module d'immunologie
3ème année de Médecine
Faculté de médecine
Université d'Alger I Benyoucef BENKHEDDA
Année universitaire: **2022/2023**

Les réactions immunologiques utilisant des anticorps marqués

Dr Hamouche.A
assounihelmed@gmail.com

Plan

- Introduction.
- I-Méthodes d'immunofluorescence.
- II-Méthodes immuno-enzymatiques.
- III-Méthodes immuno-radiologiques.
- IV-Méthodes chimiluminiscentes

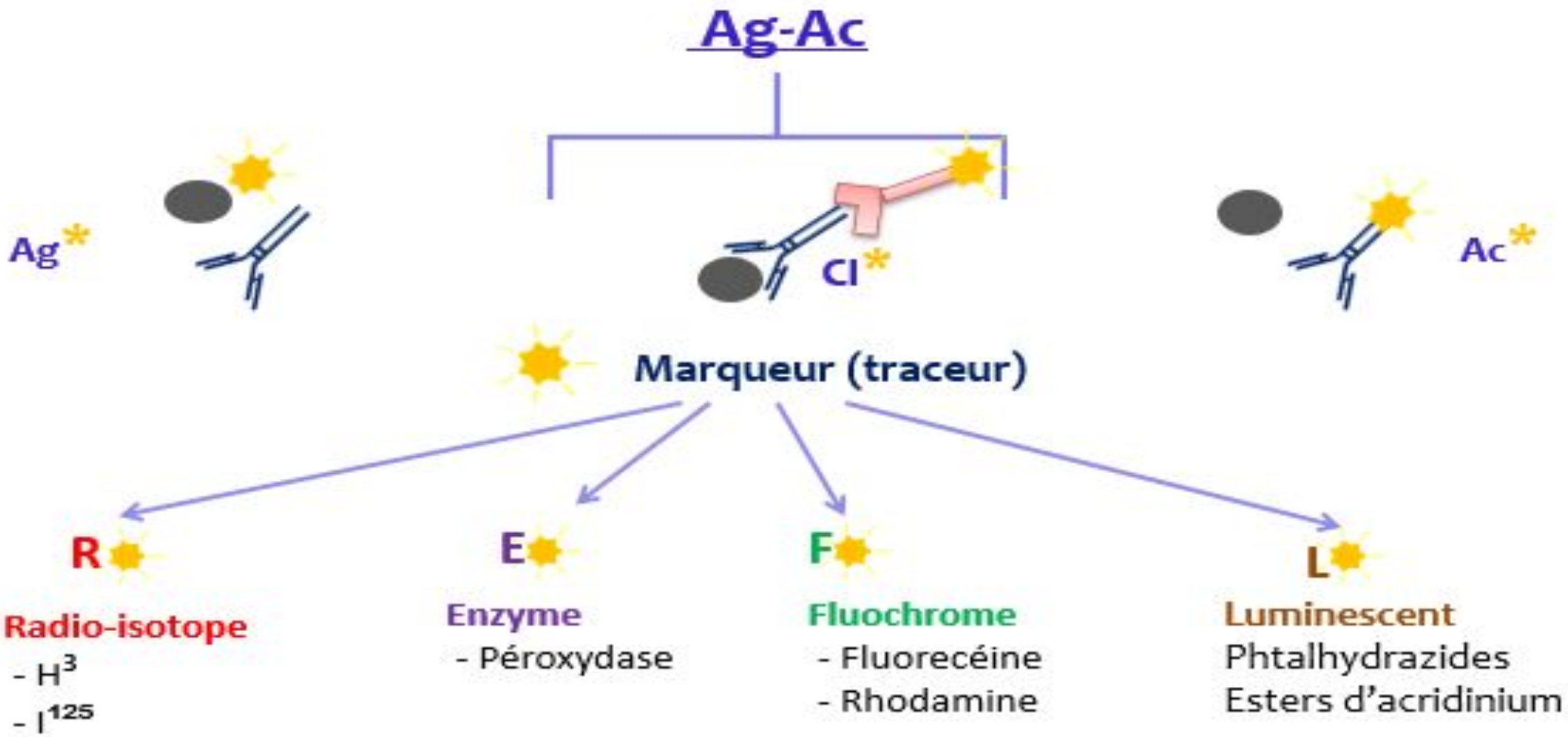
Introduction

- Techniques immuno analyses utilisant un **traceur** détectable pour révéler et quantifier la réaction Ac-Ag.

- Avantage: très performantes « sensibilité**,fiabilité, et rapidité ».

- Marqueur: entité « atome, molécule, ion… » lié chimiquement à un Ag ou Ac, et délivrant un signal direct ou indirect, quantitavement mesurable.

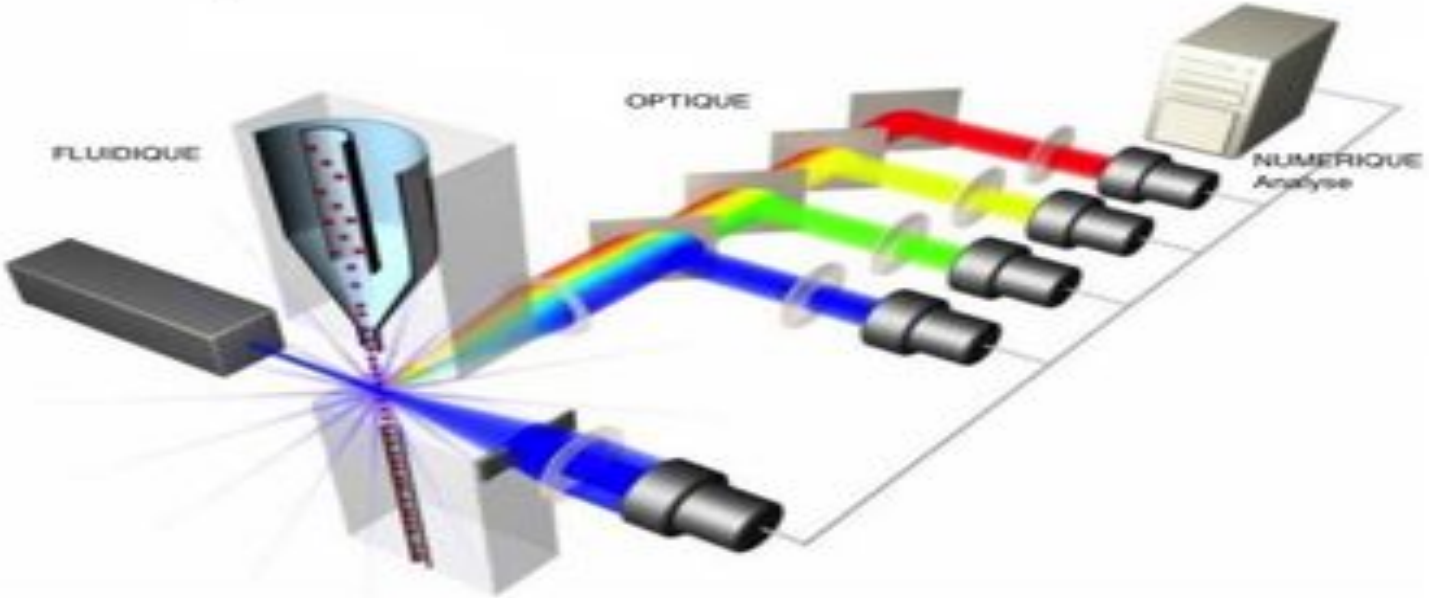
Techniques immunologiques utilisant un marquage



RadioImmunologique	Immuno-enzymatique	Immuno-fluoréscence	Chimiluminescence

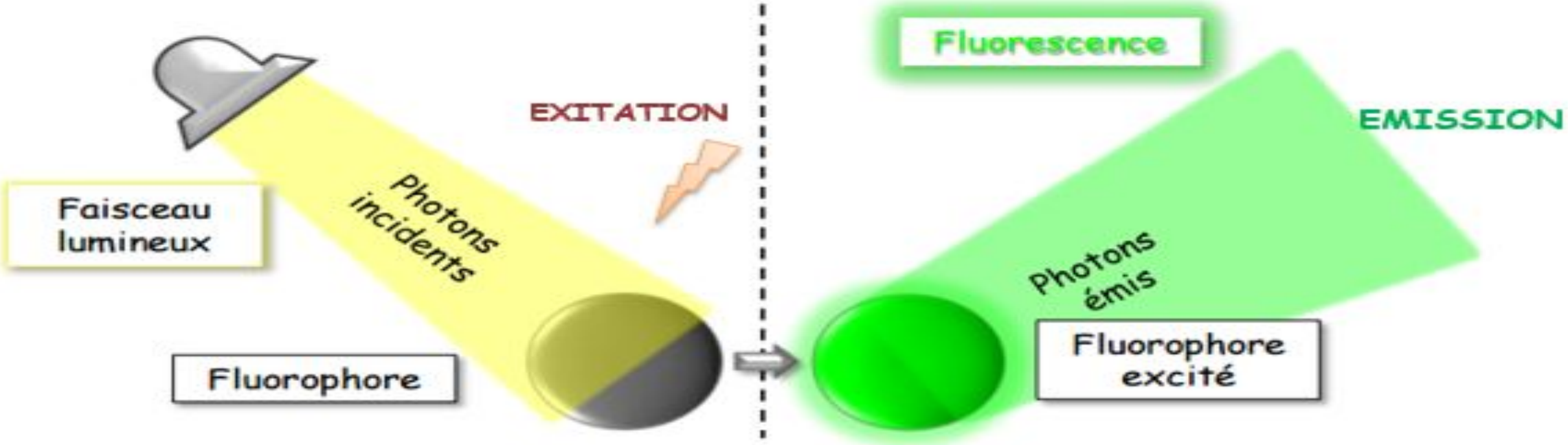
I-Méthodes d'immunofluorescence

- Un Ac est couplé à un fluorochrome qui est excité par une lumière UV.
- Va émettre une lumière fluorescente « verte ou rouge … ».EXp : fluoresceine et la **rhodamine**
- Observation au microscope à UV.

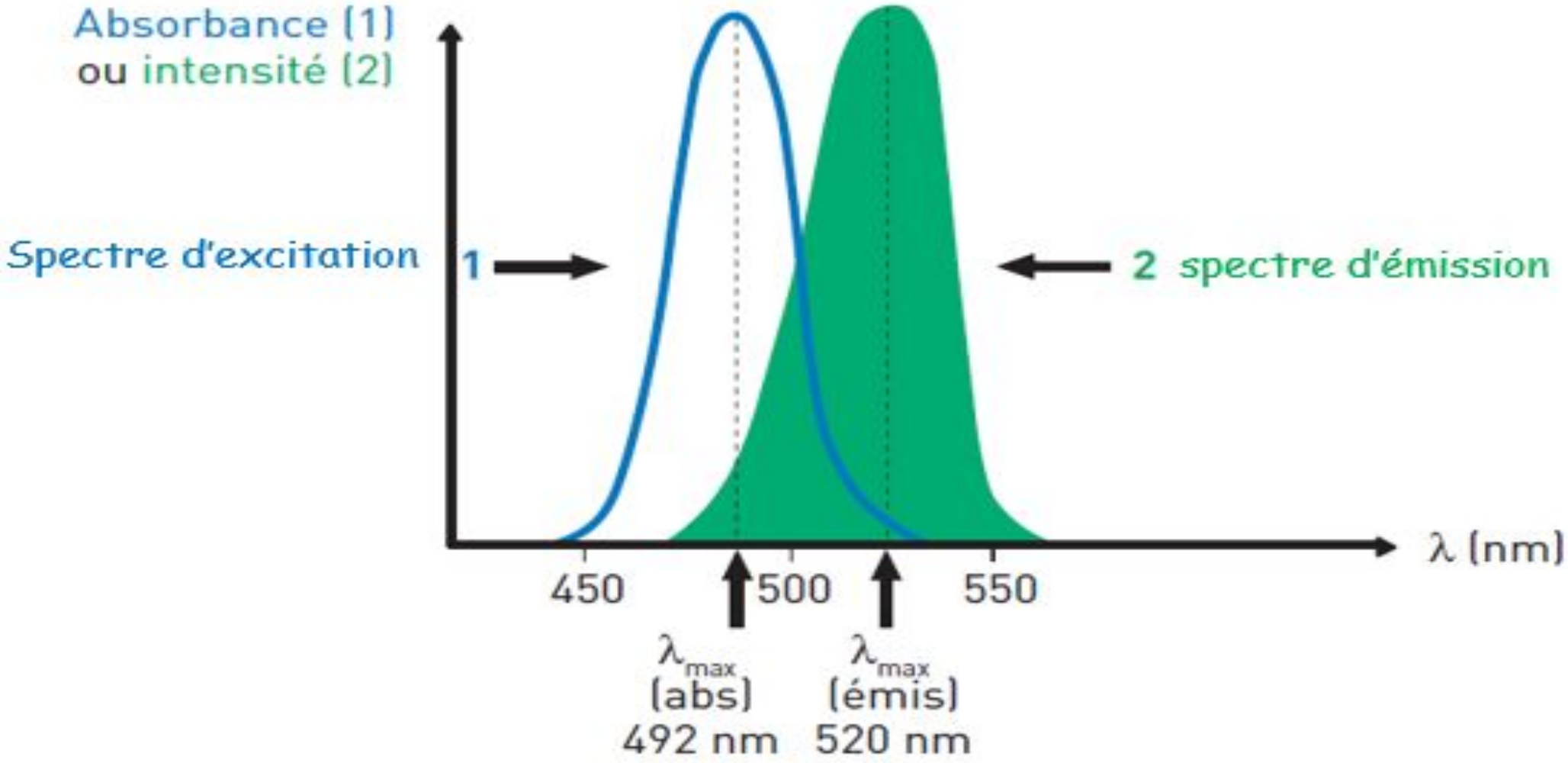


I-1 Principe

- Fluorochrome / Fluorophore = luminophore susceptible d'émettre une lumière fluorescente sous l'effet d'une énergie excitatrice lumineuse.



I-1 Principe

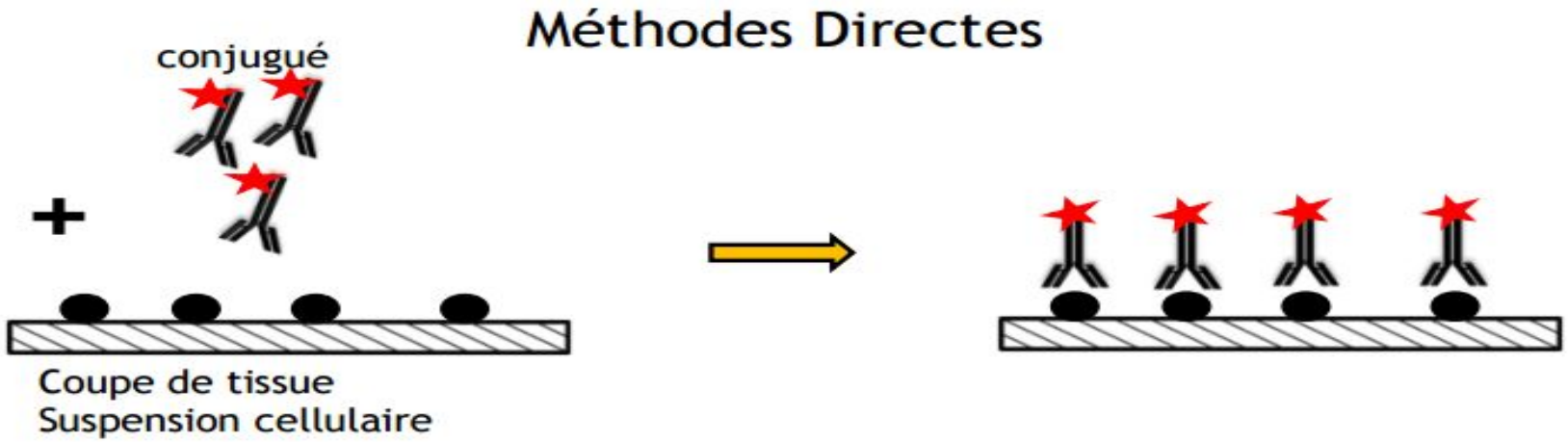


Spectres d'absorption (1) et d'émission (2) de la fluorescéine.

I-2- méthodes de l'Immunofluorescence

- TROIS types d'IF
- Direct
- Indirect
- Avec double marquage.

I-2- méthodes de l'Immunofluorescence



•Marquage des Ac spécifiques de chaque Ag .

Avantages:

•une seule réaction est effectuée.

• le contrôle de spécificité est plus simple.

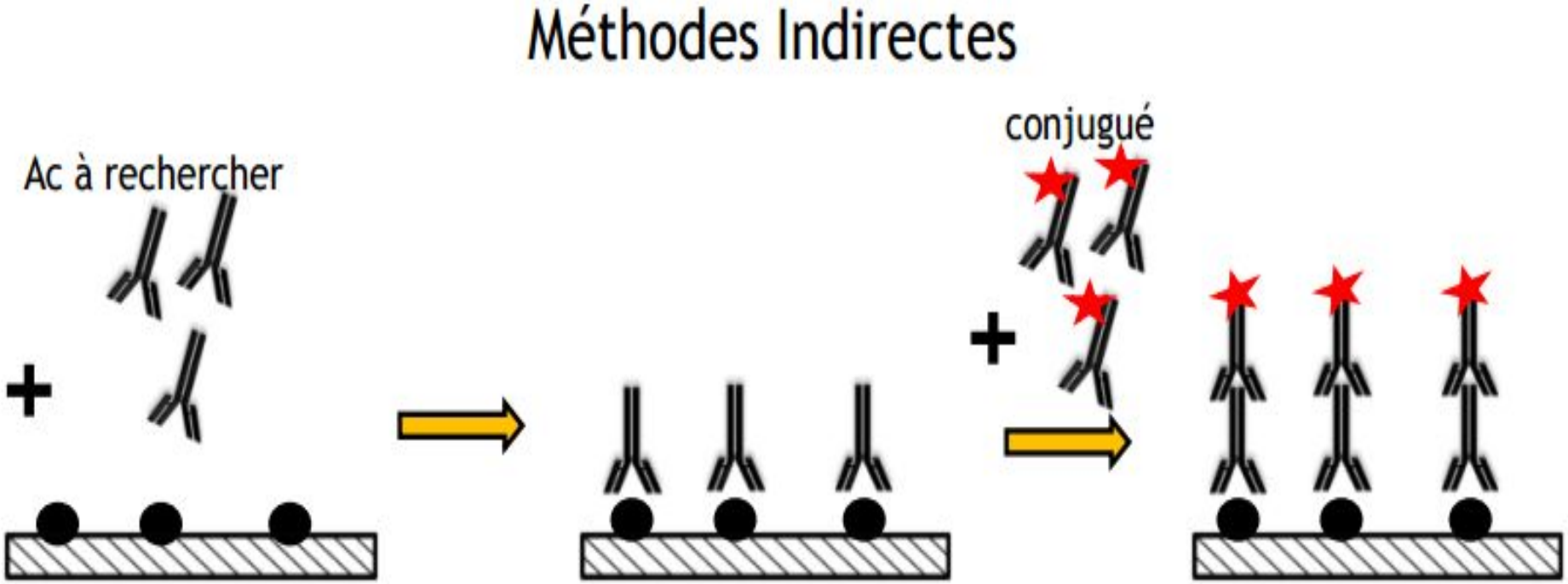
Applications :

•Identifier un germe.

•Analyser dans une biopsie tissulaire les dépôts d'immunoglobulines et de complément.

•Immuno phenotypage des LB,LT « CD4 et CD8 ».

I-2- méthodes de l'Immunofluorescence

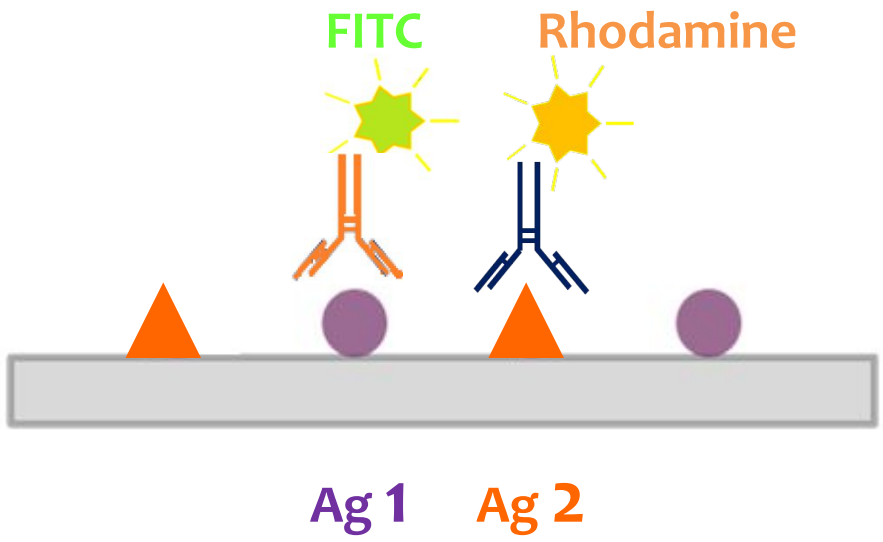


Avantages:

•Plus grande sensibilité que la méthode directe (4 à 10 fois supérieure).

I-2- méthodes de l'Immunofluorescence

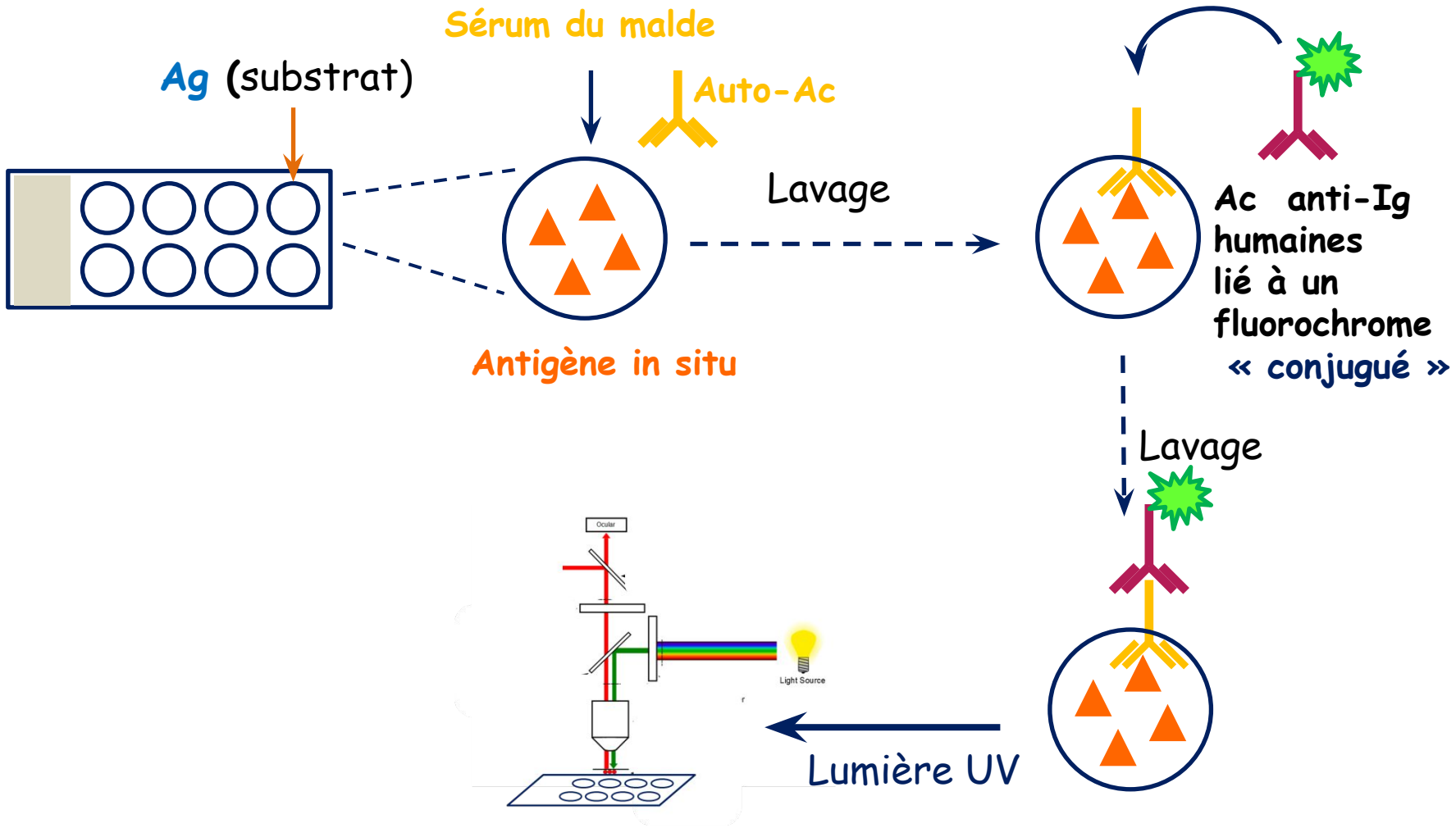
Réactions double marquage :



Utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents dans la même réaction;
Simultanément ou successivement .

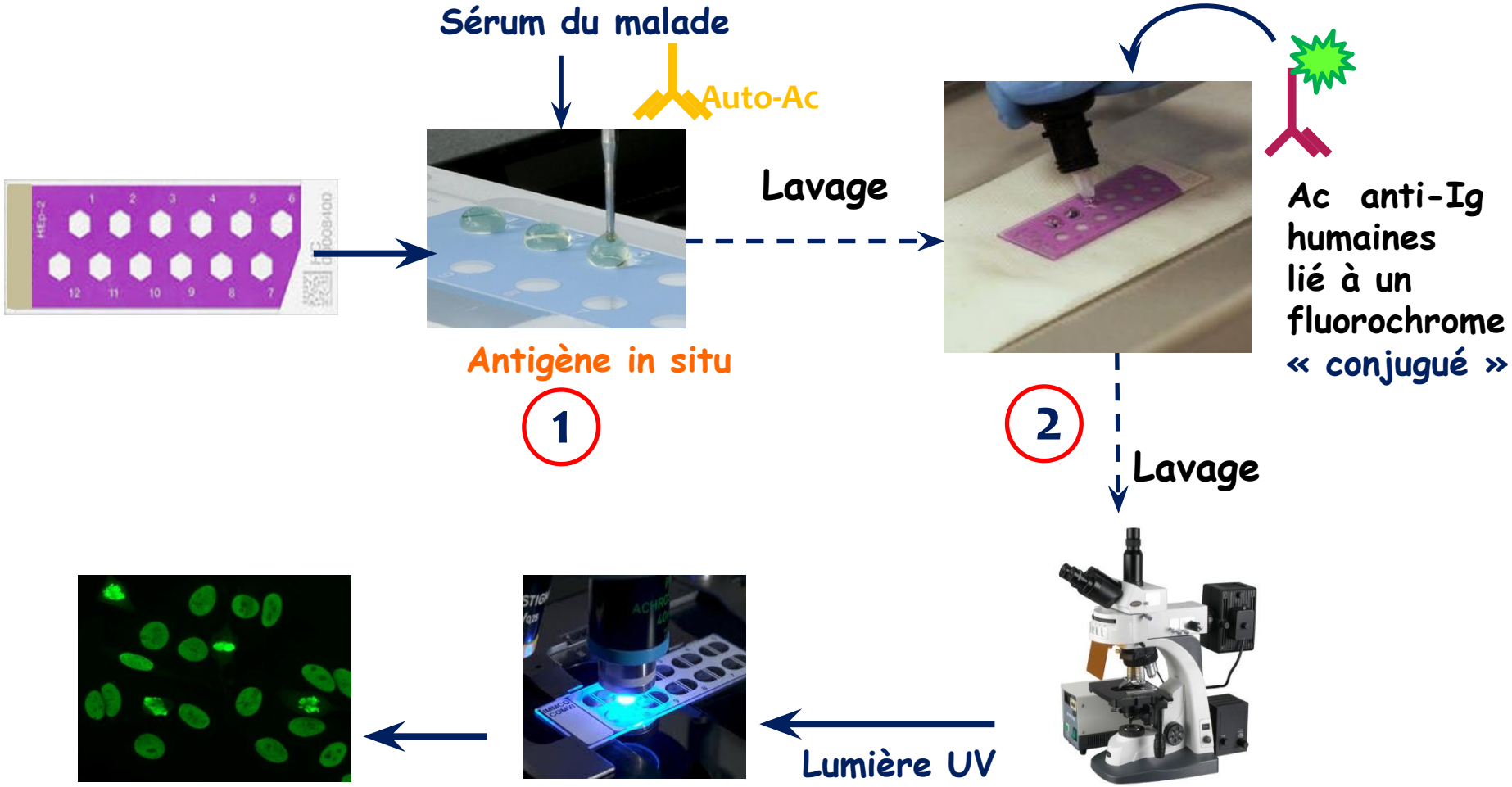
I-3- application de l'Immunofluorescence

I-3-1 Auto immunité

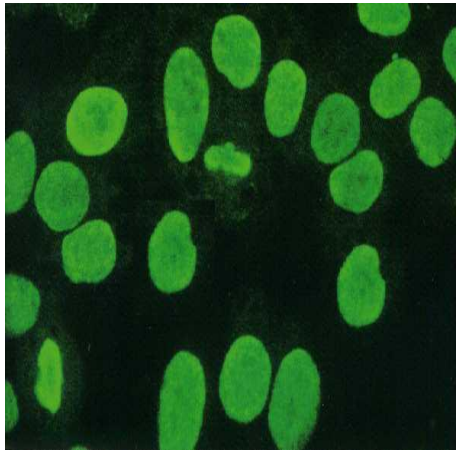


I-3- application de l'Immunofluorescence

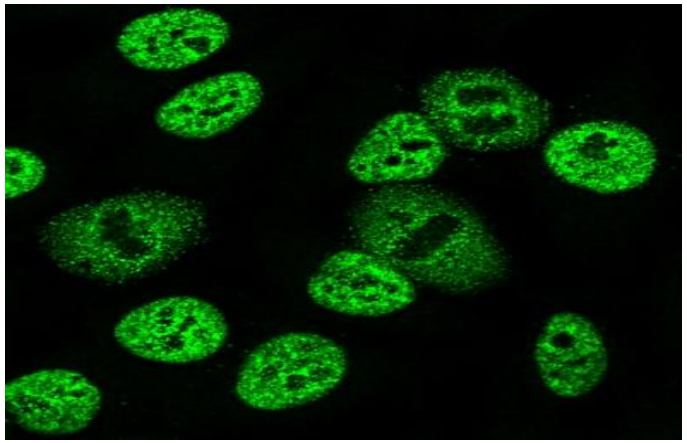
En pratique : Détection des AAN sur cellules HEp2



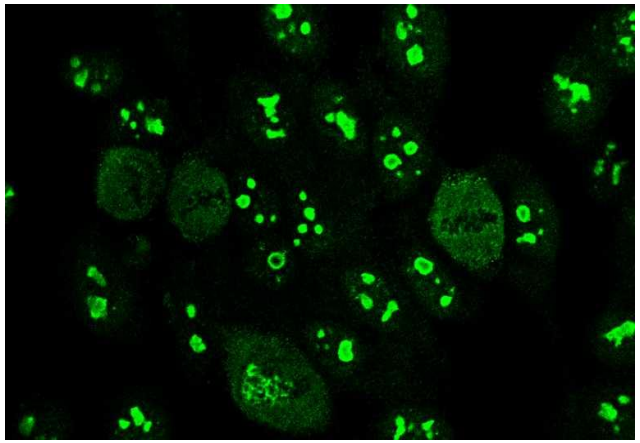
I-3- application de l'Immunofluorescence



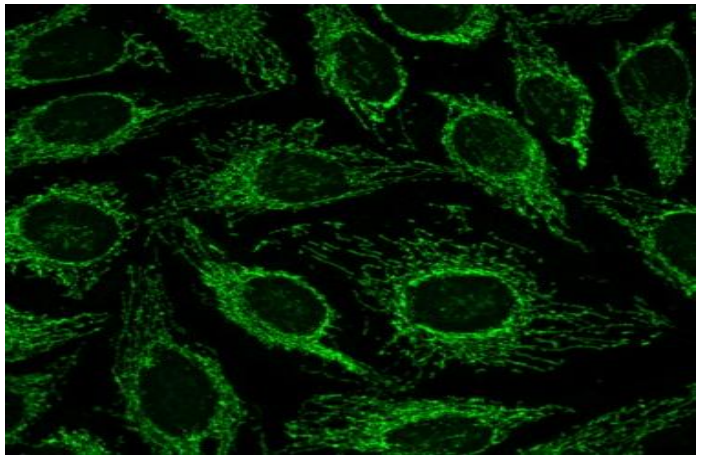
Homogène



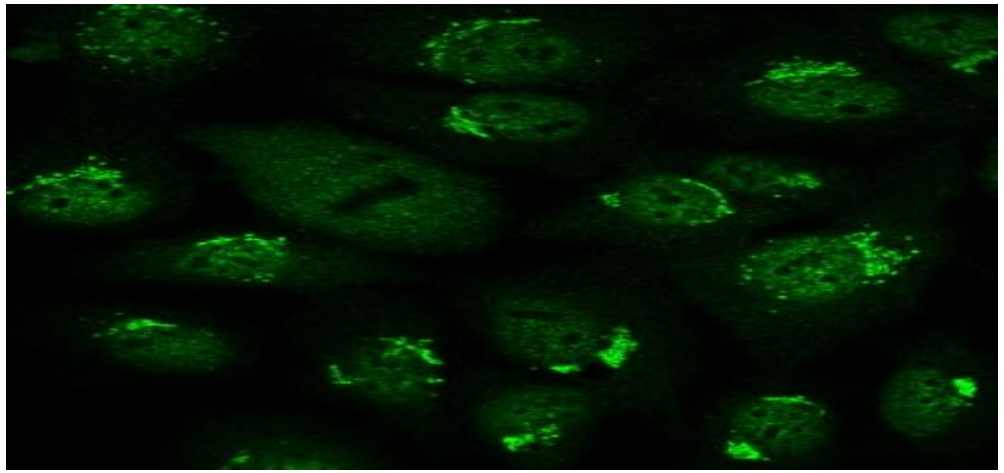
Mouchète



Nucléolaire



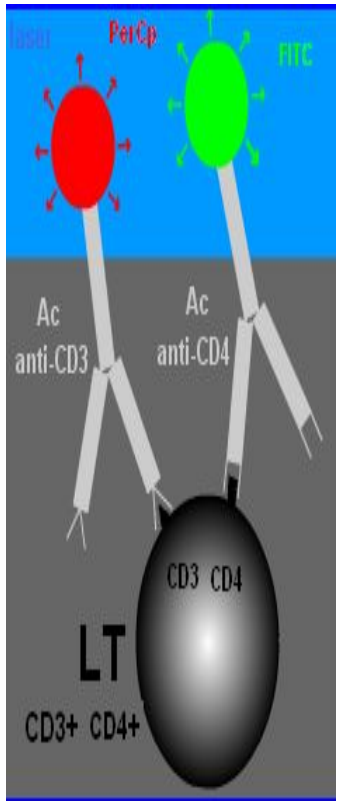
Anti mitochondrie

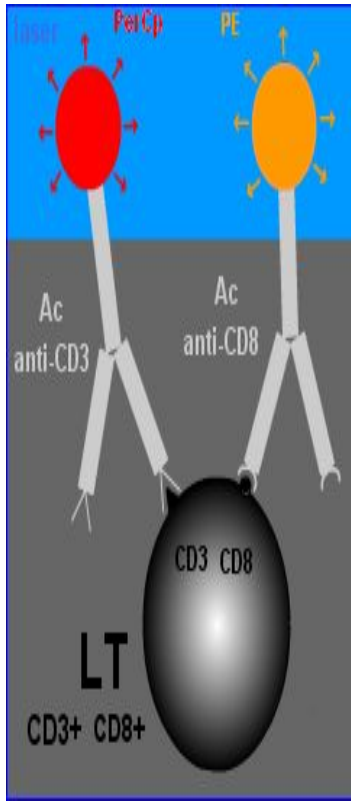


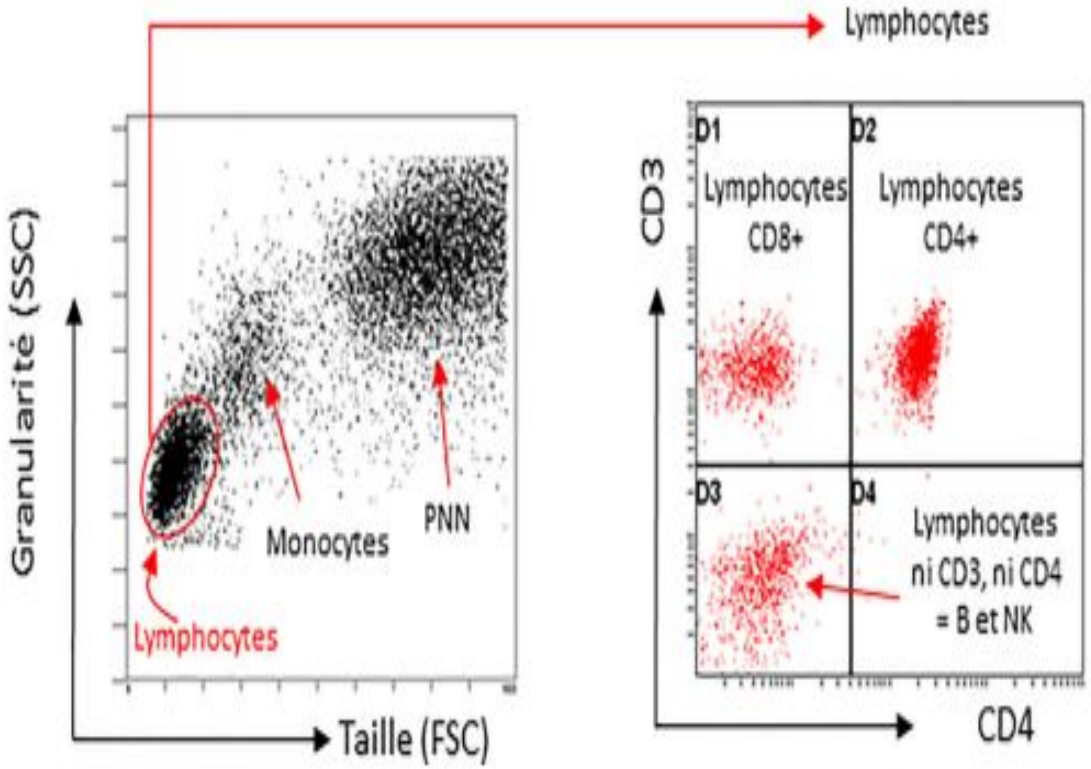
Anti appareil de Golgi

I-3- application de l'Immunofluorescence

I-3-2 En immunologie cellulaire







Immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie en flux

II-Méthodes immuno-enzymatiques

- Méthodes pratiques et simples qui ont remplacé les radio immunologiques

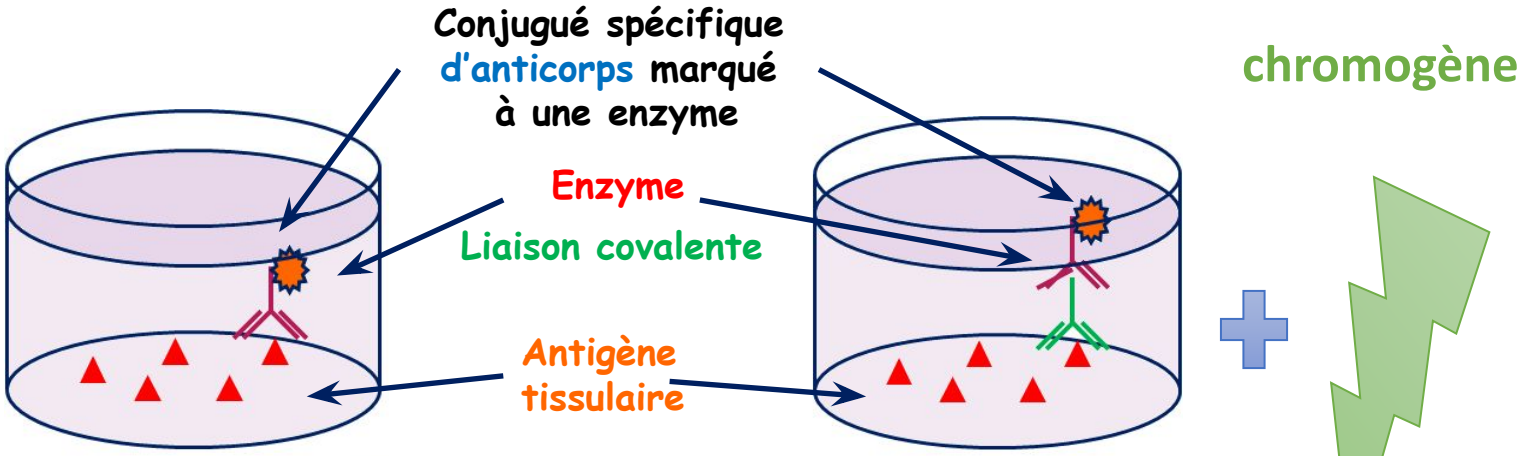
- on mesure l'activité enzymatique grâce à une réaction colorée ,à partir d'un substrat incolore initialement « chromogène ».

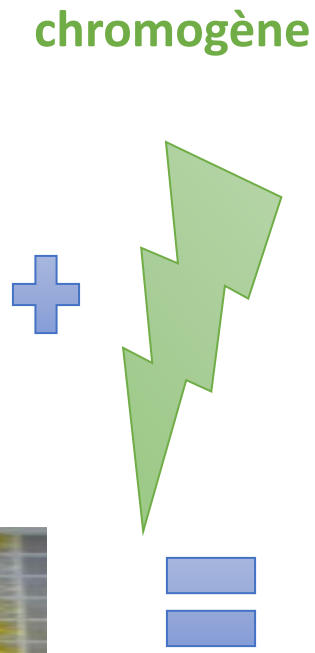
- La spectrophotométrie permet la mesure de la densité optique DO du signal coloré qui est corrélée avec la quantité de la molécule mesurée.

- Il existe plusieurs variantes ; directe ,indirecte, en sandwich, par compétition.et immunotransfert

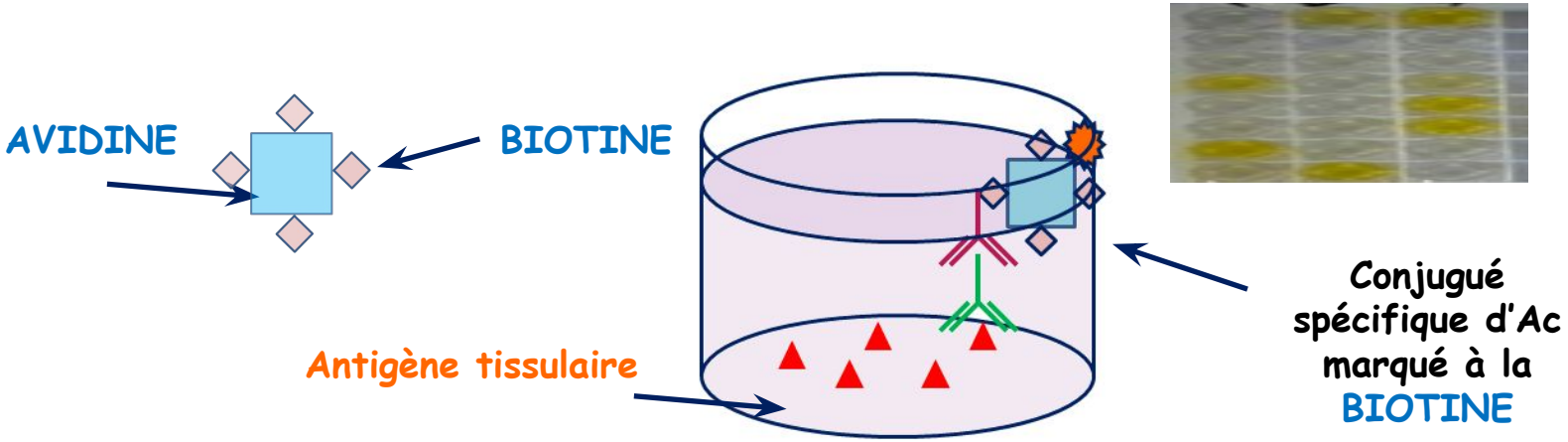
II-Méthodes immuno-enzymatiques

Les différents types de conjugués



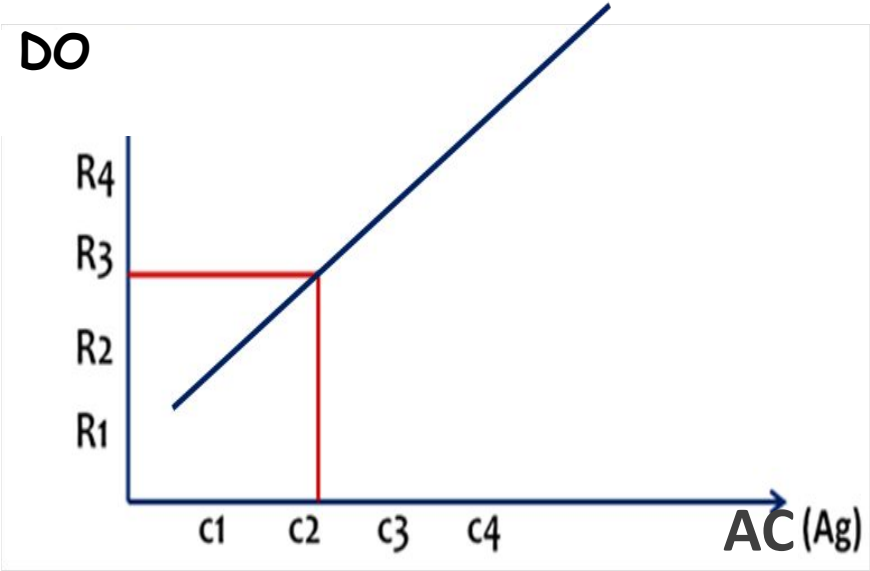


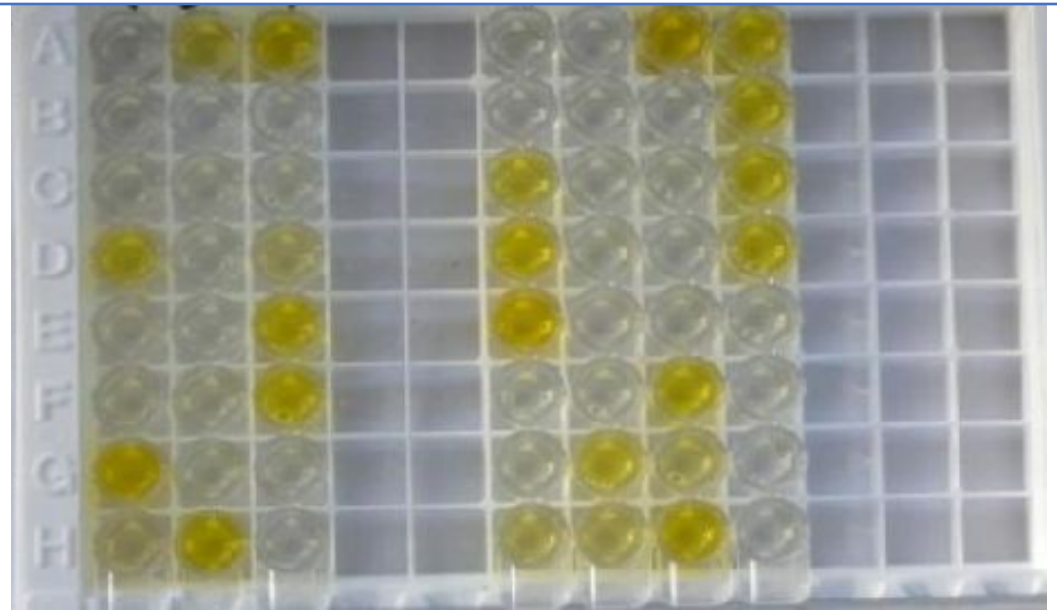
a.. CONJUGUE SIMPLE : ANTICORPS - ENZYME



b. CONJUGUE ASSOCIANT LE COUPLE AVIDINE-BIOTIN

II-Méthodes immuno-enzymatiques





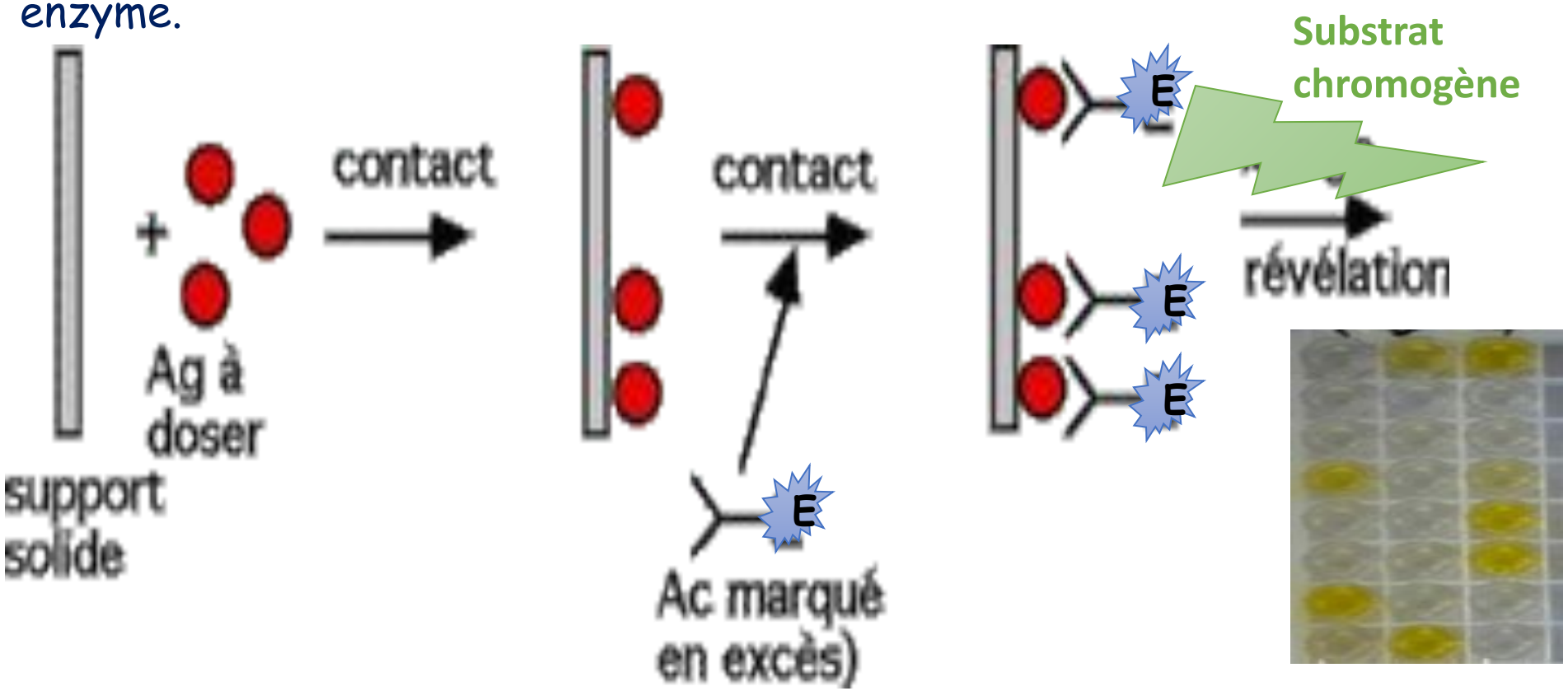
- La révélation consiste à mesurer l'activité catalytique de l'enzyme par **spectrophotométrie**.

- Calcul : Le principe général consiste à établir une courbe d'étalonnage.

II-Méthodes immuno-enzymatiques

II-1 ELISA directe; Exp ; Immuno histochimie

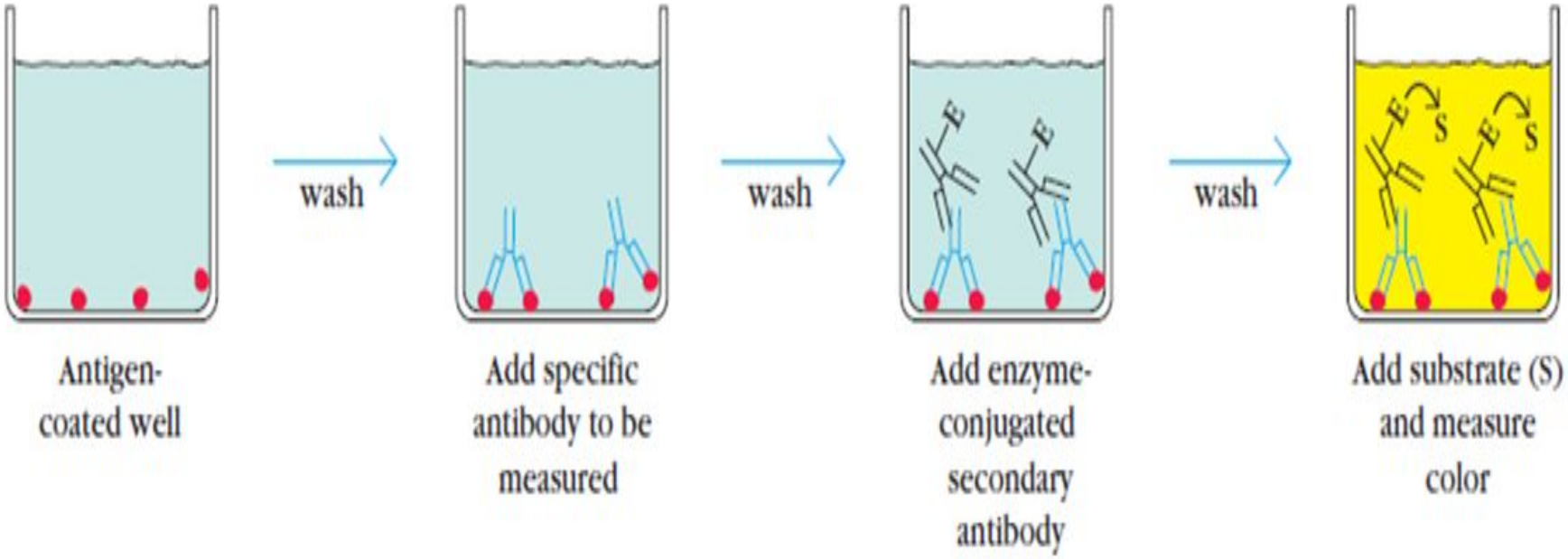
Il est possible de fixer la totalité de l'antigène présent dans l'échantillon à doser sur la paroi du support, puis de révéler cet Ag par l'Ac marqué à une enzyme.



II-Méthodes immuno-enzymatiques

II-2-ELISA indirecte: dosage des Ac :

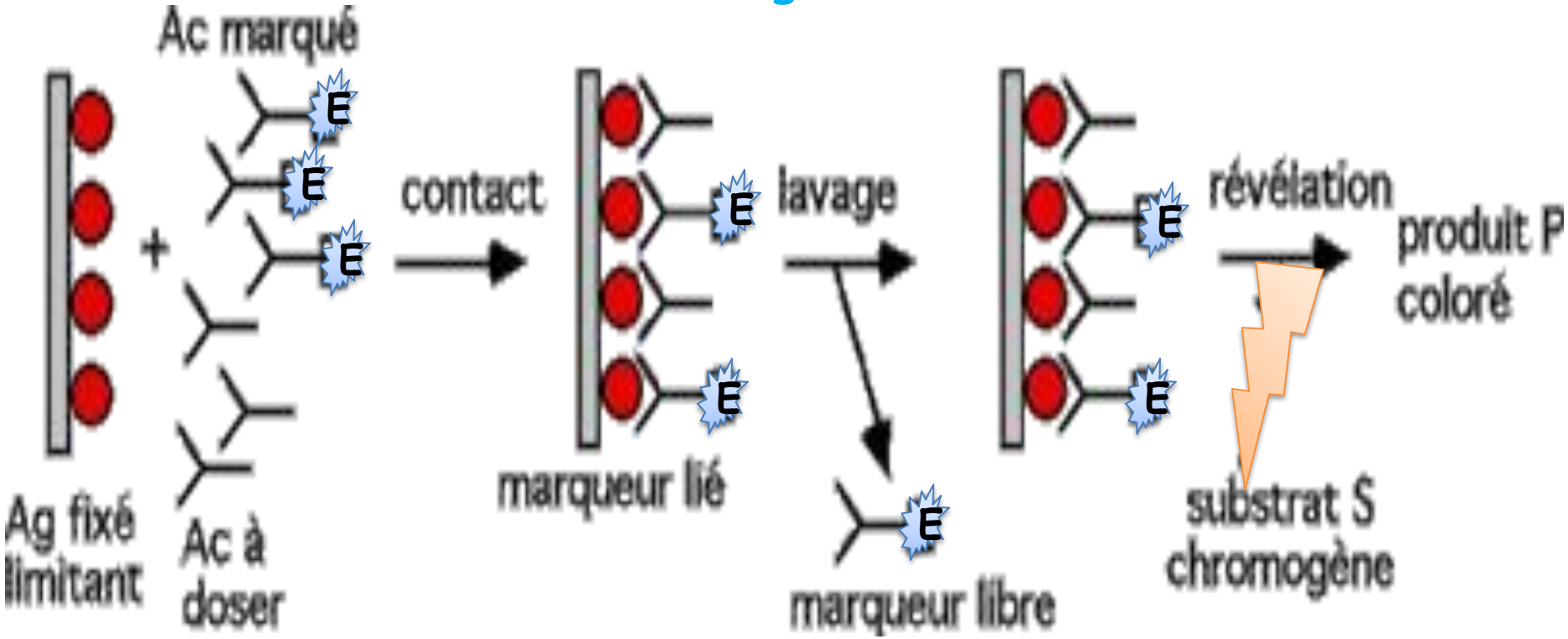
C'est la technique la plus fréquemment utilisée en pratique.
le conjugué se fixe à l'Ac à doser.



II-Méthodes immuno-enzymatiques

II-2-ELISA par compétition:

1-Dosage des Ac



La concentration de la molécule à doser est **inversement proportionnelle** à l'intensité du signal mesuré.

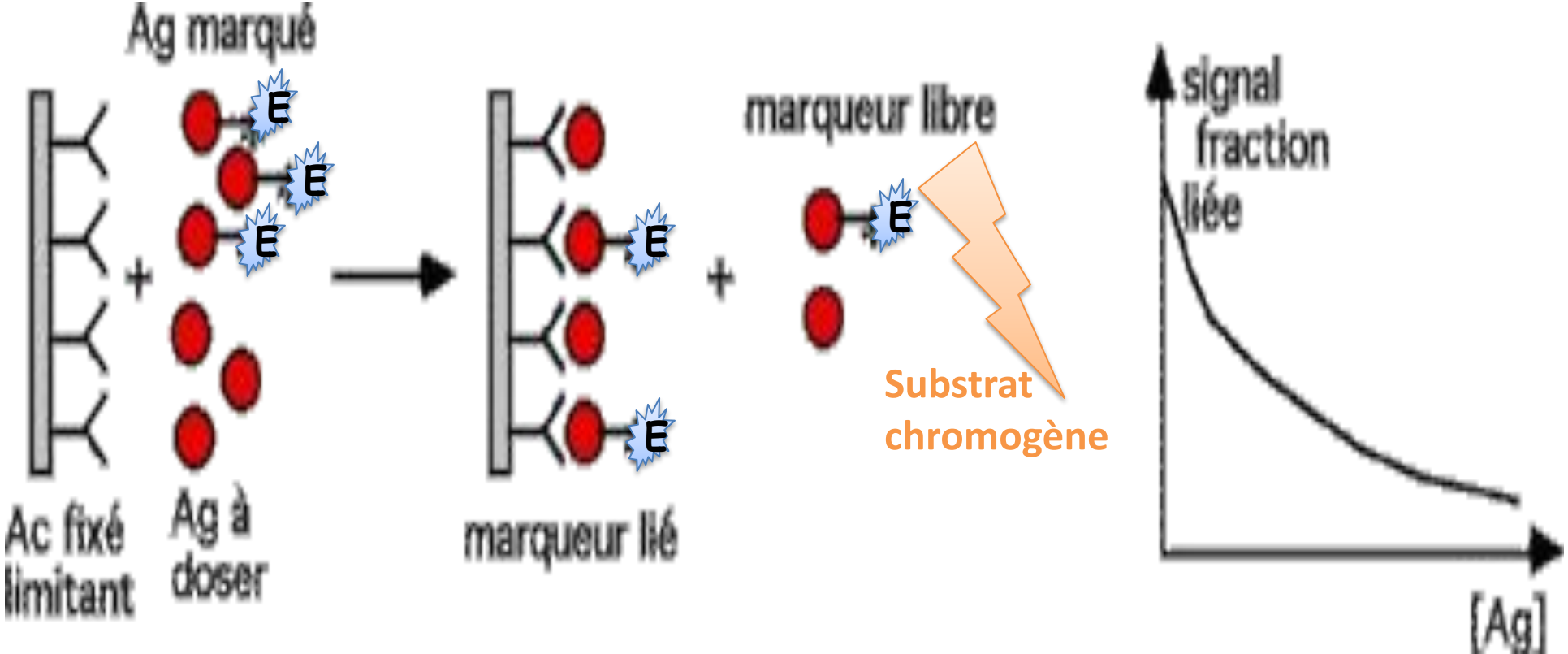
.

II-Méthodes immuno-enzymatiques

II-3-ELISA par compétition:

2-Dosage des Ag

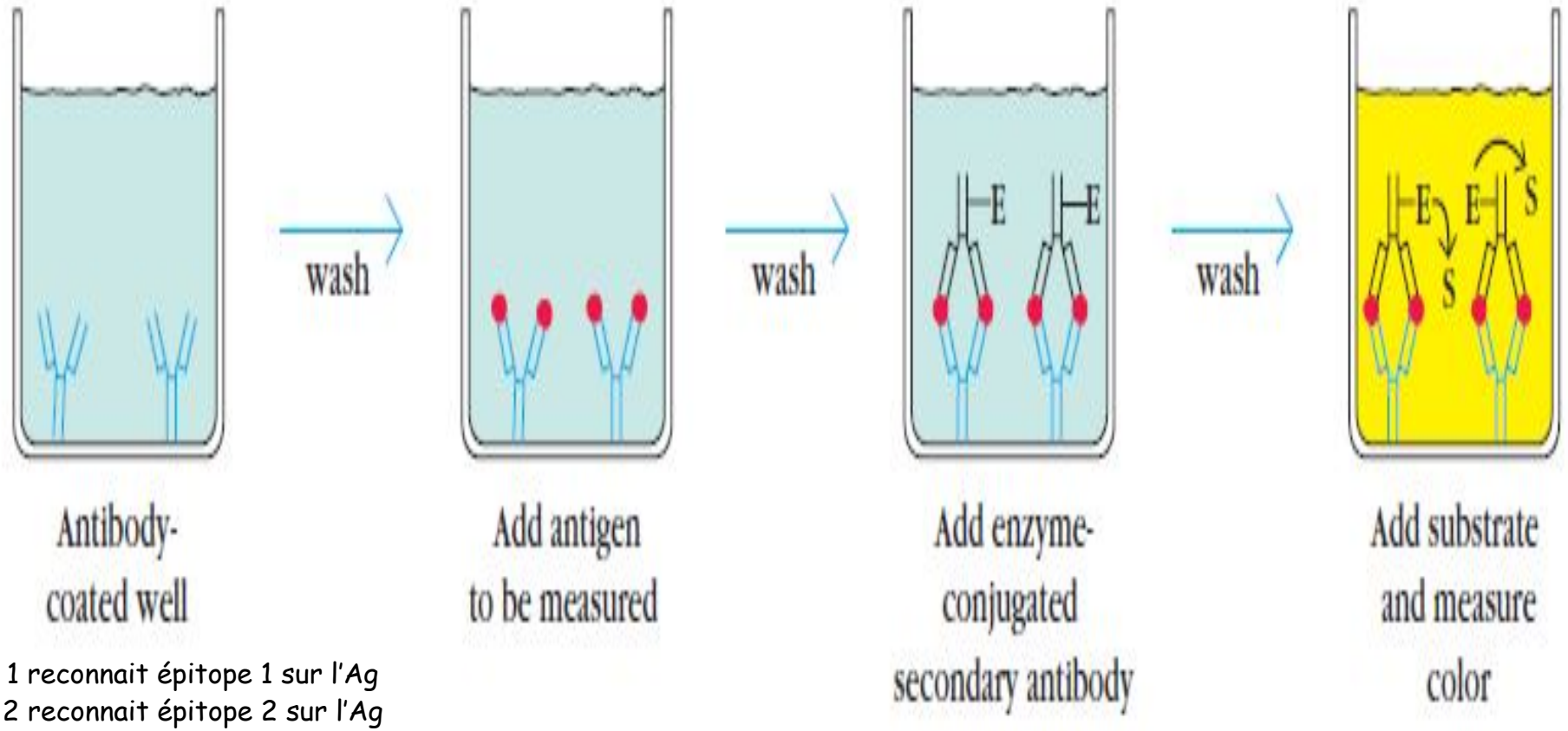
Compétition entre l'Ag marqué et l'Ag non marqué vis-à-vis de <u>sites limités d'Ac</u>:



II-Méthodes immuno-enzymatiques

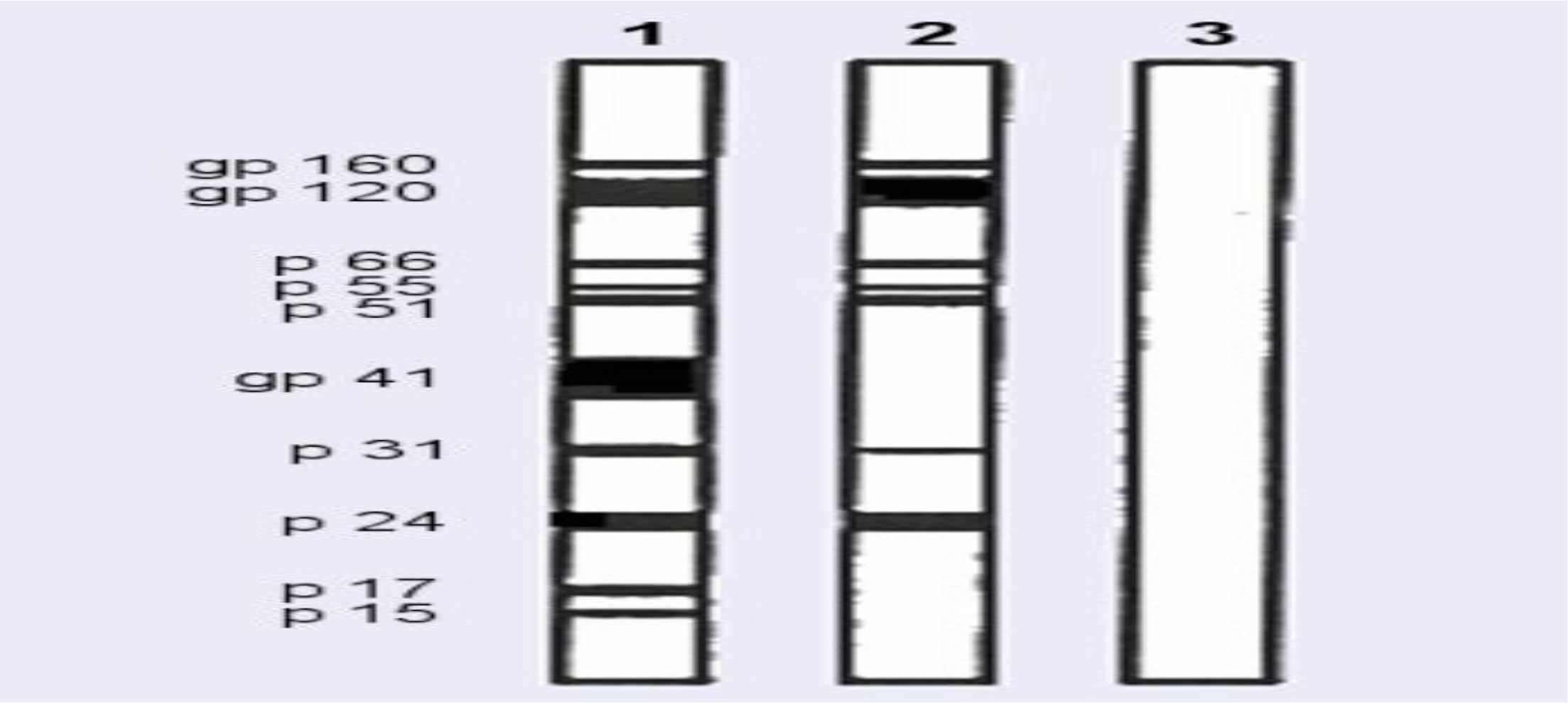
II-4- ELISA sandwich:

La Do est directement proportionnel à la quantité d'Ag mesuré



- Ac 1 reconnait épitope 1 sur l'Ag
- Ac 2 reconnait épitope 2 sur l'Ag

II-5-Methodes immunoenzymatiques qualitatives « immunotransfert »



TEMOIN POSITIF MALADE témoin négatif

ENZYMO-IMMUNOASSAY EIA

ELISA direct

- Peu d'étapes donc : plus rapide et risque d'erreur diminué.

ELISA indirect

- Sensibilité augmentée car plus d'un conjugué peut se fixer par Ac.
- Flexible : même conjugué pour plusieurs Ac primaires.
- Peu couteuse.

ELISA Sandwich

- Spécificité augmentée car deux anticorps par Ag.

ELISA compétition

Flexibilité maximale (direct, indirect, sandwich)

III-Méthodes immuno-radiologiques

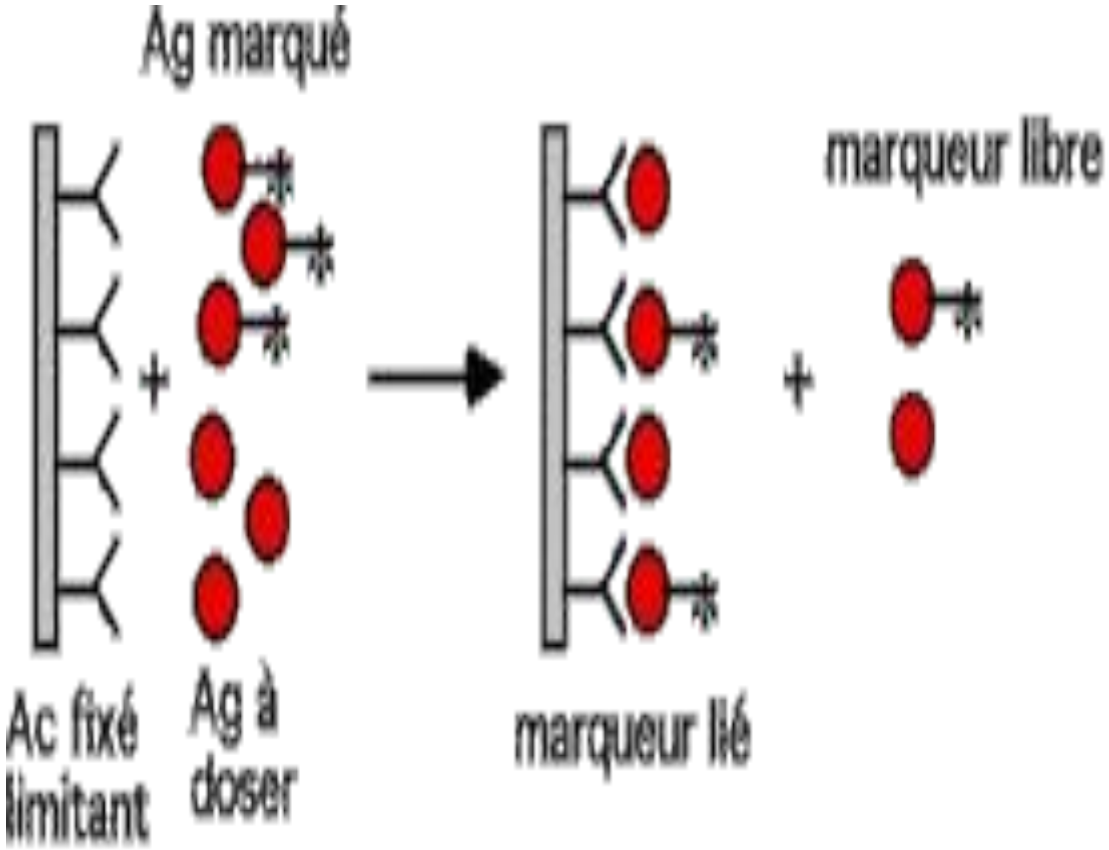
- Radio-isotopes sont des atomes dont les noyaux sont énergétiquement instable ,qui émets par un processus spontané l'energie excédentaire sous forme de rayonnement ionisants.

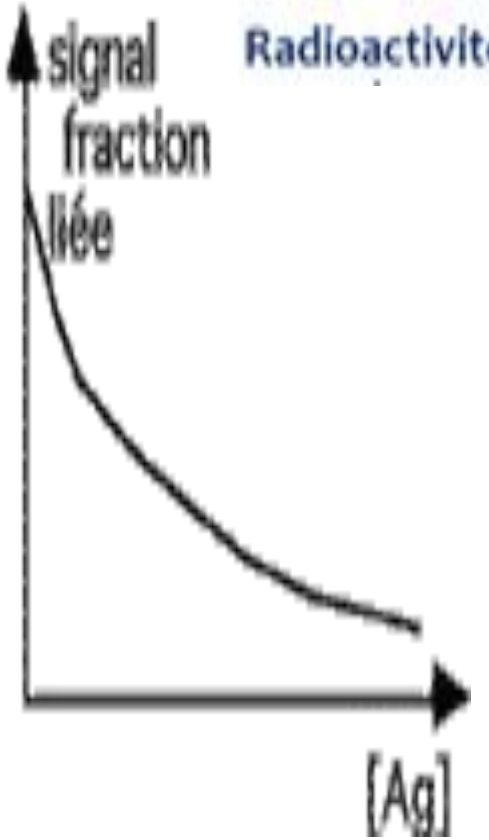
- Ultrasensibles; dosage des hormones, medicaments,marqueurs tumoraux……

- Radioisotope; iode 125 et la thymidine tritiée.

III-Méthodes immuno-radiologiques

1-RIA (Radio Immuno Assay) : Méodthe par compétition.





Radioactivité

III-Méthodes immuno-radiologiques

- **Avantages :**

✔ Sensibilité très élevée
✔ l'isotope permet un marquage facile.

✔ signal direct

✔ Signal spontané: ne faisant pas intervenir une source d'énergie externe.

Inconvénients:

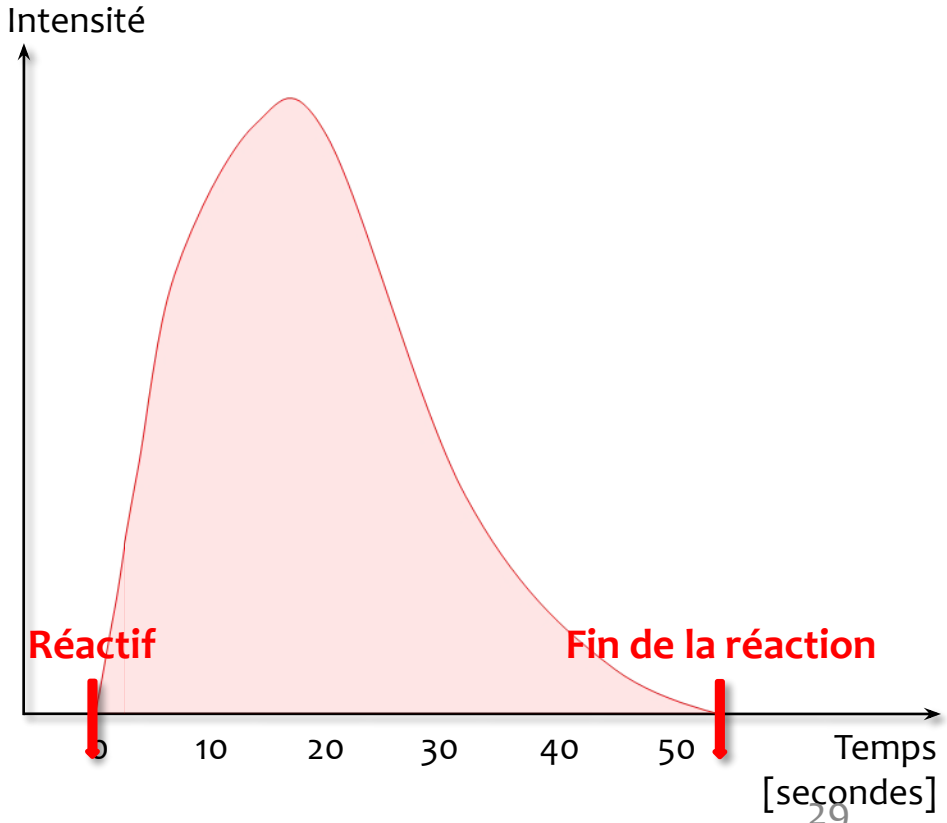
✔ les précautions et surveillances nécessaires lors de la manipulation.
✔ le temps de mesure du signal isotopique est long.
✔ gestion des déchets radio actifs.

IV-Méthodes chimiluminiscentes

- L'excitation des molécules est due à un apport d'énergie chimique
- la chimiluminescence se caractérise seulement par un spectre d'émission.
- L'émission de lumière commence, immédiatement, après le début de la réaction chimique.

L'intensité d'émission:

- Augmente, rapidement;
- Passe par un maximum;
- Pour, ensuite, diminuer et s'annuler en quelques secondes.

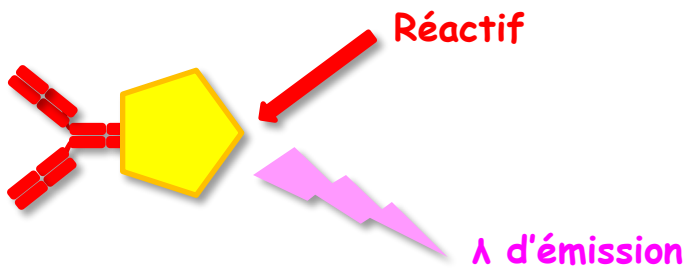


III-Méthodes chimiluminiscentes

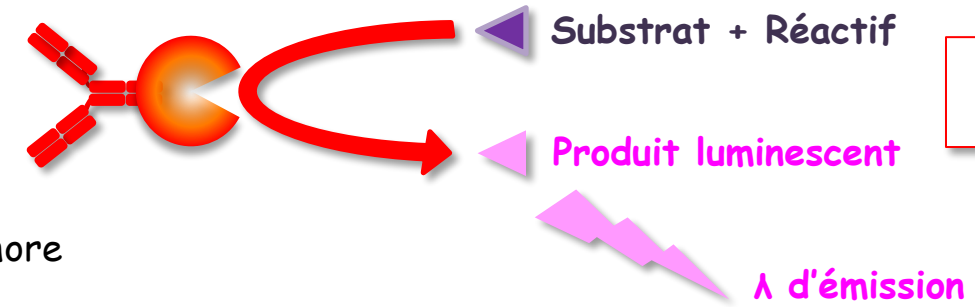
Le signal luminescent

L'émission lumineuse peut provenir, soit :

- Du marqueur **(Luminophore)** ;
- D'une molécule transformée par **une enzyme** spécifique utilisée comme marqueur.



Émission directe par le marqueur



Émission indirecte grâce à un marqueur enzymatique

Luminophore

Enzyme

III-Méthodes chimiluminiscentees

Luminophore

Les plus utilisés sont:

- LUMINOL
- ISOLUMINOL
- Dérivés substitués de l'ISOLUMINOL

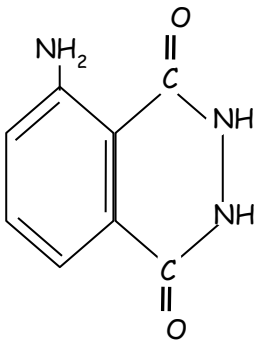
La bioluminiscene

IV-Méthodes chimiluminiscentes

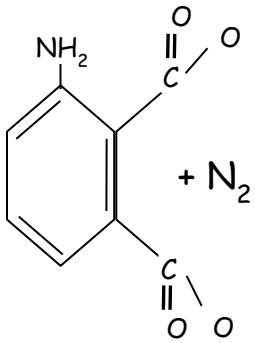
LUMINOL

Par des réactions d'oxydation en présence d'H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) et d'un catalyseur

- Ces molécules sont transformées en espèces excitées qui se désexcitent, ensuite, avec émission de photons.



$+ 2\ H_2O_2 + OH^-$ $\xrightarrow{\text{Peroxydase}}$



$+ N_2 + 3\ H_2O$

Ion Aminophtalate (singulet excité)

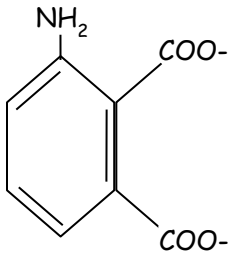
Luminol

3-Aminophthalhydrazide

hv

(λ max = 430 nm)

Lumière BLEUE



Ion Aminophtalate (singulet fondamental)

IV-Méthodes chimiluminiscentes

Avantages :

✔ La chimiluminescence étant, seulement, caractérisée par un spectre d'émission **(pas de lumière d'excitation)** n'est, donc, pas perturbée par la lumière parasite.

✔ **Une grande spécificité du signal**

✔ La durée d'émission est variable d'une seconde à quelques dizaines de secondes permettant une lecture rapide.

Incoveignant :

✔ **Un problème de la reproductibilité du signal**

✔La lecture est rapide mais unique car l'émission lumineuse est fugace et d'intensité maximale fluctuante (variable au cours de la réaction chimique).

✔ lecture à l'aide d'un **automate** qui contrôlerait :

✔ - l'injection du réactif
✔ - et la chronologie de mesure de la lumière émise.

conclusion

	traceur	avantages	inconvénients
Enzymatique	- Peroxydase - Phosphatase alcaline	-simplicité du marquage -pas d'appareillage spécialisé - sensibilité	- très dépendant des conditions opératoires - faible dynamique du signal
Radioactif	- Iode 123 - Thymidine tritiée	-faible encombrement stérique -signal direct et spontané -précision -sensibilité	- législation - gestion des risques (commandes et élimination des déchets)
Fluorescent	- Chélates de Lanthanide (Europium)	-facilité du marquage -stabilité du traceur (mesure répétée plusieurs fois en qlq secondes) -précision -sensibilité -mesure rapide	interférences - faible dynamique du signal - appareillage spécialisé
Luminescent	- Luminol - Dioxétanes	-stabilité du traceur -signal très spécifique -acquisition rapide et très grande dynamique du signal -sensibilité	-signal fugace - appareillage spécialisé