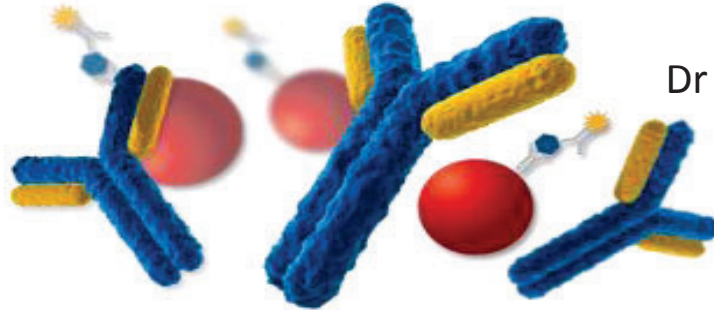
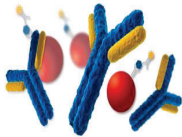




Les techniques immunologiques avec marquage

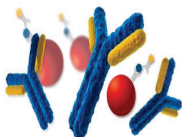


Dr KHALED.H



Plan

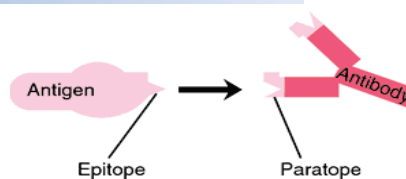
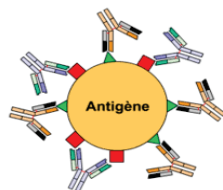
- Introduction
- Techniques d'immunofluorescence
- Techniques immuno-enzymatiques
- Techniques radio-immunologiques
- Techniques de chimiluminescence



Introduction

Les Techniques immunologiques

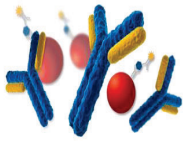
Réactions Antigène-Anticorps



1-La spécificité : C'est l'aptitude de l'Ac à ne réagir qu'avec l'Ag et rien qu'avec cet Ag. Le paratope reconnaît un seul épitope.

2-L'affinité : C'est la tendance avec laquelle un épitope réagit avec un anticorps

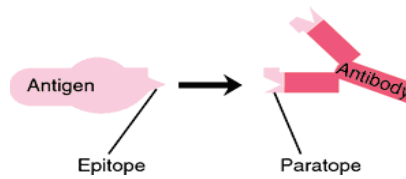
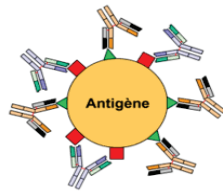
3-La réversibilité : Les forces de liaison faible rendent compte de la réversibilité de la réaction. Un maximum de liaison Ag - Ac n'est obtenu qu'après un temps d'incubation



Introduction

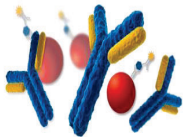
Les Techniques immunologiques

Réactions Antigène-Anticorps



Elles sont très utilisées en :

- recherche fondamentale et appliquée.
- analyse médicale, pour le dosage de nombreuses substances (Ag, Ac, hormones, marqueurs tumoraux, médicaments...) dans les différents liquides biologiques.



Introduction

Les Techniques immunologiques

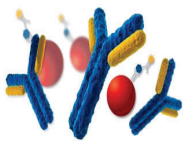
Réactions Antigène-Anticorps

Identification et/ou dosage d'un Antigène (Ag)

- Cellules
- Agents infectieux
- Protéines
- Hormones
- Médicaments

Mise en évidence et/ou titrage d'un Anticorps (Ac)

- Sérologies infectieuses
- Maladies auto-immunes
- Allergies
- Transplantation



Introduction

Les Techniques immunologiques

Réactions Antigène-Anticorps

Sans Marquage

Immunoprécipitation
(en milieu liquide)

Immunodiffusion
(en milieu gélifié)

Agglutination

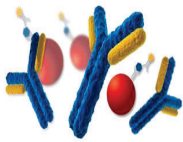
Avec Marquage

Immunofluorescence

Immuno-enzymatiques

Radio-immunologique

Chimiluminescence



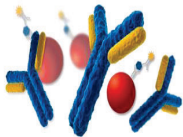
Introduction

Les Techniques immunologiques

Réactions Antigène-Anticorps

Avec Marquage

- Réactions Antigène-Anticorps utilisant un réactif « **Antigène*** ou **Anticorps *** » associé à un **Marqueur** (Traceur) **déTECTABLE** permettant de **révéler** la liaison antigène-anticorps spécifique
- Le marquage ne doit pas modifier la spécificité de la réaction Ag-Ac (le marquage se fait en dehors des régions de complémentarité)
- Les marqueurs **augmentent la sensibilité** d'une immuno-analyse et permettent de **déceler des quantités plus faibles** de cible que les méthodes qui ne les utilisent pas.
- Quatre grands types de marqueurs sont utilisables, des **enzymes**, des **fluorochromes**, des **composés chimiluminescents** et des **radio-isotopes**.



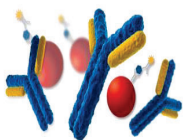
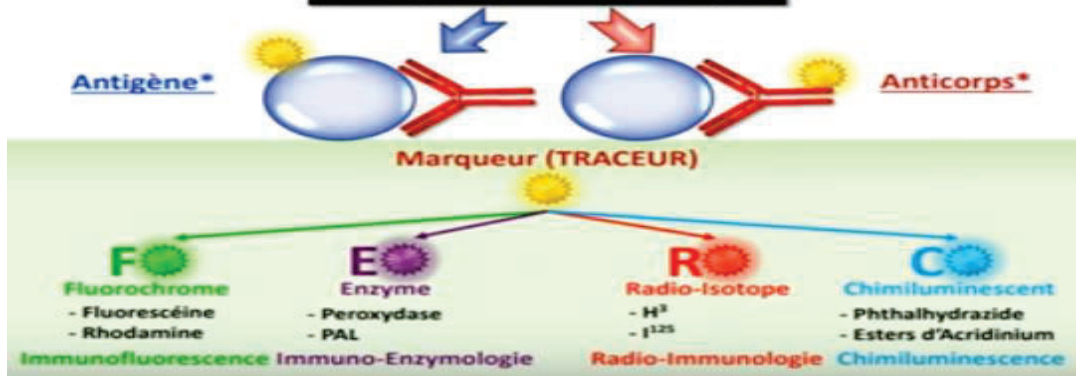
Introduction

Les Techniques immunologiques

Réactions Antigène-Anticorps

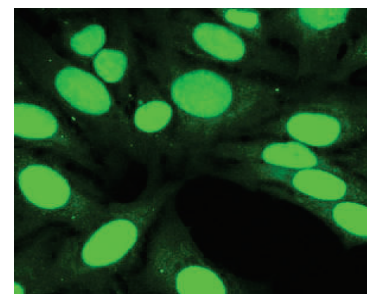
Avec Marquage

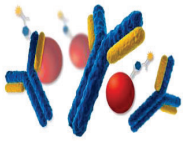
Antigène – Anticorps



Les techniques d'immunofluorescence

- Plan:
 - Aspects fondamentaux:
 - 1- Phénomène de la fluorescence.
 - 2- Les Fluorochromes
 - 3- Système optique de détection de fluorescence
 - Méthodes:
 - Immunofluorescence directe
 - Immunofluorescence indirecte
 - Applications
 - 1- Autoimmunité
 - 2- Microbiologie
 - 3- Immunocytochimie





Les techniques d'immunofluorescence

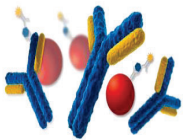
I . Aspects fondamentaux

1. Phénomène de fluorescence



1944: Albert Coons

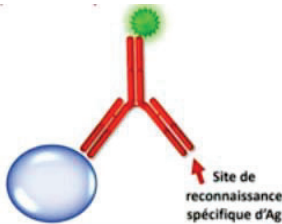
- **Les Ac** pouvaient être marqués par des molécules qui ont la propriété d'être fluorescentes, appelées **Fluorophores** ou **Fluorochromes**.
- Elles absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde (**excitation**) passent à un état excité, et qui, pour revenir à l'état fondamental, émettent une lumière d'une longueur d'onde différente de celle absorbée (**longueur d'onde d'émission**) ($\lambda_{\text{émise}} > \lambda_{\text{absorbée}}$).
- La fluorescence est un phénomène physique caractérisé par l'émission d'une lumière **de plus faible énergie que celle absorbée**.



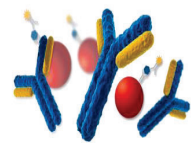
Les techniques d'immunofluorescence

I . Aspects fondamentaux

1. Phénomène de fluorescence



- Lorsque des Ac sont marqués par un fluorochrome, les complexes immuns contenant ces AC marqués sont détectés par **l'émission de lumière colorée** s'ils sont excités par une lumière de longueur d'onde adéquate.
- La lecture est réalisée au **microscope à fluorescence** équipé d'une **source de lumière UV**.



Les techniques d'immunofluorescence

I . Aspects fondamentaux

2. Les fluorochromes

2.1. Caractéristiques:

Chaque corps fluorescent possède 3 caractéristiques:

Spectre d'excitation:

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

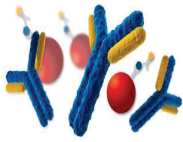
Etat de base $\xrightarrow{\text{Energie}}$ Etat excité

Spectre d'émission:

Le retour 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.



Les techniques d'immunofluorescence

I . Aspects fondamentaux

2. Les fluorochromes

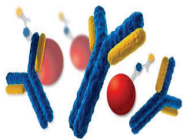
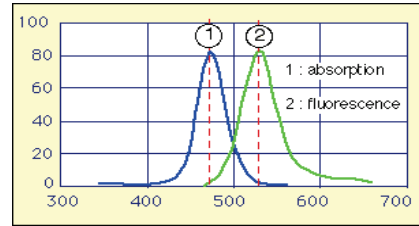
2.2. Principaux fluorochromes utilisés :

▪ **L'isothiocyanate de fluorescéine (ou FITC) :**

- Le plus fréquemment utilisé,
- Absorbe la lumière **bleue** à $\lambda = 480\text{nm}$
- et émet une fluorescence **verte** à $\lambda = 517\text{nm}$.

▪ **L'isothiocyanate de rhodamine :**

- Absorbe à $\lambda = 550\text{nm}$ et émet à $\lambda = 580\text{nm}$ (**rouge orangé**).
- Souvent utilisée dans les doubles marquages (avec la fluorescéine), du fait des couleurs différentes émises par les deux fluorochromes.
- **La phyco-érythrine** absorbe 30 fois plus la lumière que la fluorescéine et émet une fluorescence **rouge intense**. Souvent utilisée dans la cytométrie de flux.



Les techniques d'immunofluorescence

I . Aspects fondamentaux

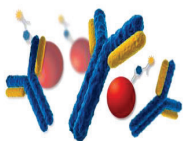
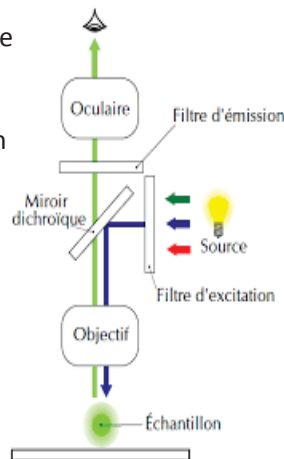
3. Les systèmes optiques de détection de fluorescence

- une **source de lumière** : est équipé d'un jeu de filtres correspondant au fluorochrome utilisé.

- un **filtre d'excitation** permettant la sélection de la longueur d'onde absorbées par le fluorochrome utilisé,

- un **miroir dichroïque** réfléchissant les radiations absorbables vers l'échantillon .

-- un **filtre d'émission** ne laissant passer par transmission que les radiations émises par le fluorochrome.



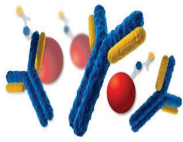
Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

Immunofluorescence sur frottis ou sur coupe

Immunofluorescence Directe (IFD)

Immunofluorescence Indirecte (IFI)

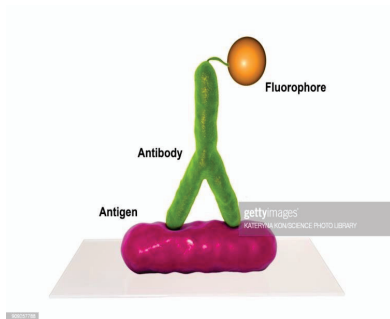


Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

1-Immunofluorescence Directe

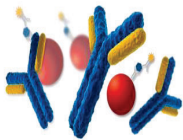
Mise en évidence de l'Antigène



- Elle consiste à fixer directement l'anticorps marqué sur la préparation antigénique étudiée.
- Après lavage la lecture est effectuée au microscope à fluorescence.

Applications:

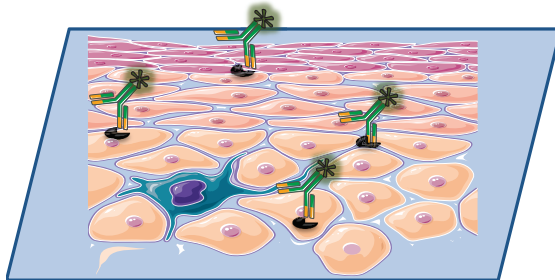
- Identifier un germe.
- Analyser dans une biopsie tissulaire les dépôts d'immunoglobulines et de complément.
- Le phénotypage des populations lymphocytaires B et T.



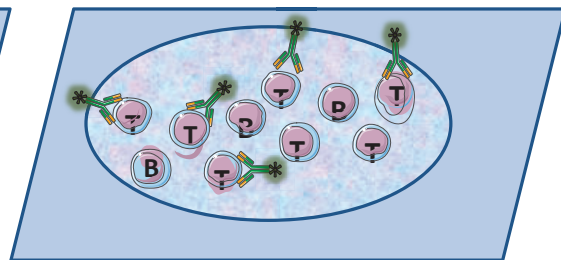
Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

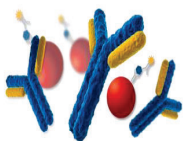
1-Immunofluorescence Directe



Recherche de dépôts de composants du complément



phénotypage des populations lymphocytaires B et T



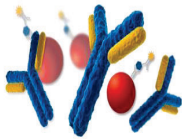
Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

2-Immunofluorescence Indirecte

Mise en évidence de l'Antigène

Mise en évidence de l'Anticorps dans le sérum

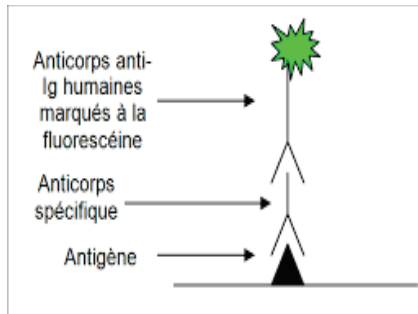


Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

2-Immunofluorescence Indirecte

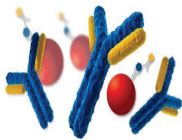
Mise en évidence de l'Antigène



- La fixation de l'Ac primaire non marqué spécifique de l'Ag recherché, est révélée grâce à une antiglobuline (Anti-Ac) fluorescente.
- Les antiglobulines proviennent d'un mélange de sérums obtenus après immunisation d'animaux avec les γ globulines d'origine humaine.

Avantages:

- Plus grande sensibilité que la méthode directe (4 à 10 fois supérieure)
- Car de multiple molécules de fluorochrome se lient à chaque molécule d'Ac primaire. (Le 1^{er} Ac sert ici d'Ag avec plusieurs sites Agénik)

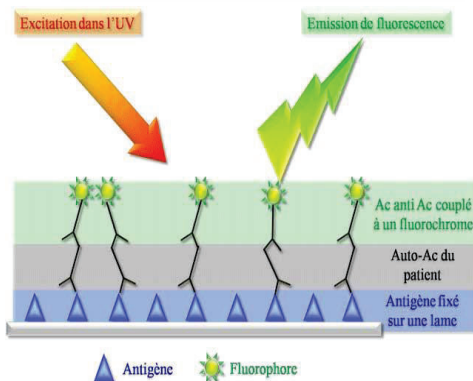


Les techniques d'immunofluorescence

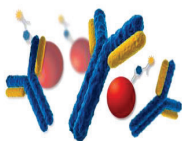
II . Méthodes

2-Immunofluorescence Indirecte

Mise en évidence de l'Anticorps dans le sérum



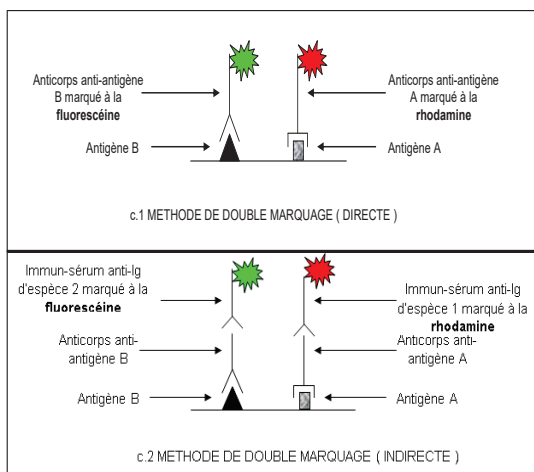
- **1^{er} temps** : Mise en présence de l'Ag (coupe tissulaire, frottis cellulaire) avec le sérum à tester ; Elimination par lavage des Ac non fixés.
- **2^{ème} temps** : Addition de l'immun-sérum anti-immunoglobulines humaines conjugué à un fluorochrome (Le conjugué) ; Elimination des anti-Ig non fixées par de nouveaux lavages.
- Lecture au microscope à fluorescence.



Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

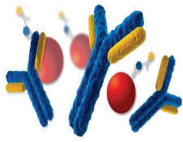
Méthodes de double marquage :



- **Utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents dans la même réaction**
- Permet l'identification et l'étude de plusieurs systèmes antigène-anticorps en même temps, permettant un **double**, un **triple** marquage et même **plus**.

Exemple : Utilisation de deux fluorochromes distincts (fluorescéine et rhodamine par exemple) : double marquage direct et surtout indirect

- Plus souvent utilisée lorsque la lecture est effectuée en cytométrie en flux

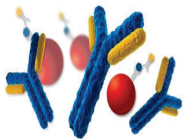


Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

1-Autoimmunité

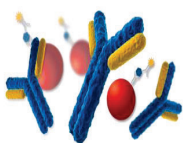
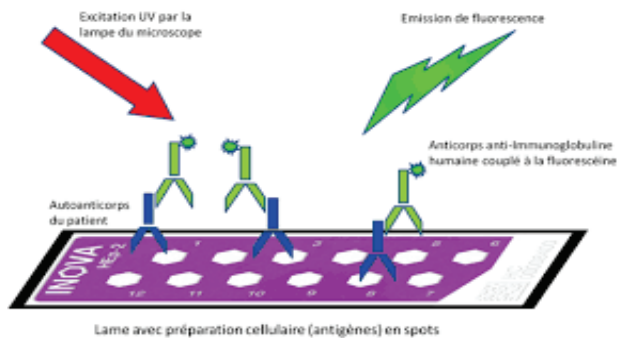
- L'immunofluorescence indirecte permet de détecter les auto-Ac avec les avantages suivants:
 - Facilité d'exécution.
 - Bonne sensibilité
 - Détection de plusieurs Ac à la fois.
- L'IFI, sur frottis cellulaire ou coupe d'organe est la méthode de routine la plus utilisée pour dépister de nombreux Ac.
- C'est une technique semi quantitative: On choisira pour chaque type d'auto-Ac la dilution initiale à partir de laquelle les titres des auto-Ac deviennent cliniquement significatifs (Exp: AAN: 1/80, AMA:anti-mito: 1/40, AEA: 1/10)
- Une fluorescence perceptible d'auto-Ac est suivie d'une dilution du sérum de 1/2 en 1/2 jusqu'à extinction de la fluorescence.
- Le titre de l'Auto-Ac recherché correspond à l'inverse de la dernière dilution donnant une fluorescence.



Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

1-Autoimmunité



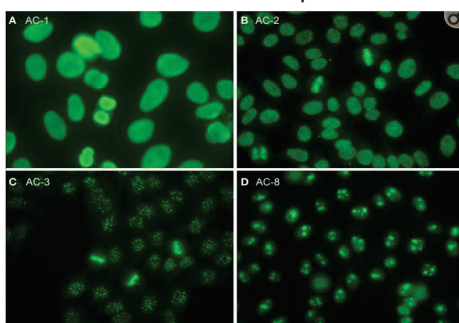
Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

1-Autoimmunité

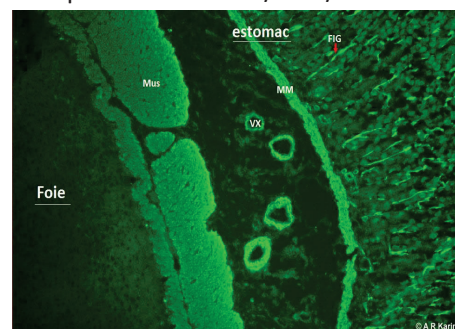
Anticorps antinucléaires

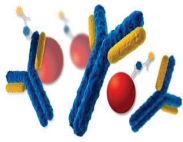
IFI sur Cellules Hep2



Anticorps spécifiques d'organes

IFI sur Triple substrat: Foie/Rein/Estomac de rat





Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

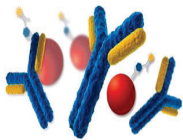
2-Microbiologie

Identification d'un microorganisme

- Immunofluorescence directe permet l'identification des agents infectieux dans tous les liquides biologiques:
- LCR: Klebsiella pneumoniae, etc..
- Gorge: Streptocoque A,B,C,G
- Prélèvement génitaux, urines, selles, etc

Recherche d'Ac anti-microorganisme

- L'immunofluorescence indirecte permet:
- La détection d'anticorps circulants.
- Evaluation de leurs taux.
- Détermination de leurs classe.
- En pratique sont réalisés:**
- Le sérodiagnostic de la toxoplasmose
- La recherche d'Ac anti-Tréponema pallidum



Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

3-Immunocytochimie

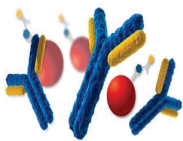
L'immunofluorescence permet:

-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 anato-mo-pathologiques:

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



Les techniques Immuno-enzymatiques

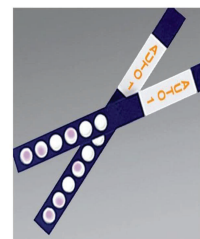
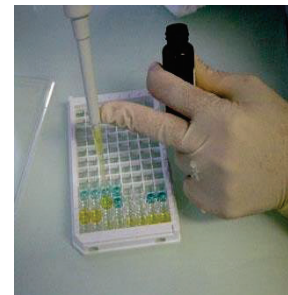
- Plan:

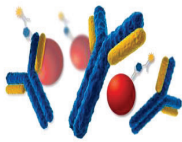
I. Définition et principe .

II. Méthodes:

1. Techniques quantitatives
 - 1.1. Définition des techniques ELISA
 - 1.2. Les variantes techniques des techniques ELISA
2. Techniques qualitatives
 - 2.1. Technique immunoenzymatique directe
 - 2.2. Western blot
 - 2.3. Immunodot
 - 2.4. Elispot

III. Amplification du signal des techniques immuno-enzymatiques

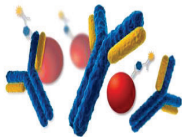




Les techniques Immuno-enzymatiques

I . Définition et principe

- Ce sont des techniques immunologiques dans lesquelles un des constituants (Ag ou Ac) est **marqué par une enzyme**.
- Les enzymes communément utilisées: **phosphatase alcaline, peroxydase, β -galactosidase**.
- Le marquage par ces enzymes ne doit pas affecter ni la spécificité ni l'affinité des Ac ni la structure de l'Ag.
- Pour chaque enzyme utilisée, il faut ajouter dans le milieu **un substrat chromogène** qui, lorsqu'il est dégradé par l'enzyme donne **un produit de couleur différente et absorbant de la lumière à une certaine longueur d'onde**.
- Technique **qualitative** (lecture à l'œil nu) ou **quantitative** (mesure de la densité optique grâce à la spectrophotométrie)



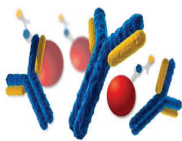
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques quantitatives

ELISA

(ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

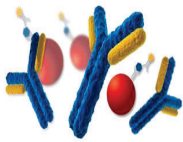


Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

1. Techniques ELISA

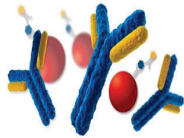
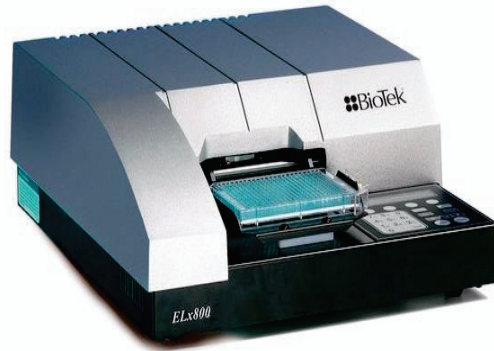
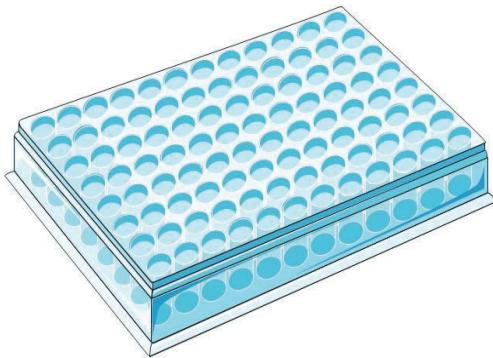
- Techniques largement utilisées
- Bonne sensibilité, spécificité
- Réalisées dans des plaques de microtitration dont le matériau permet la fixation des protéines (Ag ou Ac)
- Plusieurs variantes méthodologiques: par compétition, indirecte, type sandwich.
- La révélation de la réaction Ag-Ac repose sur la mesure de la densité optique du produit généré à l'aide d'un spectrophotomètre (lecteur de plaques ELISA)
- La détermination de concentration est assurée par l'utilisation d'une courbe d'étalonnage.



Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

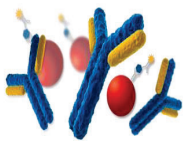
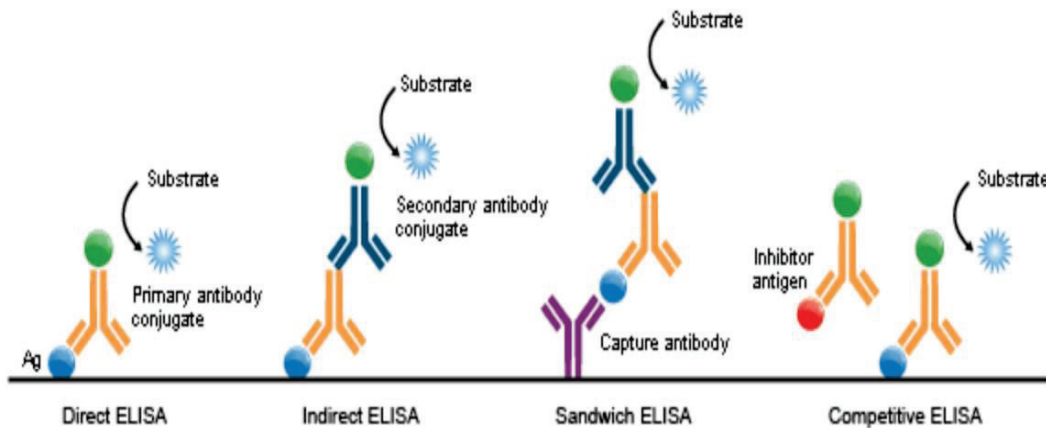
1. Techniques ELISA



Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

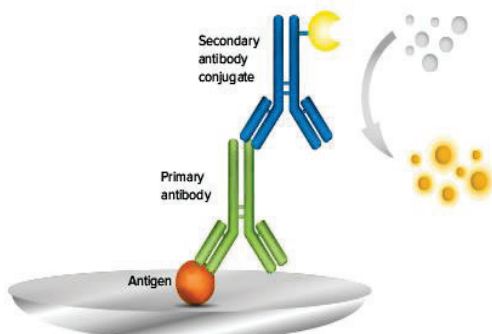


Les techniques Immuno-enzymatiques

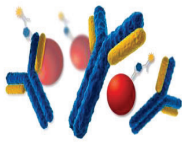
II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

1-ELISA indirecte



- Utilisée pour la recherche des **Ac**.
- Peut être quantitative ou qualitative.
- L'Ac recherché est fixé à la plaque grâce à l'interaction des Fab avec l'Ag présent dans la plaque.
- L'ajout d'un autre **Ac marqué** dirigé contre le Fc de l'Ac recherché permet de visualiser la réaction



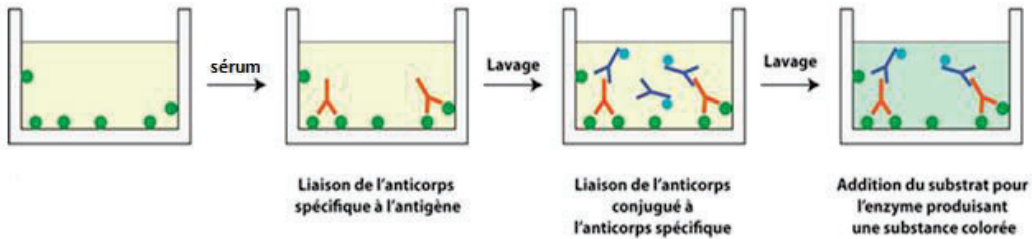
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

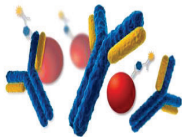
2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

1-ELISA indirecte

En pratique



DO avec le lecteur de plaque
La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré

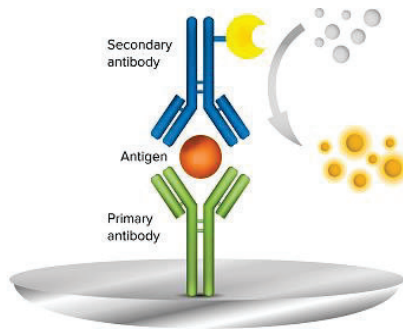


Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

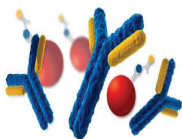
2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

2-ELISA Sandwich



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

La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré

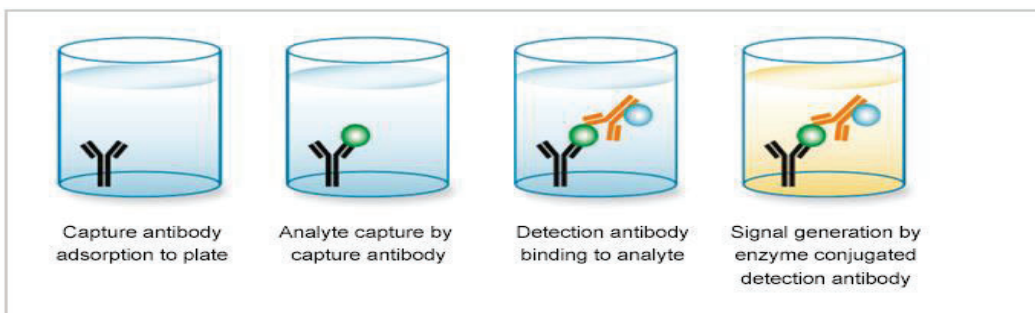


Les techniques Immuno-enzymatiques

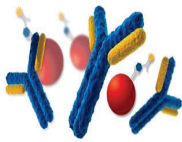
II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

2-ELISA Sandwich



La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré



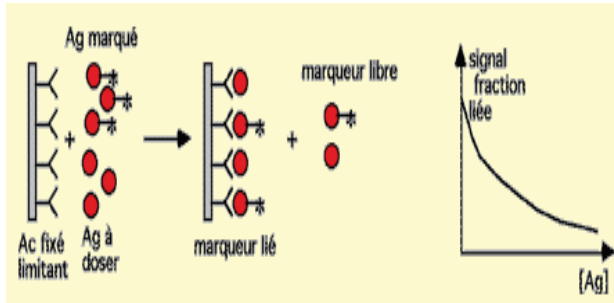
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

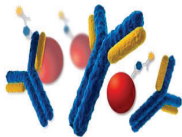
3-ELISA par compétition

Exemple: dosage d'un Ag



- **Principe:** basé sur une compétition entre Ag marqué et l'Ag non marqué vis-à-vis de sites limités d'Ac.
- Ac: quantité limitée.
- Ag-Enzyme : quantité constante limitée

La DO est indirectement proportionnel à la quantité d'Ag mesuré

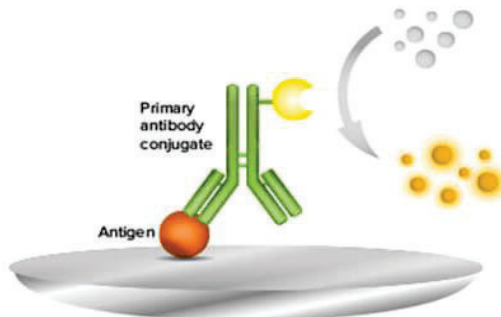


Les techniques Immuno-enzymatiques

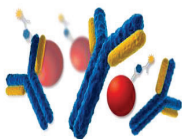
II . Méthodes

Techniques qualitatives

1-ELISA Directe



- Utilisée en immunohistochimie.
- Recherche d'Ag présent dans un tissu à l'aide d'un anticorps spécifique conjugué à une enzyme.
- Lecture au microscope optique.



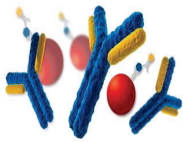
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques qualitatives

Western Blot (Immuno empreinte)

- Technique immunoenzymatique réalisée sur des membranes de nitrocellulose.
- La préparation des membranes passe par deux étapes:
 - **Séparation électrophorétique** par SDS-PAGE (Haute résolution)
 - **Transfert des bandes d'Ag sur la membrane de nitrocellulose** (blotting)
- **La détection de la protéine d'intérêt** est ensuite réalisée sur la membrane, de manière directe grâce à des anticorps spécifiques couplés à un traceur ou de manière indirecte en utilisant alors un anticorps spécifique et un anticorps secondaire couplé à un traceur enzymatique (permettant la production d'un précipité coloré).
- Cette technique est **qualitative**, voire **semi-quantitative**.

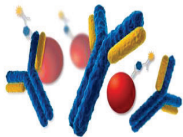
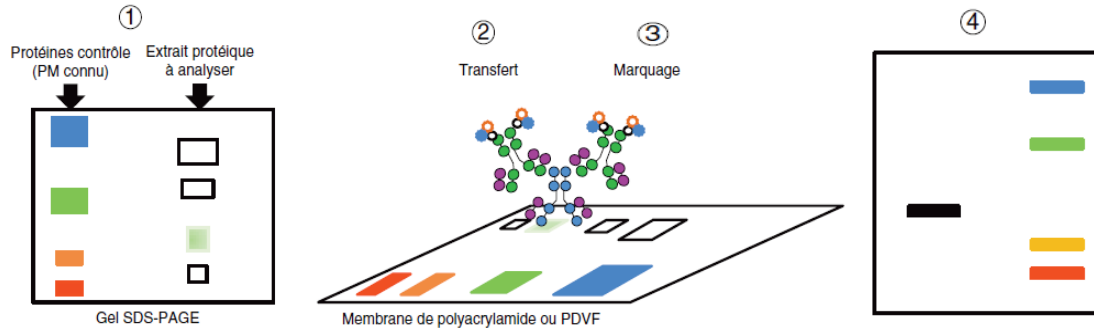


Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques qualitatives

Western Blot (Immuno empreinte)



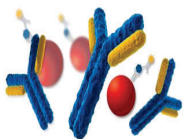
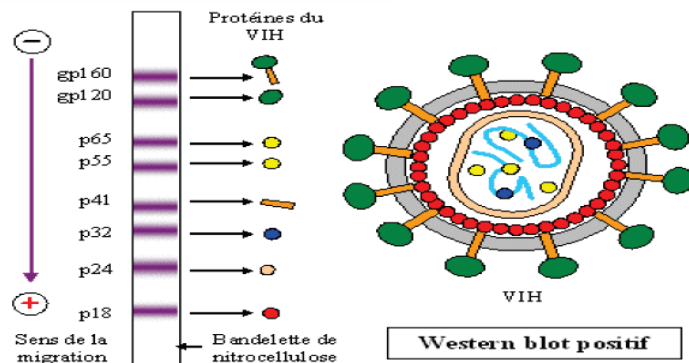
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques qualitatives

Western Blot (Immuno empreinte)

En clinique : la confirmation d'un diagnostic sérologique positif d'infection par le VIH nécessite un western-blot.



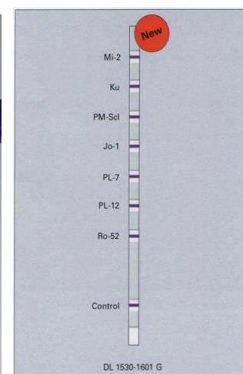
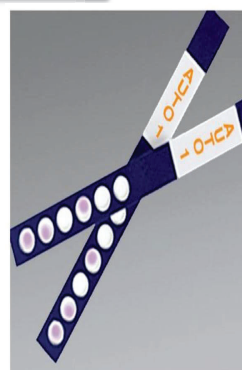
Les techniques Immuno-enzymatiques

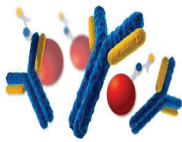
II . Méthodes

Techniques qualitatives

Immunodot

- L'immunodot (*dot-blot*), est une technique dérivée du western-blot dans laquelle **les antigènes** sont directement déposés sur des bandelettes de nitrocellulose. (Il n'y a pas de séparation préalable des protéines sur gel).
- Il s'agit d'une technique immunoenzymatique de type indirect.
- Utilisée pour la détection d'Ac.
- Un résultat positif se présente sous forme d'un cercle ou trait coloré.





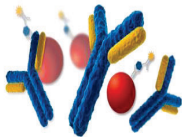
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques qualitatives

Elispot

- Variante de la technique Elisa utilisée pour la détection des cellules productrices de cytokines.
- Le puits de la plaque est couvert d'Ac anti-cytokine recherchée dans lequel sont cultivées les cellules du patient.
- Les cytokines produites seront captées par les Ac présents dans le puits dans l'endroit de leur production.
- On continue les étapes de l'ELISA sandwich habituelle.
- Le résultat positif se traduit par l'apparition de spots colorés dont chacun correspond à une cellule productrice.

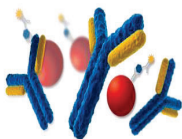
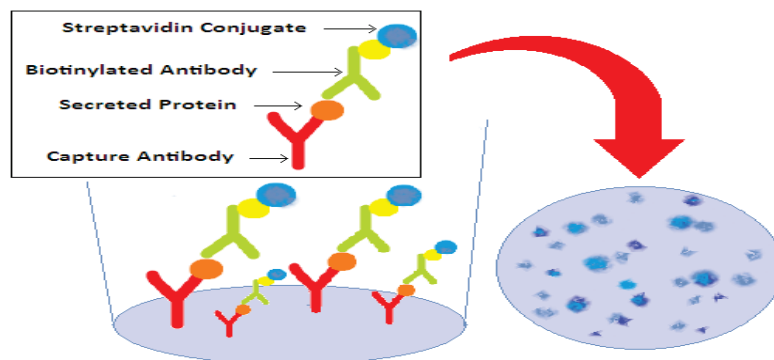


Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques qualitatives

Elispot



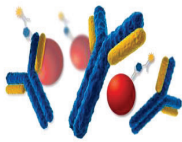
Les techniques Immuno-enzymatiques

III . Amplification du signal des techniques immuno-enzymatiques

Système streptavidine/biotine

- **Streptavidine**: protéine microbienne caractérisée par sa forte affinité pour la biotine. Chaque molécule de streptavidine peut fixer quatre molécules de biotine.
- **Biotine**: vitamine se fixant à la streptavidine de manière non-covalente mais avec une forte affinité.
- Ce système est utilisé pour **augmenter la sensibilité** des techniques ELISA en **marquant l'Ag ou l'Ac par la streptavidine** puis **on ajoute l'enzyme fixée à la biotine**.

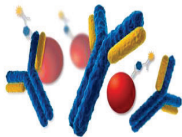
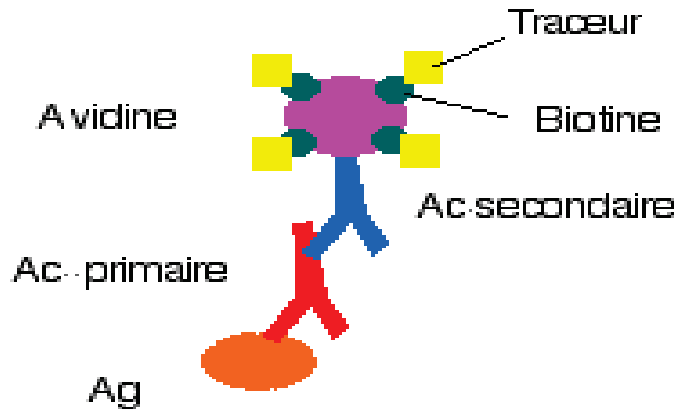




Les techniques Immuno-enzymatiques

III . Amplification du signal des techniques immuno-enzymatiques

Système streptavidine/biotine



Les techniques Radio-immunologiques

I . Généralités

Principe :

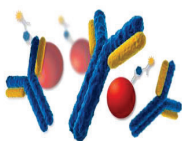
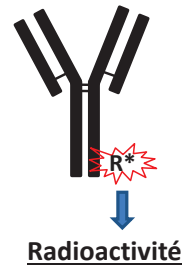
- Méthode de dosage et d'analyse quantitative .
- Réaction antigène-anticorps associée à un marqueur radioactifs (un radio-isotope).
- Caractérisée par sa **grande sensibilité** et sa **grande spécificité**.

Les marqueurs radioactifs :

émettent un signal physique direct, il est détecté par la mesure de la radioactivité dont l'amplitude est proportionnelle (directement ou inversement) à la quantité du marqueur radioactif.

Les isotopes radioactifs utilisés

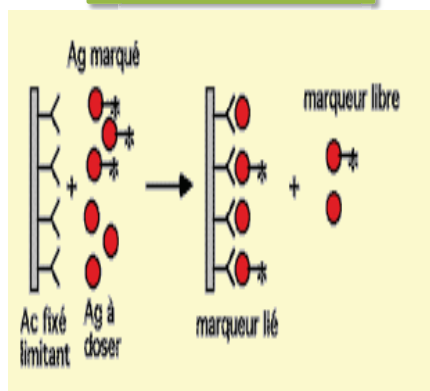
- ^{125}I : émetteur γ , E = 35 KeV, T = 60 j (c'est le plus utilisé)
- ^3H (Tritium) : émetteur β , E = 19 KeV, T = 12,3 ans



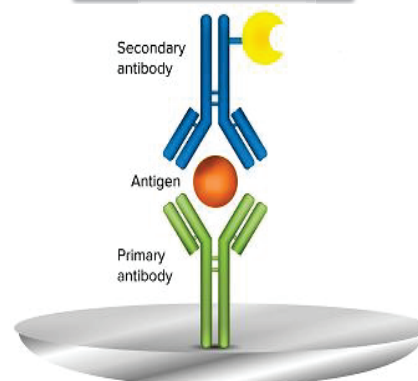
Les techniques Radio-immunologiques

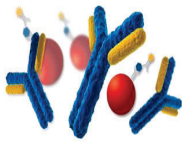
II . Méthodes

Par compétition



Sandwich

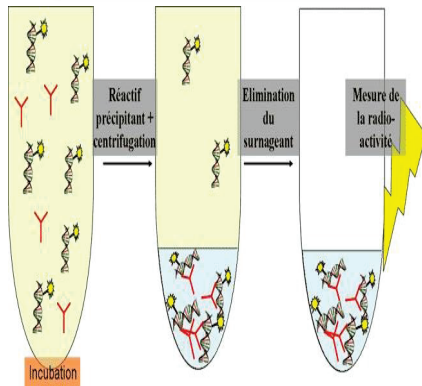




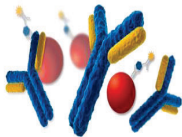
Les techniques Radio-immunologiques

II . Méthodes

Immuno-précipitation en milieu liquide (Test de Farr)

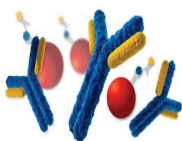


- Le test de Farr est une technique de dosage radio-immunologique :utilisée pour la détection des Ac anti-ADN , elle utilise de l'ADN double brin marqué par un radio-isotope.
- Elle se déroule en 4 étapes :
 - Incubation du sérum du patient avec l'ADN double brin marqué
 - Séparation des complexes immuns par précipitation et centrifugation
 - Elimination de l'ADN double brin marqué non lié à un anticorps
 - Mesure de la radioactivité (proportionnalité entre la radioactivité mesurée et la quantité d'anticorps présents dans le sérum)



Les techniques Radio-immunologiques

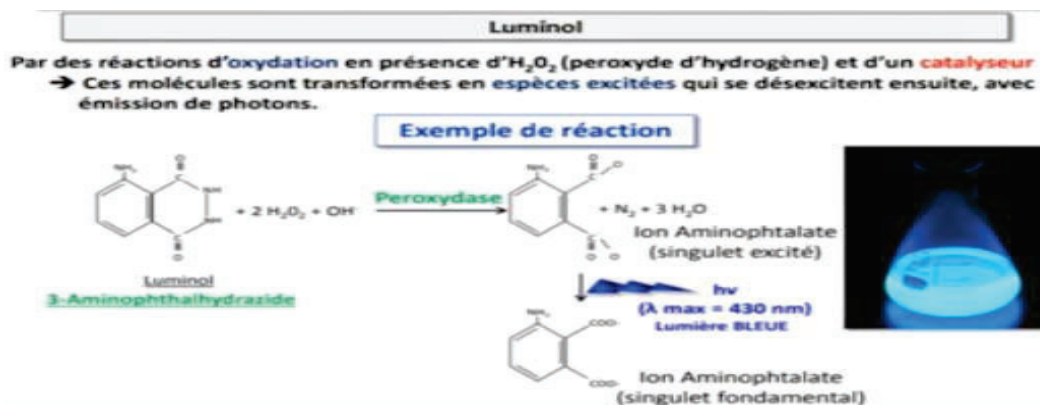
- Ces techniques ont été progressivement supplanté par l'emploi de marqueurs non isotopiques (enzymatiques et luminescents) offrant une plus grande facilité d'emploi **sans les restrictions réglementaires liées à la manipulation des produits radioactifs.**

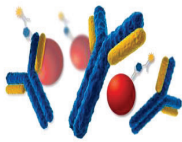


Les techniques de chimiluminescence

Principe :

- La **chimiluminescence**, ou **chimioluminescence**, est la production de lumière à la suite d'une réaction chimique. Exp:





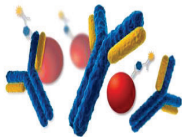
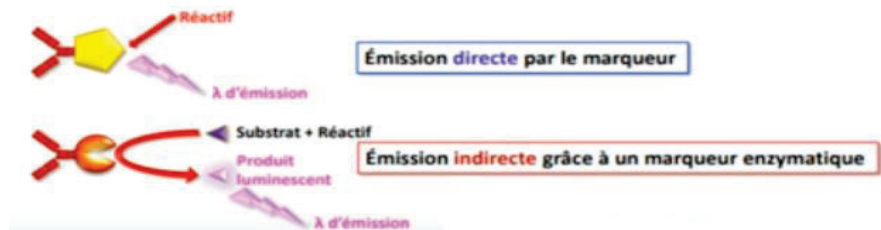
Les techniques de chimiluminescence

Principe :

- La chimiluminescence se caractérise seulement par un spectre d'émission
- L'émission de la lumière commence directement après le début de la réaction chimique

L'émission lumineuse peut provenir soit:

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



Les techniques de chimiluminescence

Principe :

- La lecture est rapide, car l'émission lumineuse est fugace et d'intensité maximale fluctuante (variable au cours de la réaction)
- Il est impératif donc que la lecture se fasse par un automate.

