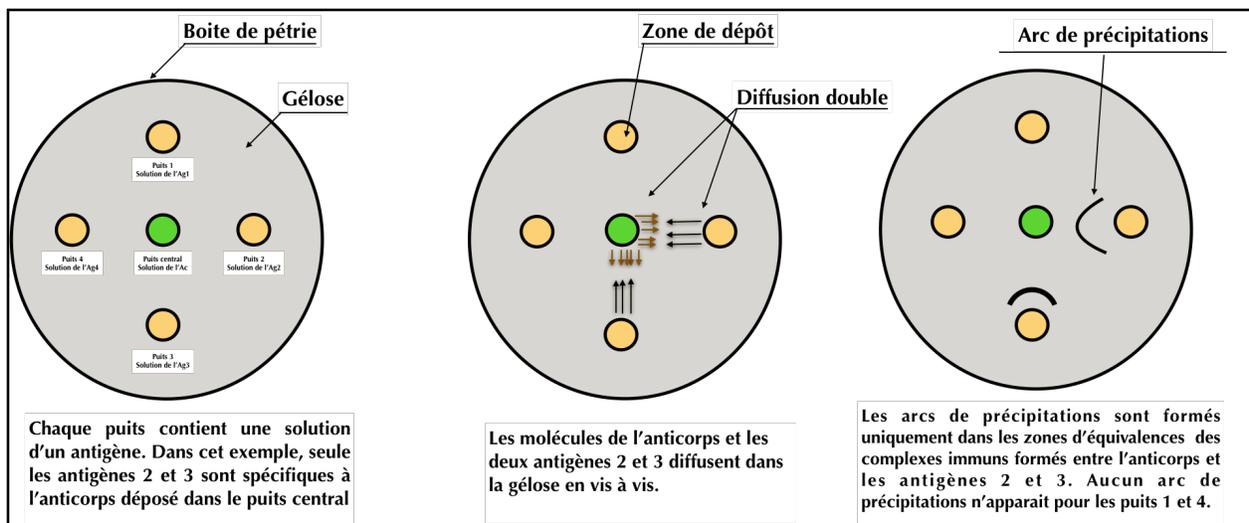


Figure 10. Méthode d'Ouchterlony. La diffusion double concerne les molécules des anticorps et des antigènes solubles.

IV. APPLICATIONS IN VIVO DE LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS :

- a. Effets bénéfiques :** La réaction Ag-Ac est réalisée in vivo dans l'organisme, dans le cadre des réponses immunitaires contre les agressions pathogènes. Ainsi, nous pouvons décrire plusieurs phénomènes immunitaires basés entre autres sur cette réaction. On cite : l'agglutination bactérienne, la lyse bactérienne et la bactéricide, le chimiotactisme, la neutralisation des toxines, la fixation du complément, le renforcement de la phagocytose, la neutralisation virale et l'immunité antiparasitaire.

- b. Effets pathologiques :** Cependant, lorsque la réaction Ag-Ac s'installe dans un cadre particulier et nuisible pour notre organisme, des maladies graves peuvent s'installer. On cite par exemple le choc anaphylactique, l'allergie, la réaction d'Arthus et les accidents hémolytiques dus à la transfusion.

LEXIQUE :

Complémentarité spatiale : aussi désignée comme stérique, conformationnelle, c'est une représentation dans l'espace.

Cristallographie aux rayons x : Une technique qui permet de définir une structure 3D d'une molécule et déduire ses liaisons possibles.

Échelle supramoléculaire : c'est un domaine de la chimie moléculaire qui s'intéresse non pas à ce qui se passe *dans* les molécules, mais à ce qui se produit entre différentes molécules ou leurs interactions.

Thermodynamique moléculaire : correspond à un domaine de la physique qui étudie le comportement thermique des molécules.

Réaction d'Arthus : C'est une maladie inflammatoire de la peau apparaissant au cours d'un excès d'antigène.