

DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES

Dr Y.BOUKLIA HASSENE

Objectifs

- Citer les caractéristiques d'un dosage RIA
- Décrire les caractéristiques et les contingents d'une réaction Ag-Ac.
- Citer le principe d'un compteur gamma
- Citer les isotopes utilisés en RIA
- Décrire l'intérêt d'une courbe d'etalonnage
- Différencier entre la méthode RIA et IRMA

PLAN

- DÉFINITION
- LA REACTION ANTIGENE-ANTICORPS
- LES ISOTOPES RADIOACTIFS UTILISÉS
- TYPE DE DOSAGE
 1. DOSAGE PAR COMPÉTITION
 2. DOSAGE SANDWICH

DÉFINITION

C'est une méthode dosage et d'analyse quantitative basée sur le principe de la réaction antigène-anticorps associée à un complément radioactifs (un radio-isotope).

Elle est caractérisée par sa grande sensibilité et sa grande spécificité.

RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

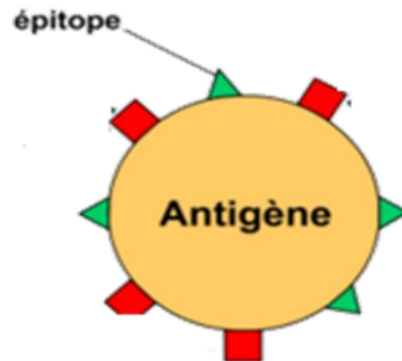
- ANTICORPS
- ANTIGÈNE
- HAPTÈNE
- CARACTÉRISTIQUES DE LA RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS (AG-AC)

RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Antigène (Ag)

Élément - qui - introduit dans l'organisme provoque une réaction immunitaire (réaction à anticorps).

Le site de reconnaissance: **Épitopes**

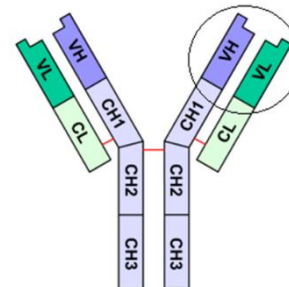
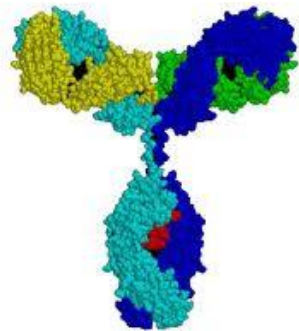


RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Anticorps (Ac)

Élément plasmatisque appelé aussi (immunoglobuline) de nature protéique réagissant spécifiquement avec un antigène.

Le site de reconnaissance : **paratope**.



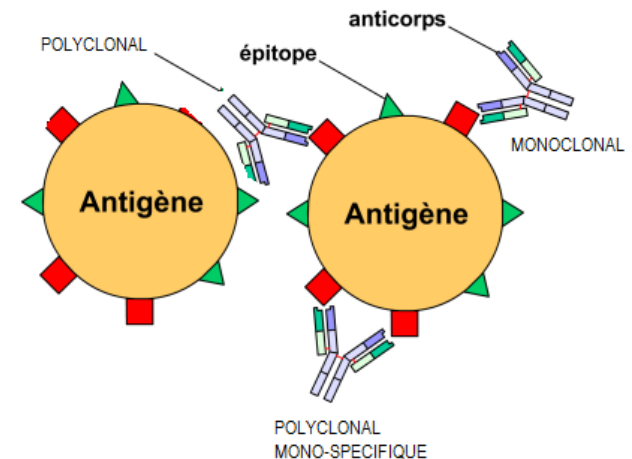
RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Ac polyclonaux

- Des Ac reconnaissant différents épitopes de différents antigènes
- Ac polyclonal mono spécifique est un Ac qui reconnaît différents épitopes du même antigène.

Ac mono-clonaux

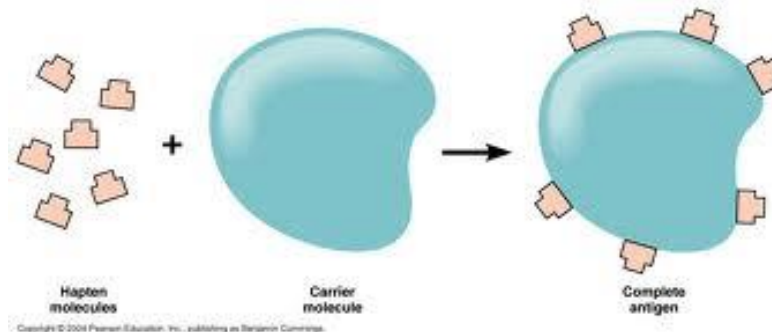
- Se sont des Ac capables de reconnaître spécifiquement un seul type d'épitope



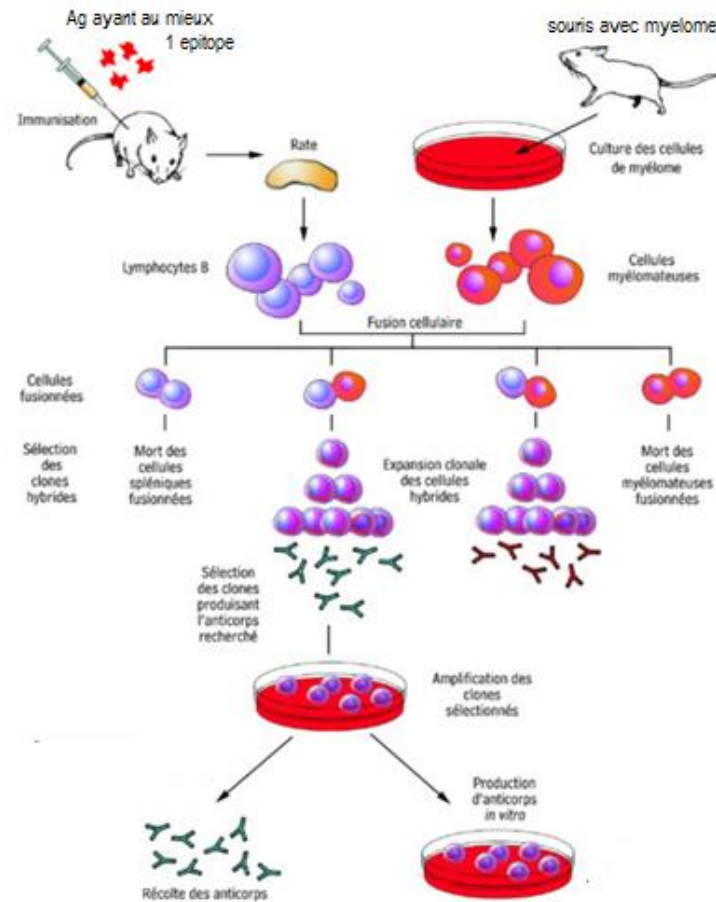
RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Haptène

Élément, de faible poids moléculaire, incapable de provoquer à lui seul une réaction antigène-anticorps mais devient actif lorsqu'il est couplé à une protéine dite « Carrière ».



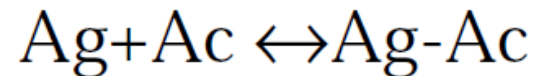
RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS



RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Caractéristiques

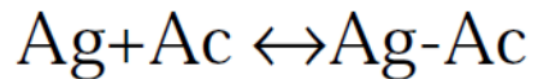
Réaction réversible donnant la formation d'un complexe entre un épitope de l'antigène et le paratope d'un anticorps spécifique a cette antigène.



RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

L'affinité :

C'est la tendance avec laquelle un épitope réagit avec un anticorps, elle peut être exprimée quantitativement par la mesure de la constante d'affinité K à l'équilibre.



$$\frac{[Ac - Ag]}{[Ac][Ag]} = \frac{K_1}{K_2} = k$$

k_1 = constante d'association

k_2 = constante de dissociation

$[Ag]$ = concentration de l'Ag

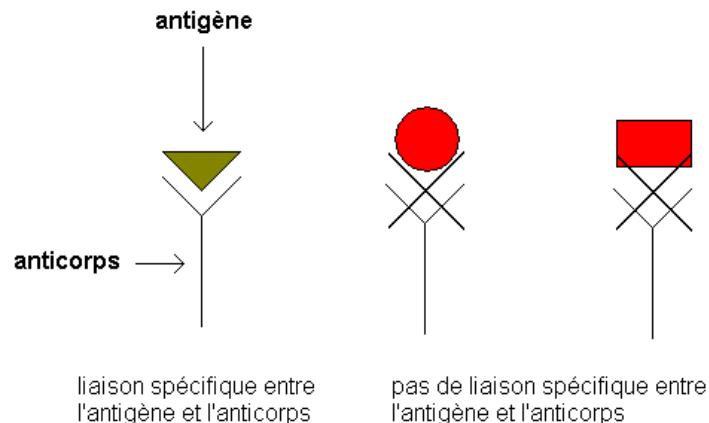
$[Ac]$ = concentration de l'Ac

$[Ac-Ag]$ = concentration du complexe Ag-Ac

RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

La spécificité

C'est l'aptitude de l'Ac a ne réagir qu'avec l'Ag et rien qu'avec cet Ag.



Le paratope reconnaît un seul épitopes.

RÉACTION ANTIGÈNE-ANTICORPS

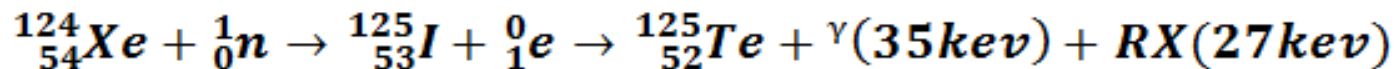
La réversibilité

Les forces de liaison faible rendent compte de la réversibilité de la réaction.

Un maximum de liaison Ag - Ac n'est obtenu qu'après un temps d'incubation

Les isotopes radioactifs utilisés

- ^{125}I : émetteur γ par CE, $E = 35 \text{ KeV}$, $T = 60 \text{ j}$
(c'est le plus utilisé)



- ^3H : émetteur β , $E = 19 \text{ KeV}$, $T = 12,3 \text{ ans}$
- ^{57}Co : émetteur γ par CE, $E = 122 \text{ KeV}$, $T = 271 \text{ j}$

LE MARQUEUR

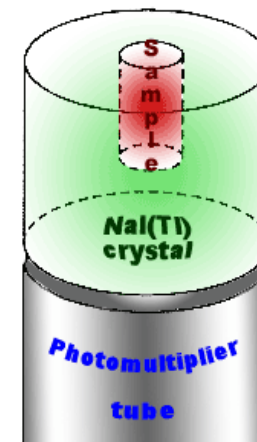
La fonction essentielle du marqueur est de fournir un signal facilement analysable proportionnel à l'antigène à doser.

Le marquage doit conserver les mêmes propriétés physico chimiques et immunologiques le l'Ac, de l'Ag, de l'Ag-Ac et les caractéristiques de la réaction Ag/Ac.

On utilise pour la détection des détecteurs composés d'un scintillateur solide associé à un photomultiplicateur = COMPTEUR GAMMA.

La détection

- La détection « IN VITRO » du dosage RIA se fait par un compteur gamma « à puits ».



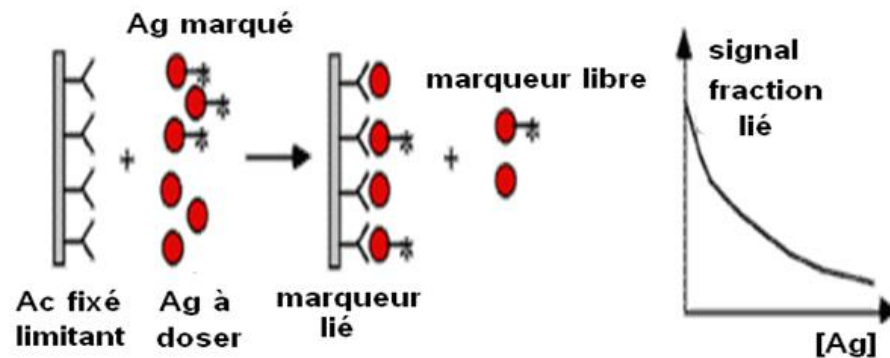
- Chaîne:
cristal puits – PM – compteur – sélecteur-moniteur

LES TYPE DE RADIODOSAGE

- METHODE PAR COMPETITION (RIA)
(défaut Ac / excès Ag)
- METHODE SANDWICH (IRMA)
(excès Ac / défaut Ag)

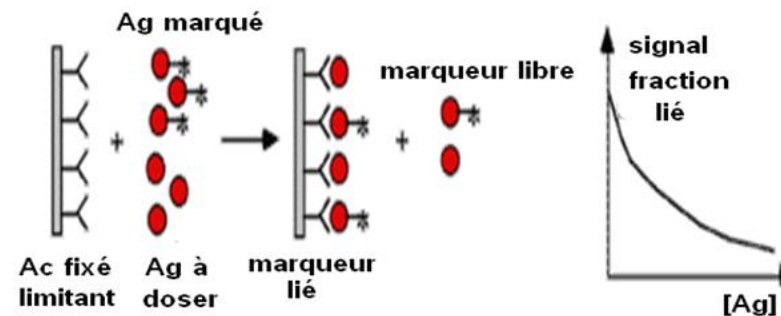
METHODE PAR COMPETITION

- C'est la compétition entre une quantité définie d'Ag marqué et un Ag déterminé vis-à-vis des sites de fixation en nombre définie, ces Ac étant en quantité insuffisante par rapport aux Ag.



METHODE PAR COMPETITION

- On aura formation de complexes Ag-Ac et $\text{Ag}^*\text{-Ac}$, les concentrations des Ac et des Ag étant fixes, l'augmentation de la concentration en Ag entraîne l'augmentation de la concentration en complexes Ag-Ac .



- Signal est inversement proportionnel à la concentration de l'Ag
- La concentration de l'analyte est obtenue par lecture sur une courbe d'étalonnage.

Avantages

- S'appliquent à tous les Ag, quelque soit leur taille
- Possèdent qu'un seul épitope.

Inconvénients

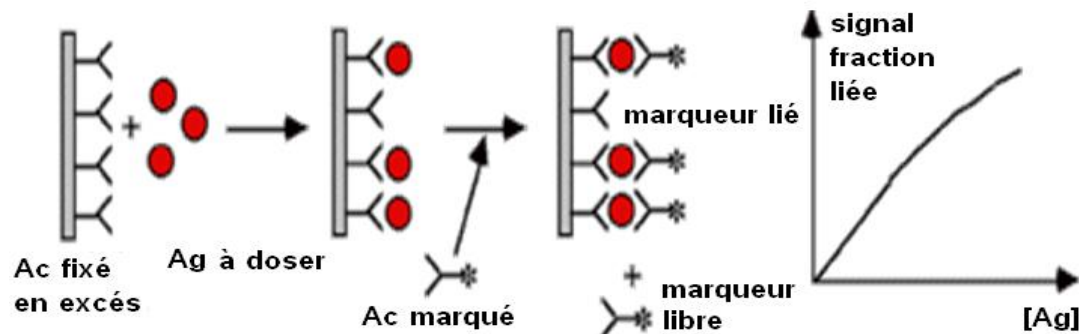
- Nécessitent une affinité élevée de l'Ac pour l'Ag
- Un nombre constant de sites Ac dans chaque tube de réaction pour avoir une bonne précision.

Dosage Radioimmunométrique : IRMA

Depuis l'avènement des Ac monoclonaux, l'IRMA a remplacé la méthode par compétition.

Elle se caractérise par :

- La présence d'Ac en excès
- L'utilisation d'un 2^{ème} Ac marqué



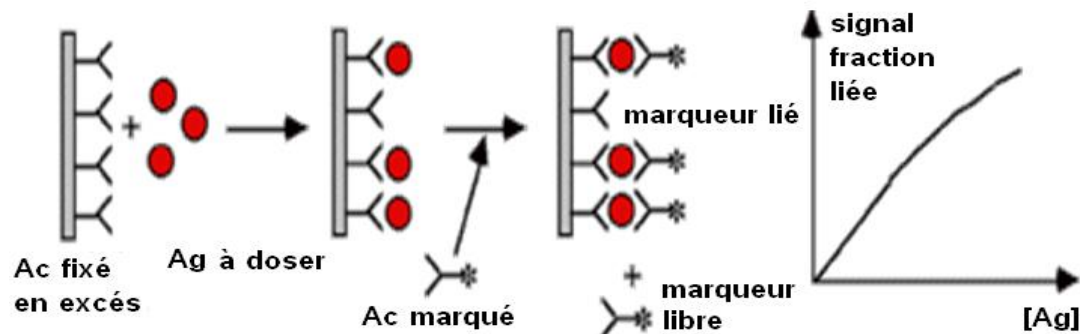
Dosage Radioimmunométrique : IRMA

Donc 2 Ac dirigés contre 2 épitopes suffisamment éloignés de la molécule d'Ag.

Le 1^{er} Ac (Ac liant) est fixé sur un support solide (tubes..),
le 2^e Ac marqué à ^{125}I (Ac traceur).

La molécule à tester est prise en sandwich entre les 2 Ac.

La radioactivité liée est proportionnelle à la quantité d'Ag



Avantages

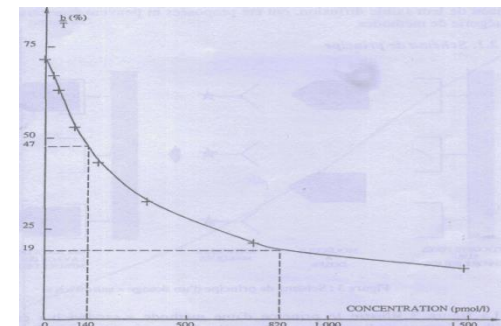
- **Spécificité** : L'utilisation de 2 Ac dirigés contre 2 épitopes différents améliore la reconnaissance spécifique
- **Sensibilité** : Toute molécule d'Ag mise en présence de l'Ac liant est susceptible d'être captée.

Inconvénients

- Ag d'avoir 2 épitopes.
- **L'effet crochet** (effet cloche)

COURBES D'ÉTALONNAGE ET ÉTALONS

- Le DRI est une méthode relative qui consiste à comparer les réponses fournies par les échantillons à doser à celles des solutions étalons.
- Les solutions étalons utilisées au cours de chaque série de dosage permettant de réaliser une courbe d'étalonnage et de déterminer la concentration de la substance considérée dans les échantillons biologiques.



DOSAGE PAR COMPETITION RIA	DOSAGE SANDWICH IRMA
Défaut d'Ac	Excès d'Ac
Ac polyclonaux	Ac monoclonaux
Radioactivité est inversement proportionnelle à la concentration	Radioactivité est directement proportionnelle à la concentration
Extrême sensibilité dosage de l'haptène	Pas de dosage de l'haptène
Spécificité exceptionnelle	

Le + et le - du RIA

Avantages

- L'isotope permet un marquage facile.
- Le signal est direct, émis par le marqueur lui-même
- Le signal est spontané, ne faisant pas intervenir une source d'énergie extérieure

Inconvénients

- Réglementation
- Précaution et surveillance lors des manipulations
- Le temps de mesure du signal isotopique, attendre au minimum 1 min
- Durée de validité des réactifs

CONCLUSION

- La RIA est une méthode de référence dans les dosages de très faibles concentrations d'analytes.
- Tient toujours sa place malgré le développement des autres méthodes de dosage bien plus rapides mais très onéreuses.