

Introduction :

L'immuno-analyse est basée sur la formation des complexes immuns in vitro (Anticorps-Antigène).

La plupart techniques d'immuno-analyses courantes utilisent un marquage pour révéler et quantifier la réaction Ag-Ac. Ces techniques présentent une performance supérieure (de point de vue : sensibilité** -spécificité -fiabilité -rapidité) par rapport aux techniques sans marquage.

Un marqueur : entité (atome, molécule, ion...) liée chimiquement à un Ag ou Ac, et délivrant un signal direct ou indirect, quantitativement mesurable.

On appelle l'élément marqué, qu'il soit l'antigène ou l'anticorps, un conjugué.

3 grands types de marqueurs dans les kits commercialisés :

1. **Radio-isotopes** : émission d'un rayonnement ;
(Techniques radioimmunoassay RAI/ immunoradiometric assay IRMA)
2. **Fluorochrome** : émission d'une fluorescence ;
(Techniques fluoroimmunoassay FIA / immunofluorometric assay IFMA)
3. **Enzymes** : catalysent de la formation d'un produit coloré ;
(Techniques enzymoimmunoassay EIA / immunoenzymometric assay IEMA)

Historiquement, les techniques immuno-enzymatiques et d'immunofluorescence ont remplacé progressivement l'utilisation des techniques radioimmunologiques à cause des contraintes liées à la radio-émission.

Dosage radio immunologiques :

Des techniques de dosage hautement sensibles et spécifiques qui combinent une réaction immunologique Ac-Ag et une révélation par un traceur radioactif.

Classées en 2 groupes selon les proportions relatives d'anticorps et d'antigènes présents dans la réaction.

I) Radio-immunodosage par compétition / RIA : Radio Immuno Assay :

(Méthode par **défaut** d'anticorps, Méthode inversement proportionnelle)

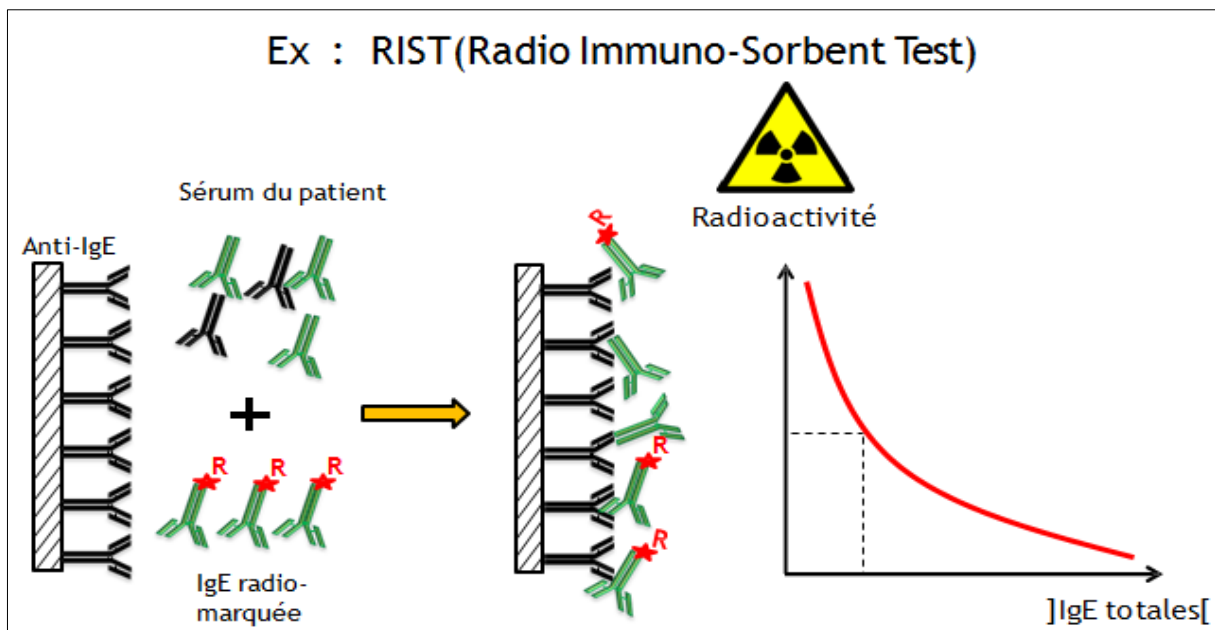
Principe :

Technique dans laquelle des molécules marquées avec un radio-isotope (Ag*) et des molécules non marquées (Ag), d'une même nature, **entrent en compétition** vis-à-vis d'un nombre limité de sites de liaison d'Ac spécifiques.

Une fois l'équilibre atteint, le pourcentage des formes liées (Ag*-Ac) est **inversement proportionnel** à la concentration de la substance (Ag) que l'on veut doser dans notre échantillon (liquide biologique : sang, urines, LCR...)

- L'Ag marquée par un isotope radioactif (Ag*) doit être de même nature que celui qu'on veut doser.
- Le traceur le plus utilisé est l'iode 125 : facilité de marquage, faible irradiation
- les dosages radioimmunologiques sont des méthodes relatives qui consistent à comparer les réponses fournies par les échantillons à doser à celles des solutions étalons au moyen d'une courbe d'étalonnage. La détermination de la [c] de la même substance dans un échantillon se fait graphiquement par interpolation

Exemple de RIA : Dosage des IgE totales



II) Radio-immunodosage en Sandwich

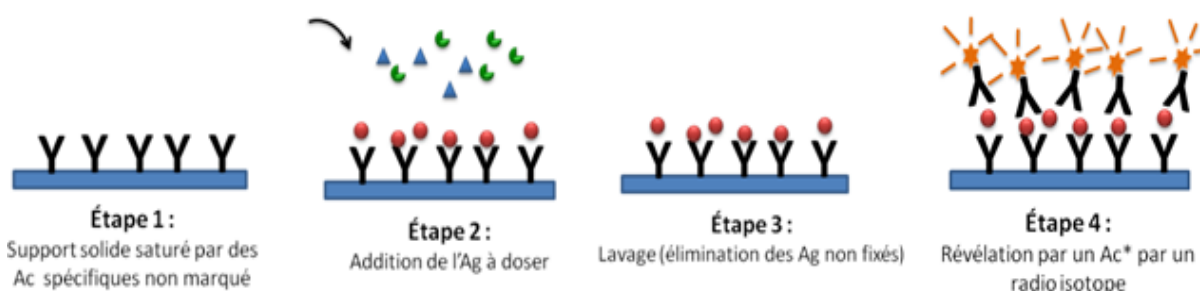
Dosage Radio Immuno métrique / IRMA : Immuno Radio Metric Assay (Radio-immunodosage par excès d'anticorps, Technique directement proportionnelles)

• **Principe :**

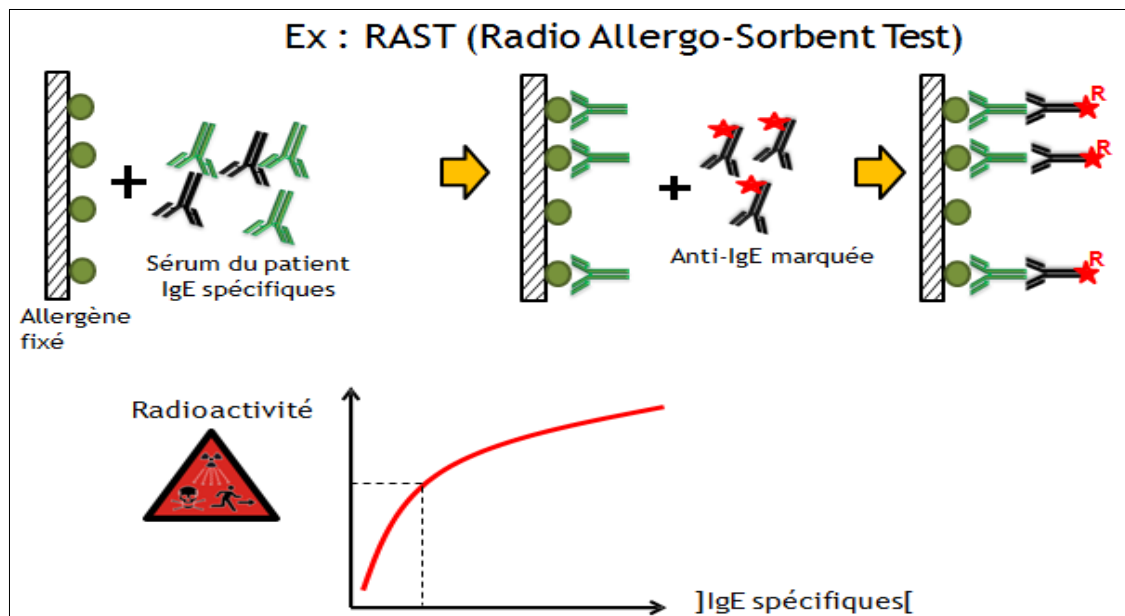
Capturer les molécules à doser grâce à des anticorps en excès fixés sur un support solide, la totalité de l'Ag va se fixer

En 2ème temps : la révélation se fait à l'aide d'un deuxième Anticorps marqués (conjugués) par un isotope radioactif.

Dans ces conditions, plus la concentration de la substance à doser augmente, plus la radioactivité des complexes Ac-Ag-Ac* augmente.



Exemple d'IRMA : dosage des IgE spécifiques



Nb : Avant de procéder à la lecture de la radioactivité émise par les conjugués, on doit se disposer d'une méthode pour la séparation des formes liées (conjugués fixés, qui ont participé dans la formation des complexes immuns) et formes libres (non fixés).

Par ex :

- Utilisation d'un support solide (tube couvert d'Ac) (schéma...), la plus utilisée ;
- Adsorption de la forme libre sur un matériau (CHARBON)....

• Choix du traceur

La fonction essentielle du traceur est de permettre l'appréciation quantitative des formes liées quand l'équilibre est atteint.

Après marquage, le traceur doit garder les mêmes propriétés physico-chimiques et immunologiques.

Impératifs concernant le traceur :

- Ne pas trop modifier la constante d'affinité vis à vis de l'AC spécifique ;
- Permettre d'obtenir une activité spécifique élevée (conditionne la sensibilité) ;
- Permettre une détection aisée du signal (compteur des rayons gamma) ;
- Posséder une période assez longue car celle-ci conditionne la limite d'utilisation.

Élément	Radioactivité (Ci/mmol)	Demi-vie	Rayonnement
C^{14}	0.062	5568ans	β
H^3	29	12.3ans	β
I^{125}	2200	59.7j	γ
I^{131}	16100	8.1j	β, γ

Avantage des Dosages RI

- Sensibilité très élevée
- L'isotope permet un marquage facile (encombrement stérique réduit).

- Signal direct (directement émis par le marqueur lui-même).
- Signal spontané (ne faisant pas intervenir une source d'énergie externe).
- **Inconvénients**
 - Restriction réglementaire.
 - Les précautions et surveillances nécessaires lors de sa manipulation (problème de la radioprotection)
 - La péremption du traceur : (décroissance radioactive, radiolyse)

III. APPLICATIONS DES DOSAGES RADIO-IMMUNOLOGIQUES

Allergologie : IgEt, IgEs,...

Auto-immunité : Ac anti-ADN natif,...

Endocrinologie : dosages hormonaux (T3, FSH, LH, TSH,...)

Obstétrique : bêta-HCG,...

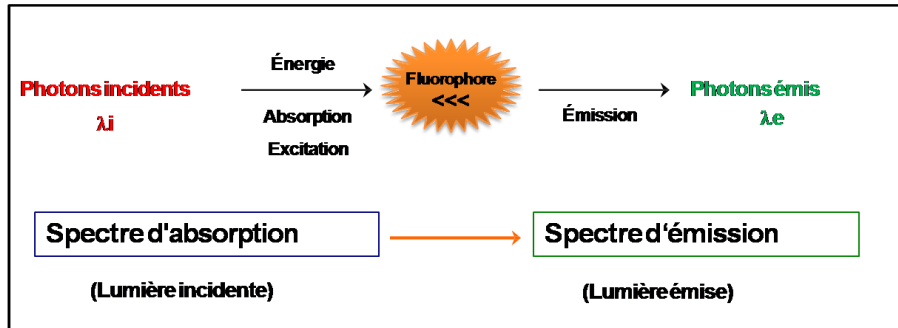
Pédiatrie, Hématologie : facteurs de croissance (GH, IGF1,...)

Cancérologie : marqueurs tumoraux,...

Techniques d'immunofluorescence IF :

La fixation d'un fluorochrome sur un anticorps ne modifie pas la réaction Ag-Ac et va permettre de suivre la réaction Ag-Ac.

Un fluorochrome, excité par une lumière (UV), va émettre une lumière fluorescente de plus faible énergie.



1- Cible recherché :

- les antigènes recherchés peuvent être exprimés à la surface d'un tissu ou de cellules bien identifiées ;
- un anticorps déposé au niveau d'un tissu et/ou circulant dans le sérum.

2- Révélation : par addition d'un conjugué fluorescent

I. Exemples de fluorophores :

Plusieurs fluorochromes peuvent être utilisés :

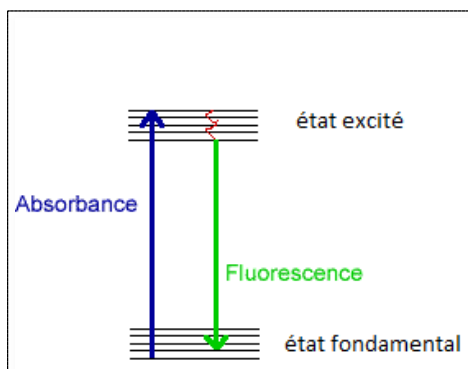
- Les dérivés de la fluorescéine produisent un rayonnement de couleur verte ;
- Les dérivés de la rhodamine donnent une fluorescence orangée ;
- D'autres composants fluorescents existent, et sont surtout utilisés en cytométrie à flux (Tri-cellulaire avec immunomarquage fluorescent), comme la Phycoérythrine

Spectre d'absorption et d'émission de la fluorescéine :

- Maximum d'absorption à **490 nm** (elle absorbe les radiations bleues)
- Maximum d'émission à **520 nm** (elle restitue une fluorescence verte)

II. Systèmes de mesure :

L'observation au microscope à UV



❑ Passage des électrons du fluorochrome utilisé à un état excité : Absorption de l'énergie d'une lumière excitatrice avec une faible longueur d'onde

❑ Retour à leur état fondamental : par émission d'une lumière fluorescente moins énergétique avec une longueur d'onde plus grande

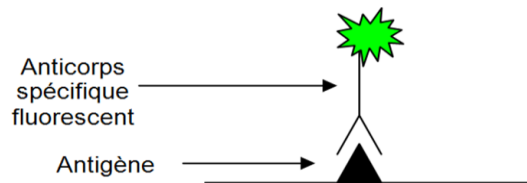
- Le microscope possède une source de rayons ultraviolets ; cette lumière passe par des filtres dits d'excitation qui laissent pénétrer uniquement les radiations de longueur d'onde susceptibles d'exciter le fluorochrome employé ;
- Le rayonnement émis par l'anticorps fluorescent passe ensuite par un filtre dit d'arrêt ou d'émission qui arrête les radiations parasites.

III- DIFFERENTES METHODES UTILISEES

- 1 Réactions d'immunofluorescence directe (IFD)
- 2 Réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI)
- 3 Méthodes de double marquage

Dans chaque cas, on laisse en contact les différents réactifs durant environ 30 minutes ; entre chaque temps, des lavages soigneux éliminent tous les produits non fixés par une réaction immunologique pour procéder à la lecture de la fluorescence.

1- Réactions d'immunofluorescence directe (IFD)



a. IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE

Fixer directement l'anticorps marqué (rendu fluorescent) sur la préparation antigénique étudiée.

Inconvénient : Elle nécessite le marquage de l'anticorps **spécifique de chaque antigène**, ce qui limite ses applications.

Applications :

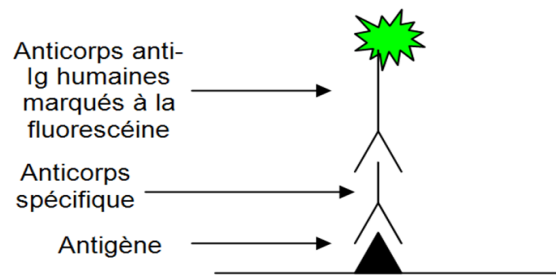
✓ **Recherche de dépôts tissulaires :**

- à d'immunoglobulines, autoanticorps (IgG, IgA),
- à de composants du complément (C3, C1q...)
- à dépôt de fibrine dans des biopsies tissulaires (peau, rein,...etc.)

✓ **Phénotypage cellulaire :**

Dénombrement des populations sanguines (B, T, NK, TCD4+ et TCD8+). On utilise dans ce cas, des anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes de surface spécifique de chaque population cellulaire.

2- Réactions d'immunofluorescence indirecte (IFI)



b. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Après avoir mis en présence le réactif jouant le rôle d'antigène (coupe tissulaire, frottis cellulaire) et le sérum à tester supposé contenir les anticorps correspondants, on ajoute des anti-immunoglobulines humaines marqués à un composant fluorescent

Avantage : le marquage d'un seul type d'immun-sérum (anti-Ig ou anti-Ig humaine), permet la détection de tous les anticorps à rechercher.

- Applications :

Elle représente la méthode de choix dans le diagnostic des maladies auto-immunes (recherche et titration des auto-Ac dans un milieu biologique).

- La réaction est semi-quantitative, Le titre de l'auto-Ac recherché correspond à l'inverse de la dernière dilution donnant encore une fluorescence perceptible.

3- Méthodes de double marquage :

- L'utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents différents dans la même réaction nous permet l'identification et l'étude de plusieurs systèmes antigène-anticorps en même temps, permettant un double, un **triple** ou un **quadruple** marquage et **plus**.

Techniques immunoenzymatiques

Introduction

Méthodes pratiques et simples très largement utilisées, qui ont remplacé les techniques radio-immunologiques.

La détection de la formation des complexes Ag-Ac se fait grâce à l'utilisation des enzymes comme traceur.

En effet, L'enzyme est conjuguée à l'un des 2 réactants (l'anticorps ou l'antigène). À l'ajout de son substrat chromogène, elle catalyse l'apparition d'un produit coloré à partir d'un substrat initialement incolore.

Le signal : perception de la coloration ou mesure de la densité optique de la coloration des produits générés par la réaction enzymatique.

- Dans les techniques qualitatives → le produit coloré doit être insoluble et se précipiter au site précis de la réaction Ac-Ag ;
- Dans les techniques quantitatives → 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 ou schémas réactionnels basées sur un concept de base identique. (Voir diapos)

Caractéristiques des enzymes utilisées :

- faible K_m pour leur substrat (et donc une grande affinité)
- Catalyser des réactions irréversibles
- Être stables, résistantes aux interférences
- L'enzyme, le substrat et le produit absents des préparations à analyser
- Le marquage ne doit pas affecter l'activité catalytique de l'enzyme ou la réaction Ag-Ac.

Techniques immunoenzymatiques : voir diapos

1- Qualitatives :

Antigène tissulaire : immunocytochimie et immunohistochimie

Antigène soluble : immuno-blot (empreinte) et immunodot (point)

2- Quantitatives :

Dosage de l'antigène :

ELISA compétition Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

ELISA Sandwich

Dosage de l'anticorps :

ELISA indirecte (utilisation d'une anti-immunoglobuline marquée)

APPLICATIONS

- Recherche et dosage d'anticorps pour le diagnostic de maladies infectieuses (sérologie bactérienne) : en parasitologie (toxoplasmose...) et en virologie (virus de l'hépatite B, virus du SIDA...),
- également recherche d'Ac en auto immunité...
- Dosage spécifique de certaines protéines plasmatiques : IgE (totales et spécifiques), ferritine, dosages hormonaux (hCG),
- dosages de médicaments, recherche de marqueurs tumoraux : alpha-foetoprotéine...
- recherche d'Ag bactériens, viraux, fongiques, parasitaires