

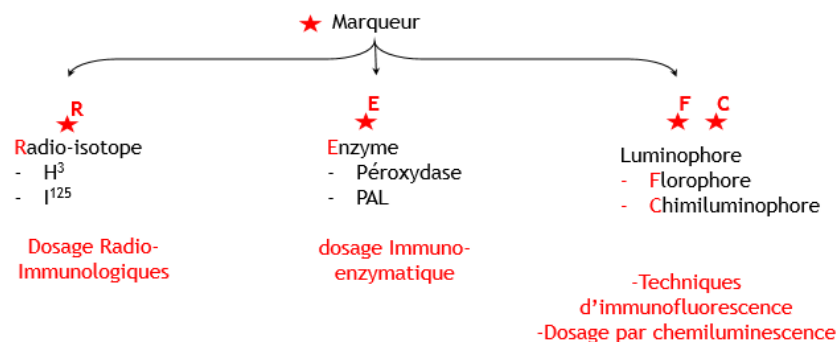


Techniques immunologiques utilisant un marqueur

Définitions

Immunodosage utilisant un marqueur

Techniques immunologiques **quantitatives** de dosage, mettant en jeu la réaction antigène-anticorps et faisant appel à un marqueur.

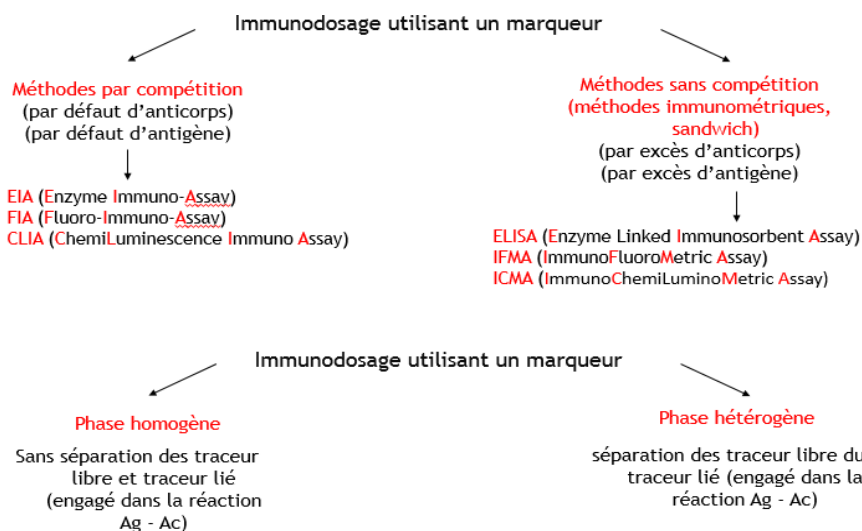


- **Traceur** : anticorps ou antigène marqué
- **Analyte** : substance à doser (antigène ou un anticorps)

Critères de qualité d'un immunodosage

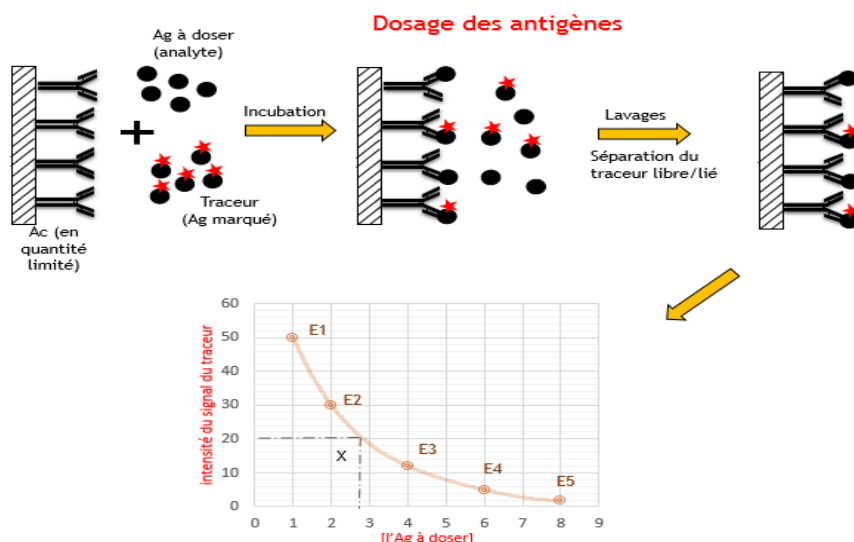
- Sensibilité- détectabilité : capacité du dosage à détecter des concentrations très faibles de l'analyte à doser.
- Justesse, exactitude : l'écart entre une valeur mesurée et une valeur vraie d'un analyte.
- Fidélité/précision : la variation des valeurs obtenues lors de mesures répétées effectuées dans des conditions expérimentales bien déterminées.
- Spécificité : capacité à mesurer sélectivement un analyte.

Différents méthodes en immunodosages utilisant un marqueur

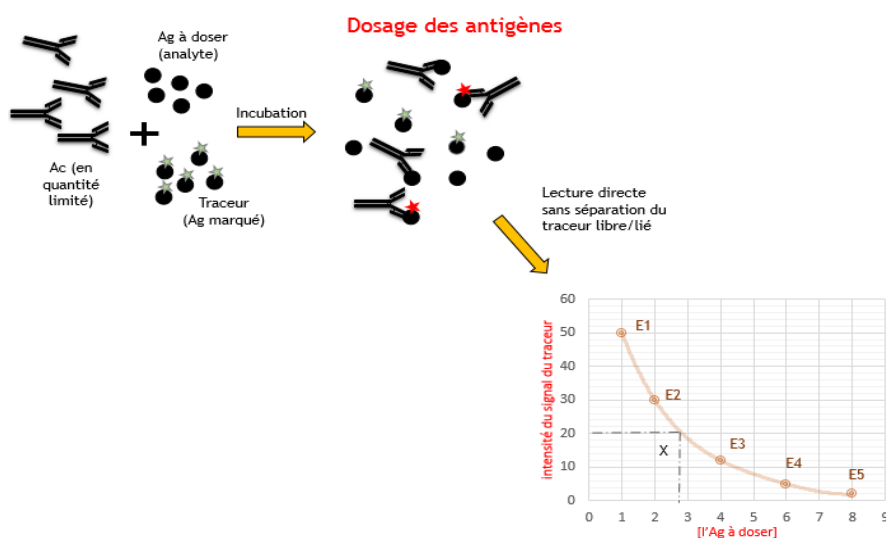


Principes des méthodes d'immunodosages avec marqueurs

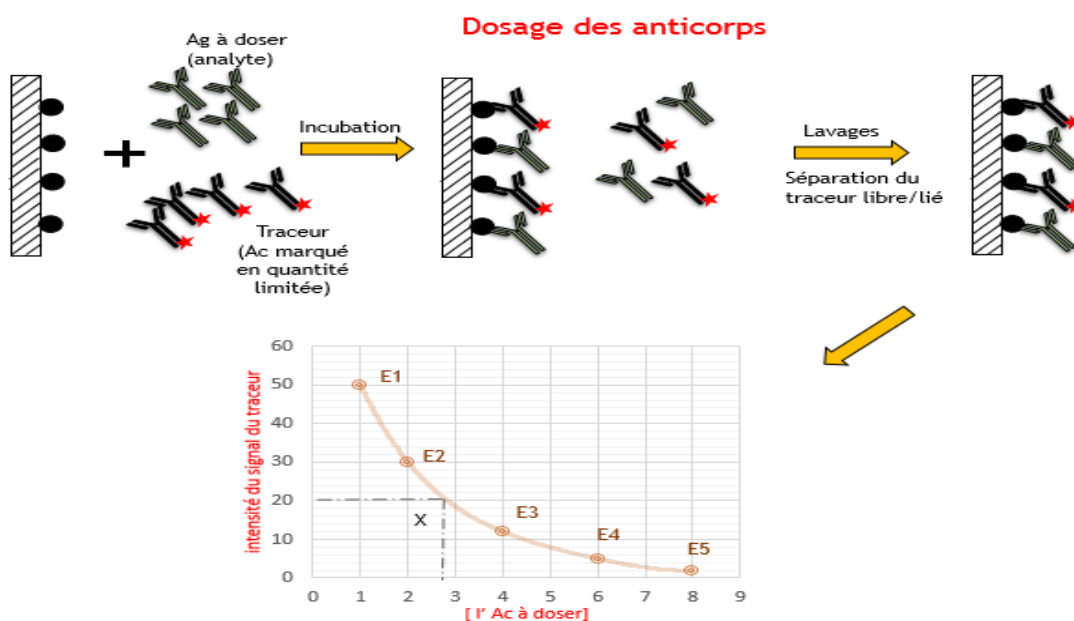
Méthodes par compétition en phase hétérogène (EIA, FIA, CLIA)

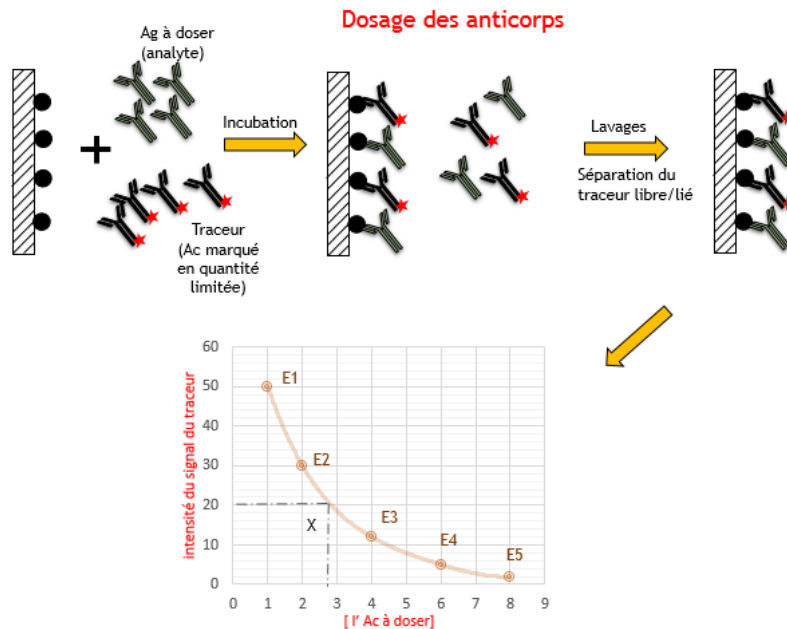


Méthodes par compétition en phase homogène (EIA, FIA, CLIA)



Méthodes par compétition en phase hétérogène (EIA, FIA, CLIA)



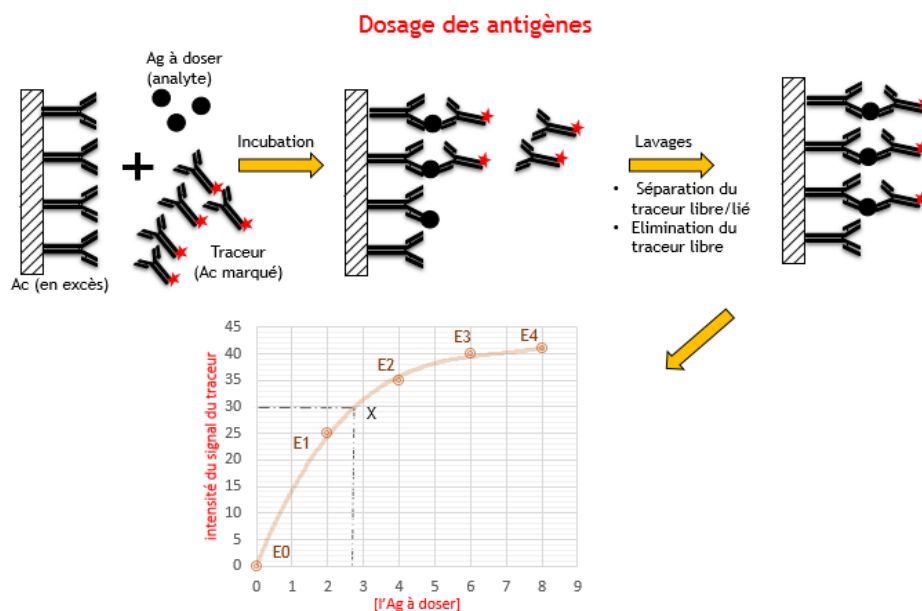


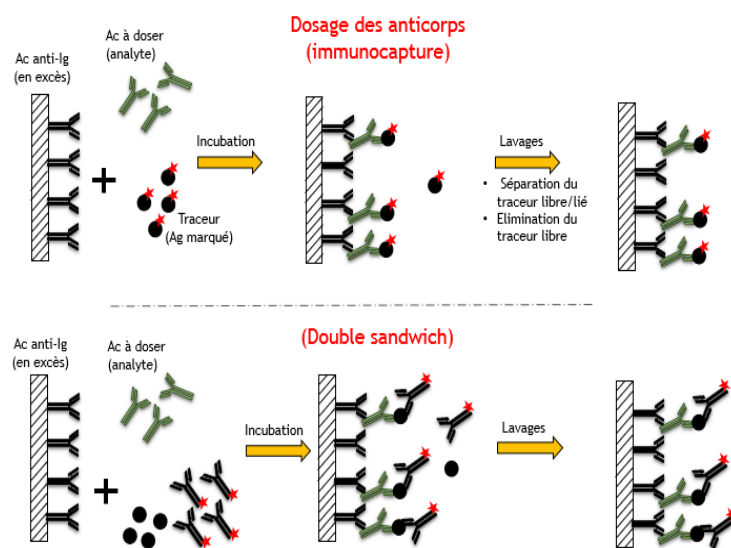
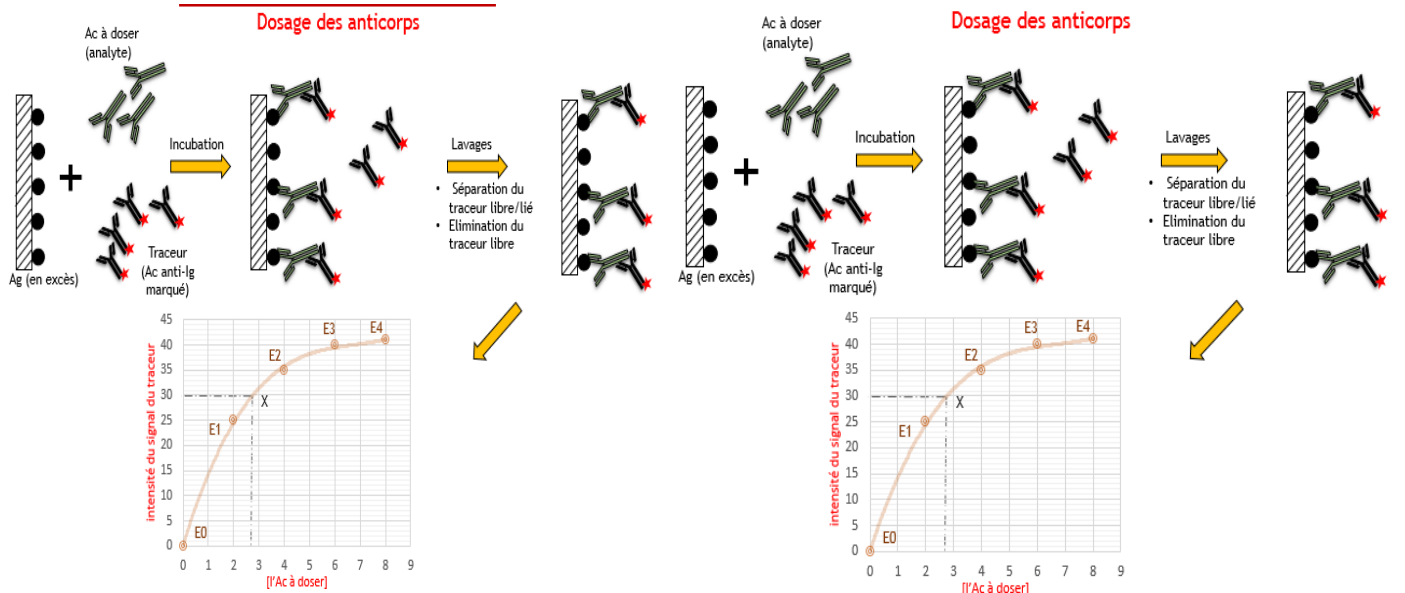
Méthodes par compétition (EIA, FIA, CLIA)

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> Tous les antigènes peuvent être doser Les seules méthodes possibles pour le dosage des haptènes (un seul épitope) 	<ul style="list-style-type: none"> Manque de spécificité (l'Ag et ses métabolites s'il y a un épitope en commun) La sensibilité dépend des l'affinité des anticorps utilisés pour le dosage de l'Ag En cas de dosage des Ac, la classe de l'Ac n'est pas déterminée

Méthodes sans compétition en phase hétérogène (ELISA, IFMA, ICMA)

Méthodes immunométriques, sandwich

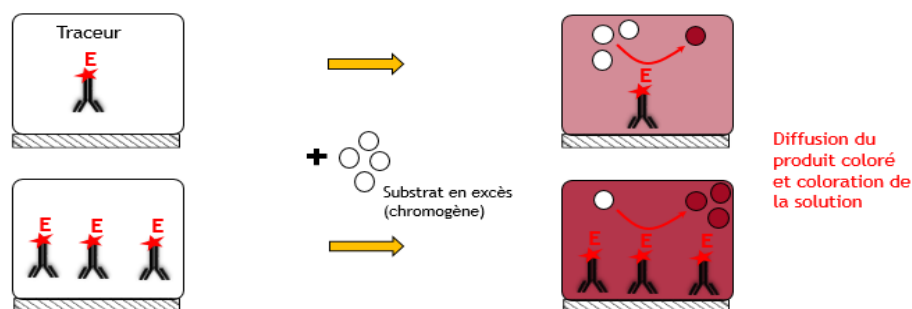




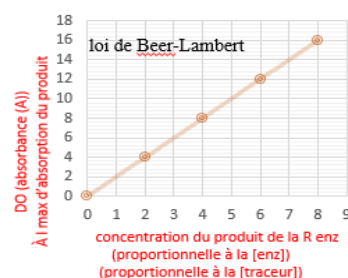
Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> Grande spécificité (l'utilisation de deux anticorps augmente la spécificité) Méthodes plus sensibles La détermination de la classe des Ac est possible lors de leur dosage 	<ul style="list-style-type: none"> Ne sont pas adaptées au dosages des petites molécules (haptène) avec un seul épitope Effet crochet dans les très fortes concentration de l'antigène

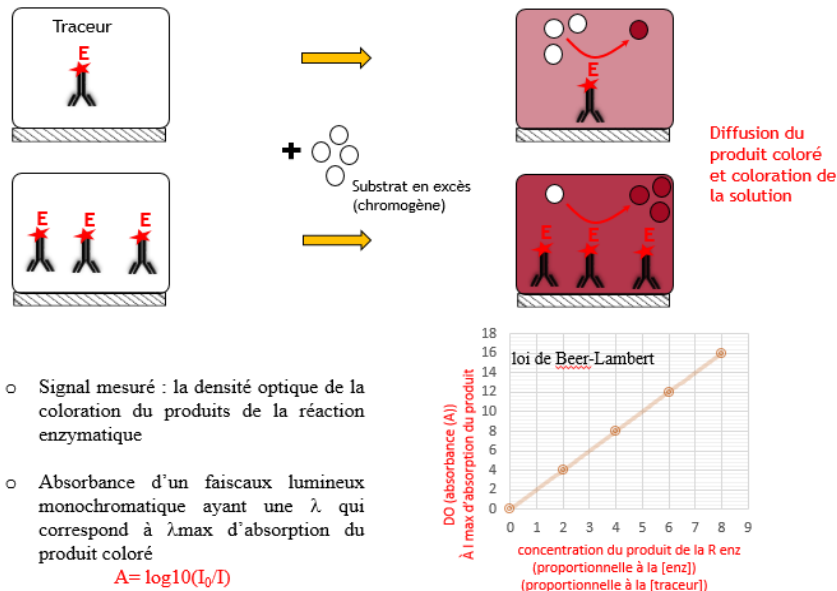
Dosages immunoenzymatiques

Principe générale de l'obtention de signal

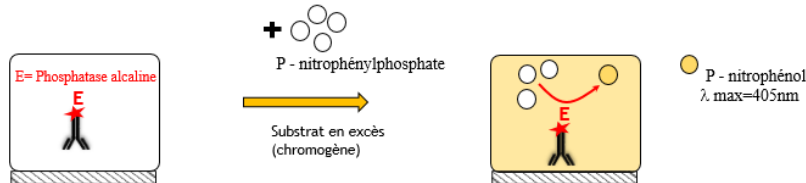


- Signal mesuré : la densité optique de la coloration du produits de la réaction enzymatique
- Absorbance d'un faisceaux lumineux monochromatique ayant une λ qui correspond à λ_{max} d'absorption du produit coloré
 $A = \log_{10}(I_0/I)$

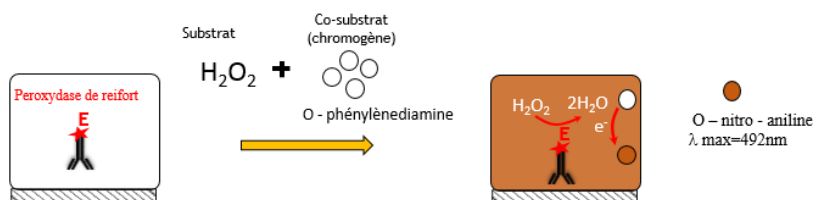




utilisation d'un substrat chromogène



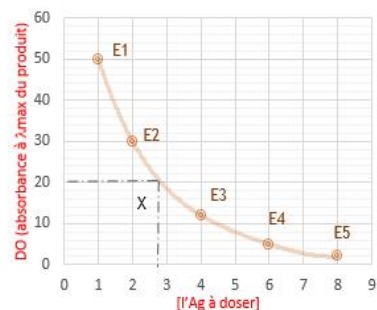
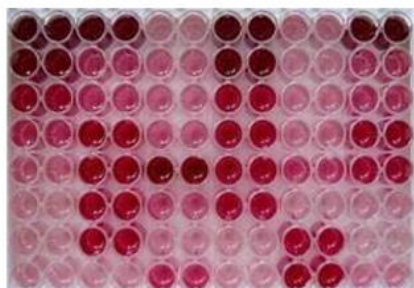
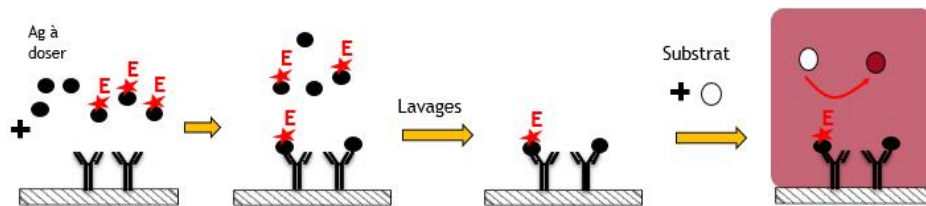
utilisation d'un co - substrat chromogène



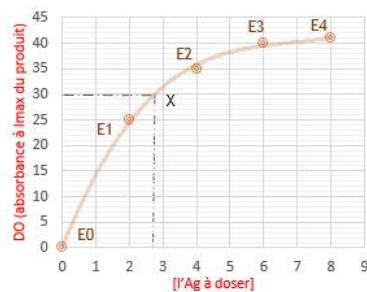
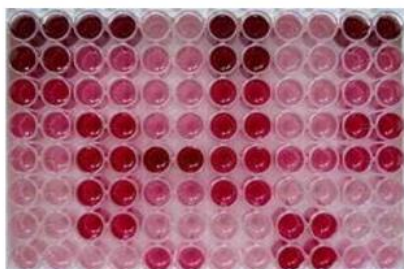
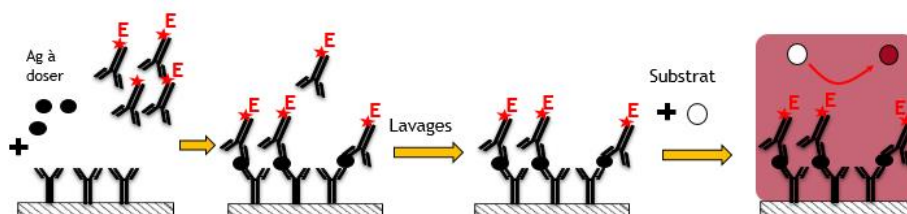
Principales enzymes utilisées comme marqueur

Enzymes	Substrats non chromogènes et substrats chromogènes	Produits absorbants formés (lecture)
peroxydase de raifort (HRP) EC 1. 11. 1. 7 MM = 44 000	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{o - phenylenediamine (OPD)}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{azino-di[ethylbenzothiazoliny] sulfonate] (ABTS)}$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{tetramethylbenzidine (TMB)}$	O - nitroaniline (492 nm)
phosphatase alcaline EC 3.1.3.1 MM = 140 000	P - nitrophenyl-phosphate (PNPP)	P - nitrophenol (405 nm)
β -D- galactosidase EC 3.2.1.23 MM = 540 000	O – nitrophenyl - β -D- galactopyranoside (ONPG)	O - nitrophenol (405 nm)
glucose oxydase EC 1.1.3.4 MM = 186 000	Glucose –glucose oxydase→ H_2O_2 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OPD} \rightarrow \text{HRP} \rightarrow \text{prosuit absorbant}$	O - nitroaniline (492 nm)
glucose-6-phosphate deshydrogenase EC 1.1.1.49 MM = 128 000	Glucose-6-phosphate + NADP^+ ou NAD^+	NADPH, H^+ ou NADH, H^+ (340 nm)

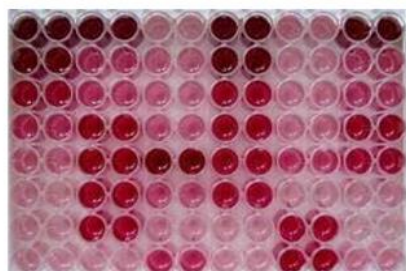
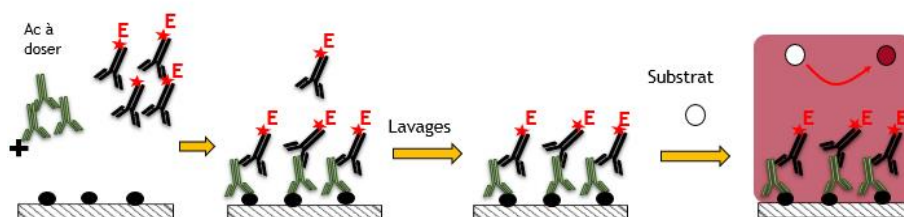
Dosage des antigènes (ELISA compétition)



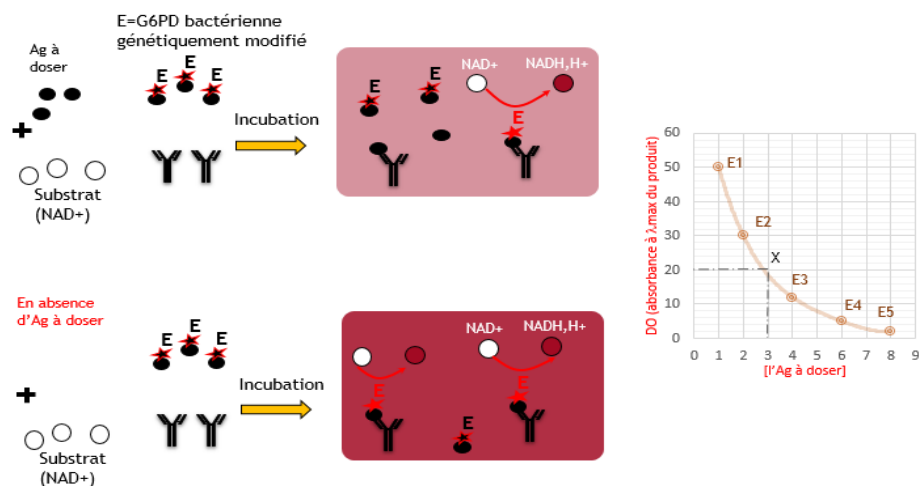
ELISA Sandwich



ELISA indirecte



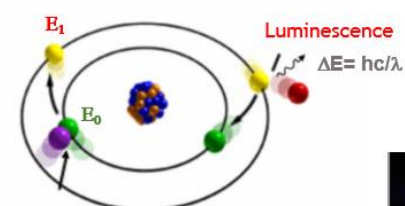
EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)



Avantages et inconvénients des méthodes immunoenzymatiques

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> Leur grande sensibilité Méthodes simple et coût moindre Signal colorimétrique stable pendant des minutes 	<ul style="list-style-type: none"> Dépendance à la réaction enzymatique (temps de réaction enzymatique, température, pH et parfois exposition à la lumière)

Principe générale de l'obtention de signal



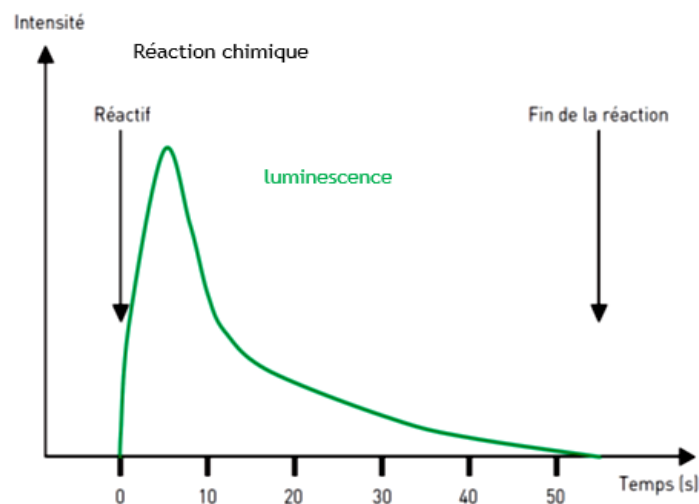
Excitation

Excitation par:

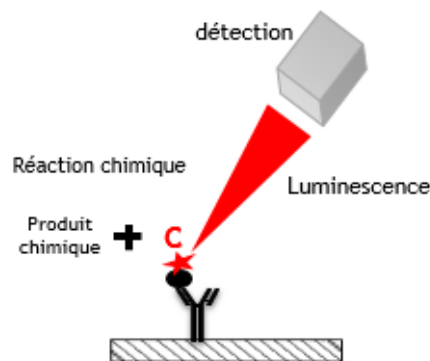
Photons	→	Fluorescence
Chimique	→	Chimiluminescence
Radioactif	→	Radioluminescence



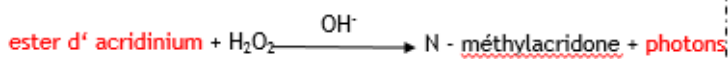
La chimiluminescence



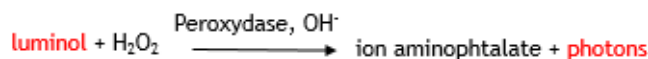
Signal directe



1) Les esters d'acridinium

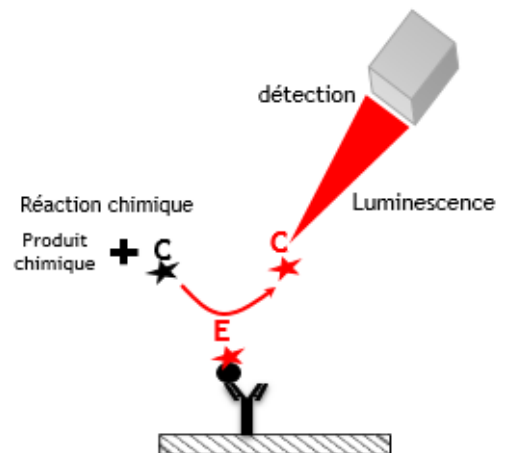


2) Les phthalhydrazides

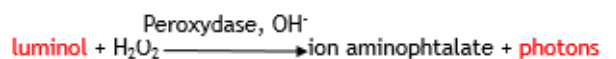


- Méthodes avec compétition : **CLIA** (ChemiLuminescenceImmunoAssay)
- Méthodes chimiluminométrique (sans compétition, sandwich) : **ICMA** (ImmunoChemiLuminometric Assay).

Signal indirecte



Les phthalhydrazides



- Méthodes compétitives : **CLEIA** (ChemiLuminescent Enzyme ImmunoAssay).
- Méthodes non compétitives (immunométriques, sandwich) : **ICEMA** (ImmunoChemiluminoEnzymoMetric Assay).

Avantages et inconvénients des marqueurs chimiluminescents

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> • stabilité du marqueur • signal intense • pas de lumière parasite (signal très spécifique) • acquisition rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • appareillage spécialisé • signal fugace (imprécision de la mesure)

Techniques d'immunofluorescence

1. Phénomène de fluorescence

1944: Albert Coons

→ les anticorps pouvaient être marqués par des molécules qui ont la propriété d'être fluorescentes, appelées Fluorophores ou Fluorochromes.

→ Elles absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde (excitation) et émettent de la lumière d'une autre longueur d'onde (émission).

→ La fluorescence est un phénomène physique caractérisé par l'émission d'une lumière de plus faible énergie que celle absorbée.

→ La molécule excitée retourne à son état de repos, en passant par un état intermédiaire.

Chaque corps fluorescent possède 3 caractéristiques:

- Spectre d'excitation:

Seuls certains rayonnements de quantum d'énergie précis sont absorbés.

Etat de base

Etat excité

Energie

- Spectre d'émission:

Le retour de l'état intermédiaire à l'état de base s'accompagne de l'émission de photon de lumière particulière pour chaque corps fluorescent.

- Rendement quantique:

Le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

2. Fluorochromes:

Deux fluorochromes sont souvent utilisés:

2.1. Dérivés de la fluorescéine:

-Spectre d'absorption comprenant 3 bandes principales:

*A à 490 nm

*B à 320 nm

*C à 280 nm

-Spectre d'émission, situé dans le visible:

* 520 nm donnant une couleur verte.

2.2 Dérivés de la rhodamine:

-Employée surtout dans le double marquage.

-Spectre d'adsorption comportant trois bandes

-Spectre d'émission situé dans le jaune et le rouge lointain (fluorescence rouge orangée).

-En pratique, on utilise le chlorure de l'acide sulfonique de la lissamine rhodamine (RB200).

Chaque corps fluorescent possède 3 caractéristiques:

- Spectre d'excitation:

Seuls certains rayonnements de quantum d'énergie précis sont absorbés.

Etat de base

Etat excité

Energie

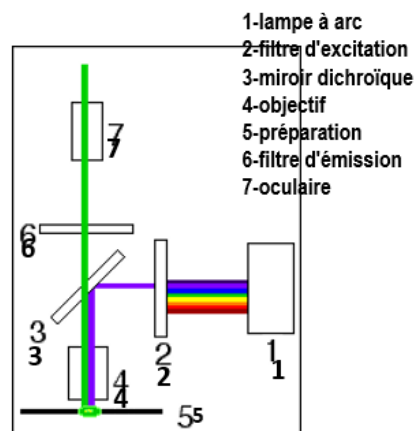
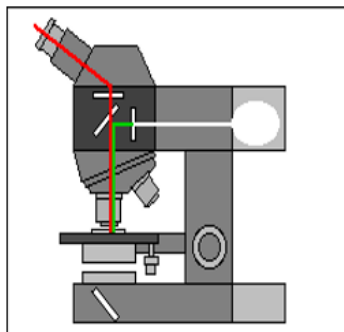
- Spectre d'émission:

Le retour de l'état intermédiaire à l'état de base s'accompagne de l'émission de photon de lumière particulière pour chaque corps fluorescent.

- Rendement quantique:

Le rapport entre le nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés.

3 . Microscope équipé pour la fluorescence:



1-un filtre d'excitation permettant la sélection des radiation absorbées par le fluorochrome (autour de 490nm),

2-un miroir dichroïque réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon et ne laissant passer par transmission que les radiations vertes et au dessus (>500nm),

3-un filtre d'émission ne laissant passer par transmission que les radiations vertes et au dessus (>500nm).

Lampes à vapeur d'halogène

- 60 W ou 100W.
- Prix modéré.
- Longue durée d'utilisation.
- Possibilité d'allumer et d'éteindre à tout moment la lampe.

Lampe à vapeur de mercure

- 50W-100W-200W.
- Prix relativement élevé.
- Durée de vie:200h.
- Diminution de la durée de vie de 50% pour des allumages ttes les 20 min.
- La lampe ne doit pas être remise en marche immédiatement sans risque après extinction.
- Elle ne doit pas être éteinte pendant les 15 premières min.
- Une lampe ayant dépassée son temps d'utilisation a beaucoup plus de risque d'éclater.

5. Problèmes posés par l'interprétation de l'immunofluorescence:

Réactions faussement positives

- Auto-fluorescence bleue-verte des tissus.(filtre adéquat)
- Récepteur pour le fragment F_c des Ig / $F(ab')_2$
- Présence de facteurs rhumatoïdes.
- Présence d'autres anticorps.

Réactions faussement négatives

- Phénomène de zone ou de compétition.

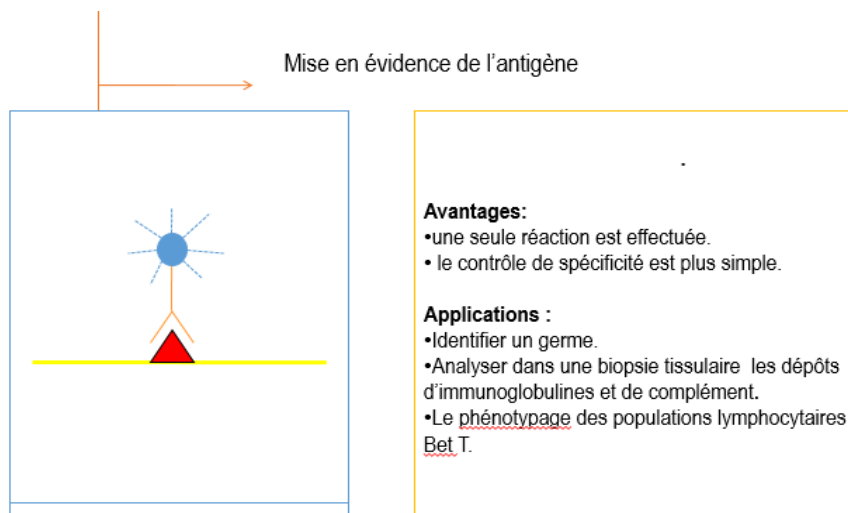
II-Méthodes

Immunofluorescence sur frottis ou sur coupe

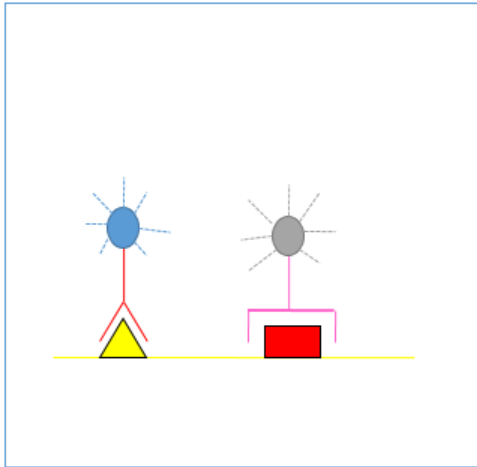
Immunofluorescence directe

Immunofluorescence indirecte

1.Immunofluorescence directe(IFD):



Double marquage

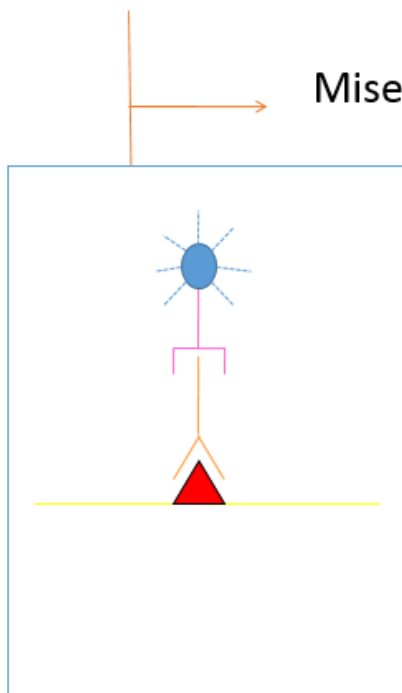


• Dans ce cas on recherche sur le même frottis ou la même coupes deux antigènes différents .

• On utilise alors deux réactifs différents:
- un anticorps contre le premier antigène marqué à la fluorescéine.
- un anticorps marqué à la rhodamine.

• Les deux conjugués peuvent être ajoutés successivement ou ensemble.

2. Immunofluorescence indirecte:



Mise en évidence de l'antigène

▪ La fixation de l'anticorps primaire non marqué spécifique de l'antigène recherché, est révélée grâce à une antiglobuline fluorescente.
▪ Les antiglobulines proviennent d'un mélange de sérums obtenus après immunisation d'animaux avec les yglobulines d'origine humaine.

Avantages:

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

• Car de multiples molécules de fluorochrome se lient à chaque molécule d'anticorps primaires. (le 1^{er} AC sert ici d'antigène avec plusieurs sites antigéniques)

Mise en évidence de l'antigène

Mise en évidence de l'anticorps dans les tissus

Mise en évidence de l'anticorps dans le sérum

- Il est nécessaire que la molécule antigénique ait plusieurs épitopes.
- On fait agir d'abord sur la coupe l'antigène.
- Lavage .
- L'anticorps de même spécificité marqué est ajouté dans un second temps.

« Sandwich »

- Exceptionnelle.

Des anticorps anti-mitochondrie, anti-muscle lisse, anti-microsome de foie et de rein sont simultanément décelable si on teste le sérum sur des coupes d'un bloc associant foie, rein, et estomac de rat ou de souris.

L'aspect de la fluorescence permet de reconnaître divers types d'anticorps, chacun particulier d'une maladie hépatique différente.

Les anticorps anti-muscle lisse peuvent être caractérisés comme anti-cytosquelette sur des fibroblastes ou des cellules HEp2 cultivées en présence de colchicine.

- Décelable sur des coupes d'organes.
- Les plus recherchées sont : anti-microsome de thyroïde
anti-microsome de cellules pariétales de l'estomac.
anti-microsome de corticosurrénale.
anti-ilots de Langerhans.
anti-substance intercellulaire d'épithélium malpighien
anti-muscle lisse.

2. Microbiologie:

Identification d'un microorganisme

Bactériologie :

Immunofluorescence directe

l'identification des agents infectieux dans tous les liquides biologiques:

- LCR: *Klebsellia pneumoniae*, etc..
- Gorge: *Streptocoque A, B, C, G*
- Prélèvement génitaux, urines, selles, etc...

Recherche d'anticorps anti-microorganisme

Immunofluorescence indirecte

-La détection d'anticorps circulants .

-Evaluation de leurs taux.

-Détermination de leurs classes.

En pratique sont réalisés:

- Le sérodiagnostic de la toxoplasmose.
- La recherche d'anticorps anti -
Tréponema pallidum

3. Immunocytochimie:

L'immunofluorescence permet :

-L'identification d'une substance biochimique:

Pour identifier les cellules productrices d'une substance donnée. Grâce à la production d'anticorps spécifiques vis-à-vis de cette substance , il est possible de montrer le lieu de synthèse de celle-ci.

-la caractérisation des lésions anatomo-pathologiques:

L'immunofluorescence directe permet de déceler des dépôts d'immunoglobulines ou de compléments dans les tissus.