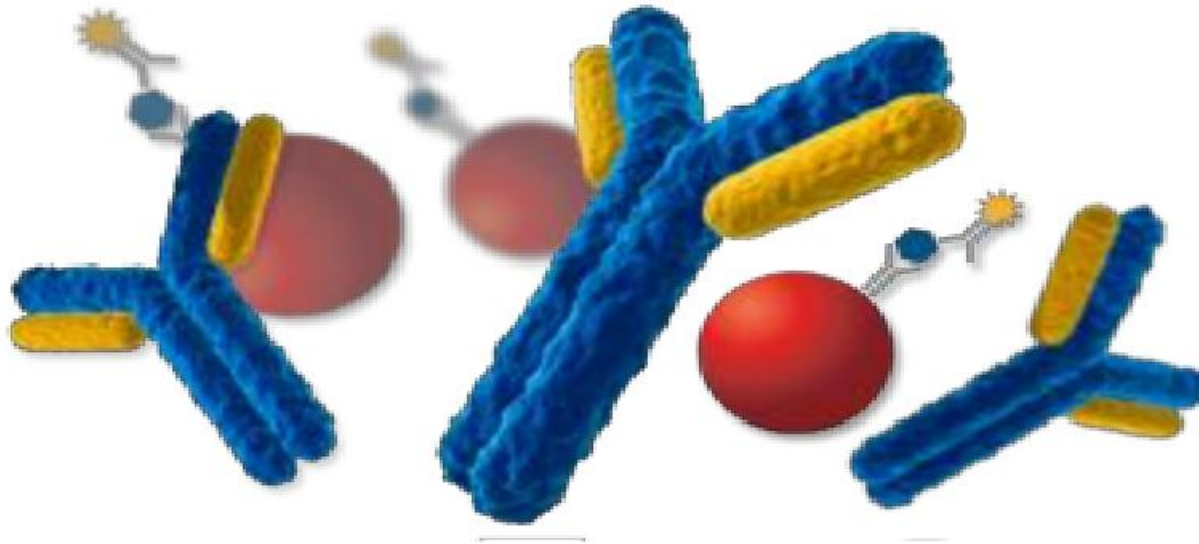
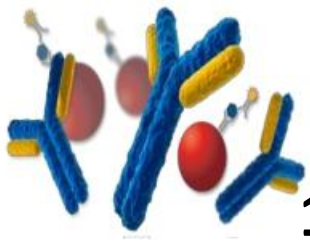


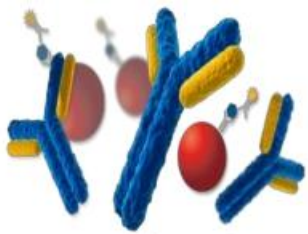
Les techniques immunologiques





Plan

- 1. Introduction: La réaction anticorps-antigène** Aspect et caractéristiques
- 2. Techniques immunologiques sans marquage :**
 1. Techniques d'immunoprécipitation
 2. Techniques d'immunoagglutination
- 3. Techniques immunologiques avec marquage :**
 1. Techniques d'immunofluorescence
 2. Techniques immuno-enzymatiques
 3. Techniques radio-immunologiques
 4. Techniques de chimiluminescence



Introduction

Les Techniques immunologiques

Réactions Antigène-Anticorps

Sans Marquage

Immunoprécipitation
(en milieu liquide)

Immunodiffusion
(en milieu gélifié)

Agglutination

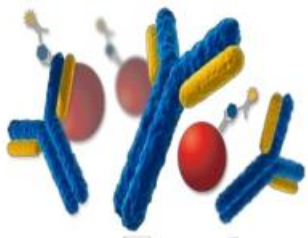
Avec Marquage

Immunofluorescence

Immuno-enzymatiques

Radio-immunologique

Chimiluminescence



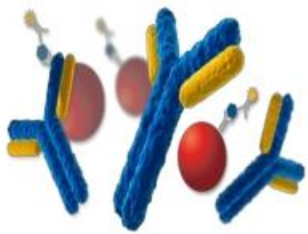
Introduction

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

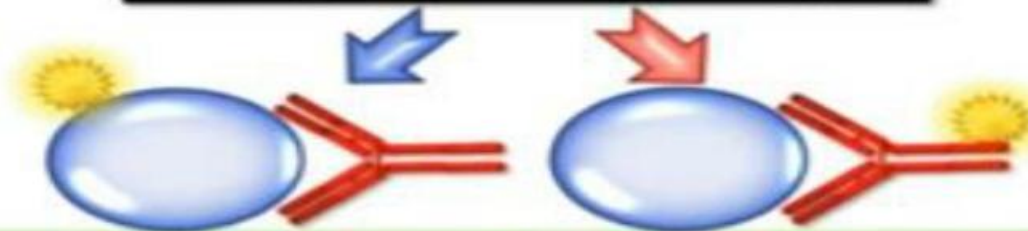
Les Techniques immunologiques

Réactions Antigène-Anticorps

Avec Marquage
Avec Marquage

Antigène – Anticorps

Antigène*



Anticorps*

Marqueur (TRACEUR)

F

Fluorochrome

- Fluorescéine
- Rhodamine

Immunofluorescence

E

Enzyme

- Peroxydase
- PAL

Immuno-Enzymologie

R

Radio-Isotope

- H³
- I¹²⁵

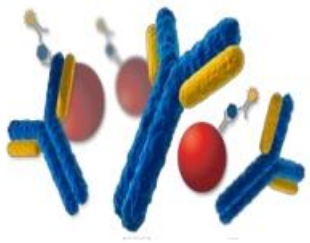
Radio-Immuno

C

Chimiluminescent

- Phthalhydrazide
- Esters d'Acridinium

Chimiluminescence



Les techniques d'immunofluorescence

- Plan:

- I. Aspects fondamentaux:

- 1- Phénomène de la fluorescence.

- 2- Les Fluorochromes

- 3- Système optique de détection de fluorescence

- II. Méthodes:

- Immunofluorescence directe

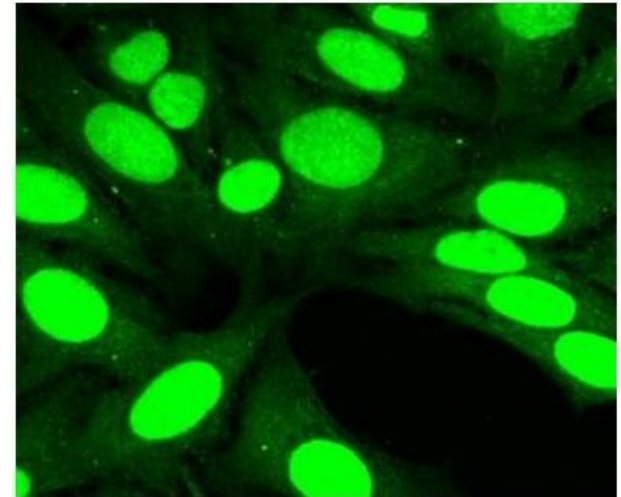
- Immunofluorescence indirecte

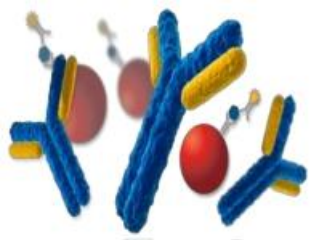
- III. Applications

- 1- Autoimmunité

- 2- Microbiologie

- 3- Immunocytochimie





Les techniques d'immunofluorescence

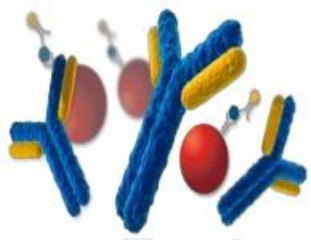
I . Aspects fondamentaux

1. Phénomène de fluorescence



1944: Albert Coons (λ émise $>$ λ absorbée).

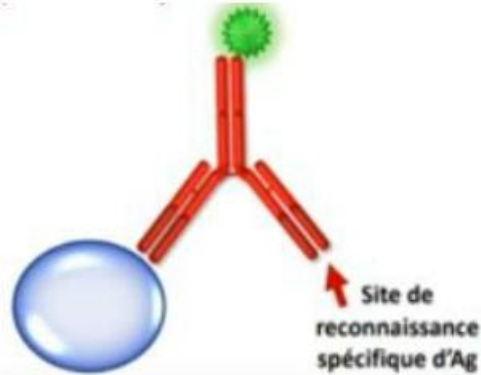
- **Les Ac** pouvaient être marqués par des molécules qui ont la propriété d'être fluorescentes, appelées **Fluorophores** ou **Fluorochromes**.
- Elles absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde (**excitation**) passent à un état excité, et qui, pour revenir à l'état fondamental, émettent une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



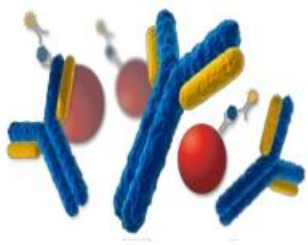
Les techniques d'immunofluorescence

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.

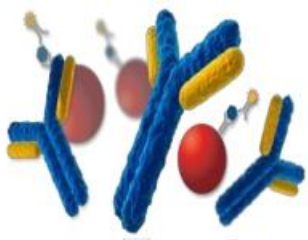
Etat de base — Etat excité
Energie

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

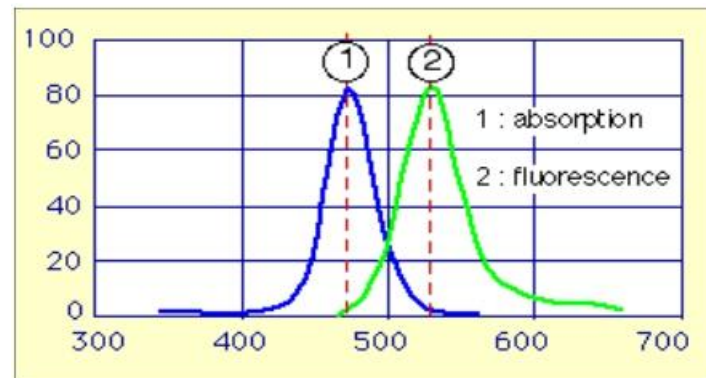
2.2. Principaux fluorochromes utilisés :

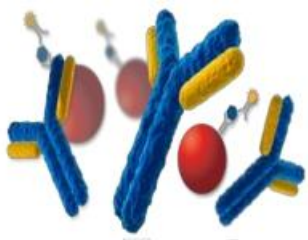
▪ L'isothiocyanate de fluorescéine (ou FITC) :

- 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

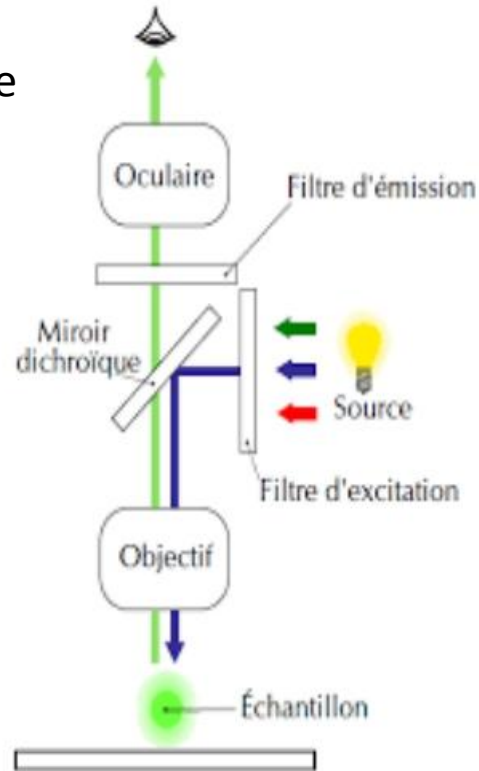
3. Les systèmes optiques de détection de fluorescence

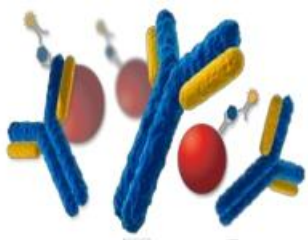
- une **source de lumière** : est équipé d'un jeu de filtres correspondant au fluorochrome utilisé.

- 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.





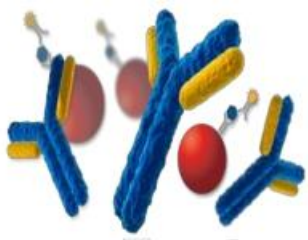
Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

Immunofluorescence sur frottis ou sur coupe
Immunofluorescence sur frottis ou sur coupe

**Immunofluorescence Directe
(IFD)**

**Immunofluorescence Indirecte
(IFI)**

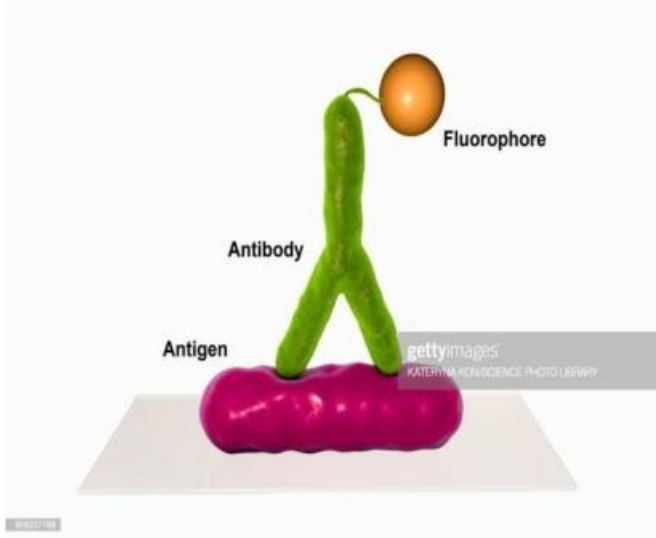


Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

1-Immunofluorescence Directe

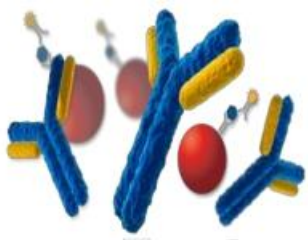
Mise en évidence de l'Antigène



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

Applications:

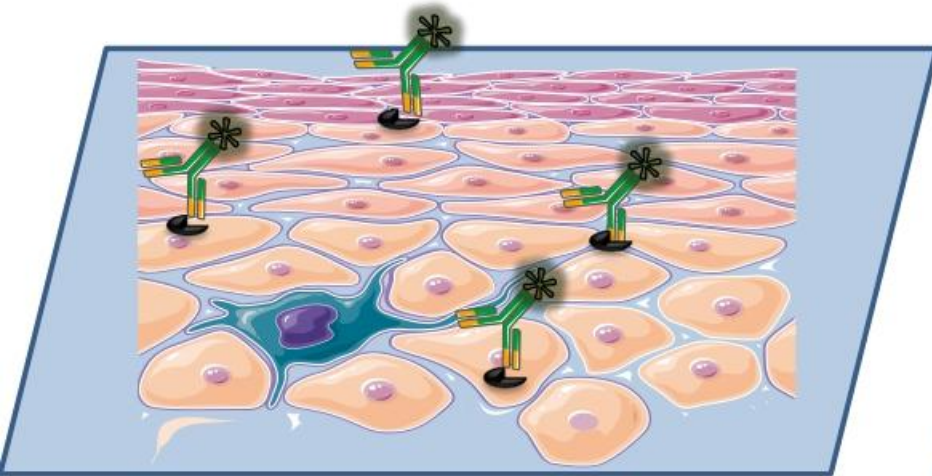
- Identifier un germe.
- Analyser dans une biopsie tissulaire les dépôts d'immunoglobulines et de complément.
- Le phénotypage des populations lymphocytaires B et T.



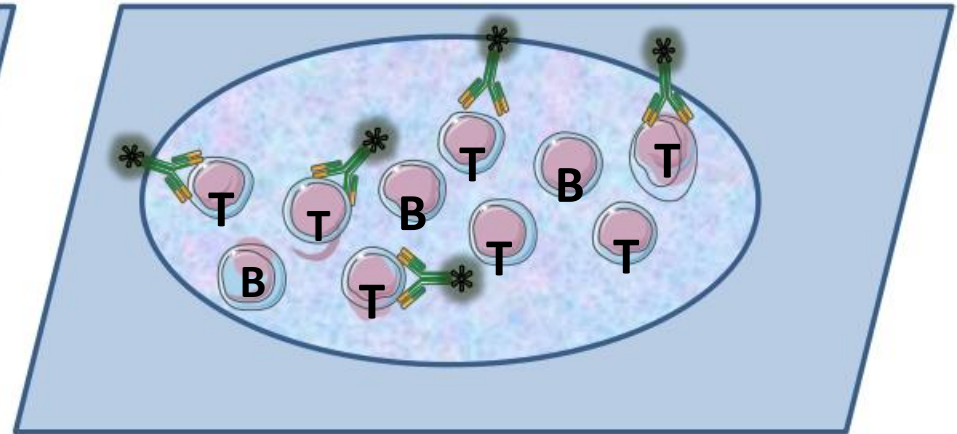
Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

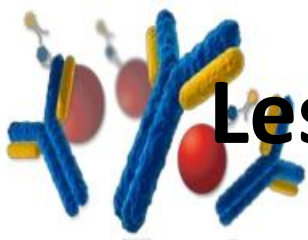
1-Immunofluorescence Directe 1-Immunofluorescence Directe



Recherche de dépôts de
composants du complément



phénotypage des populations
lymphocytaires B et T



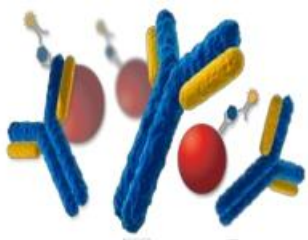
Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

2-Immunofluorescence Indirecte

Mise en évidence de l'Antigène

Mise en évidence de l'Anticorps
dans le sérum

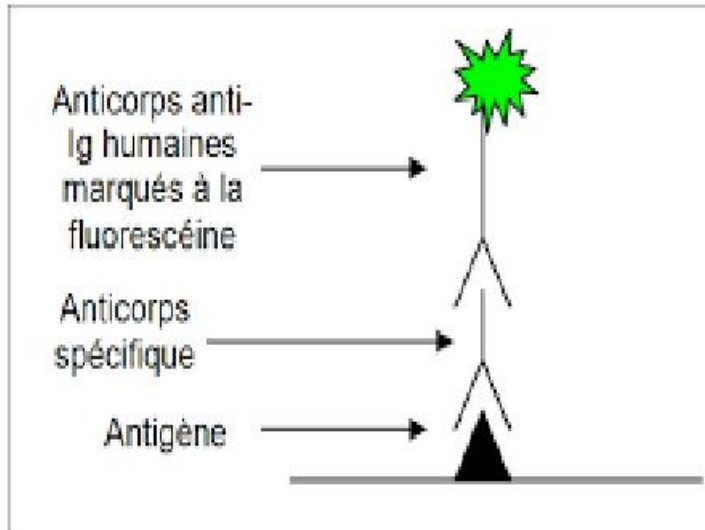


Les techniques d'immunofluorescence

II . Méthodes

2-Immunofluorescence Indirecte

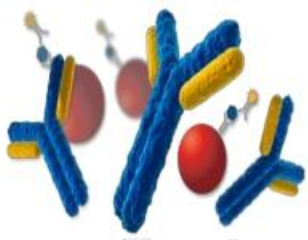
Mise en évidence de l'Antigène



- 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 multiples molécules de fluorochrome se lient à chaque molécule d'Ac primaire. (Le 1^{er} Ac sert ici d'Ag avec plusieurs sites Agénik)

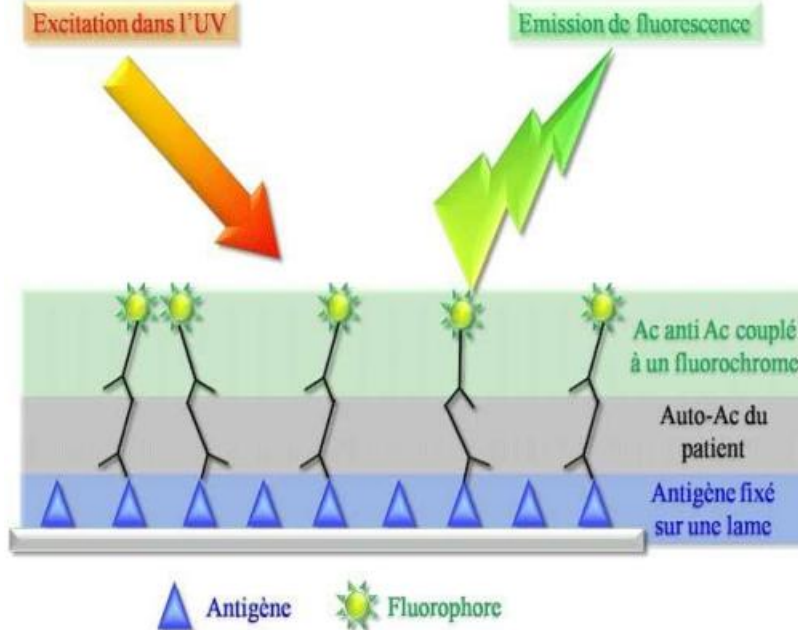


Les techniques d'immunofluorescence

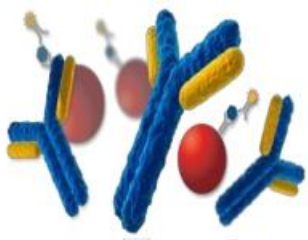
II . Méthodes

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

Méthodes

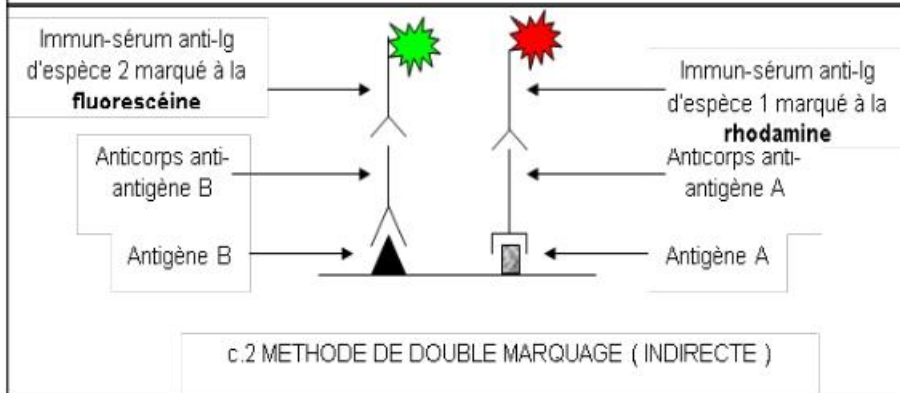
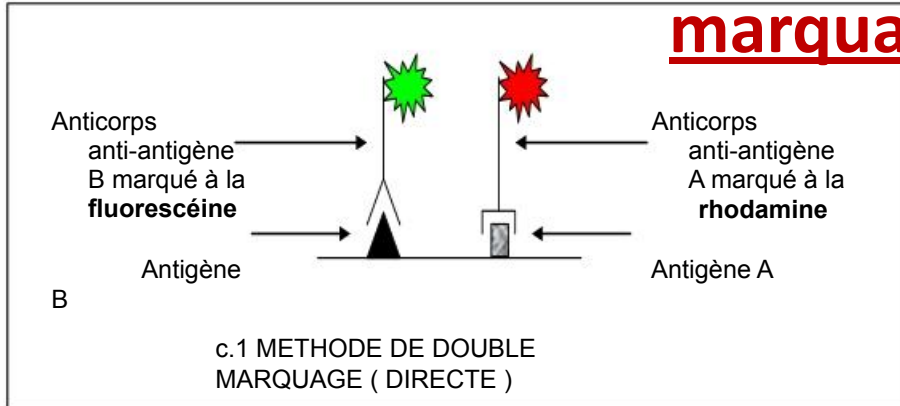
double marquage :

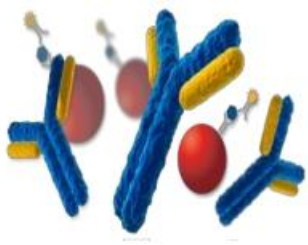
Utilisation de plusieurs marqueurs fluorescents dans la même réaction

- 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





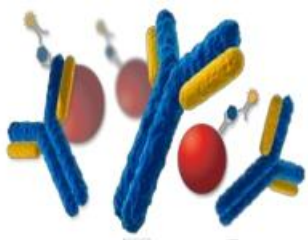
Les techniques d'immunofluorescence

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)

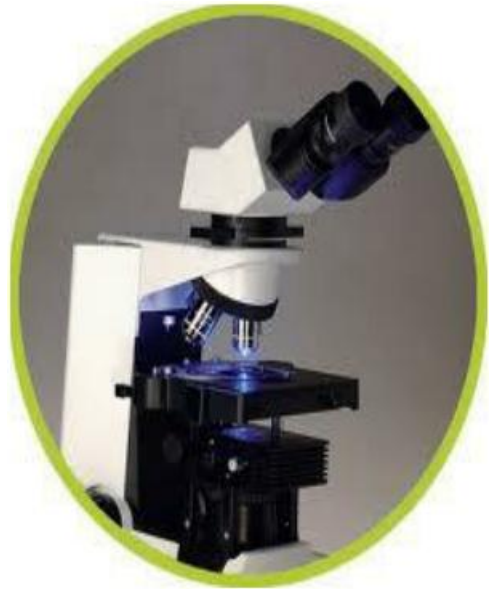
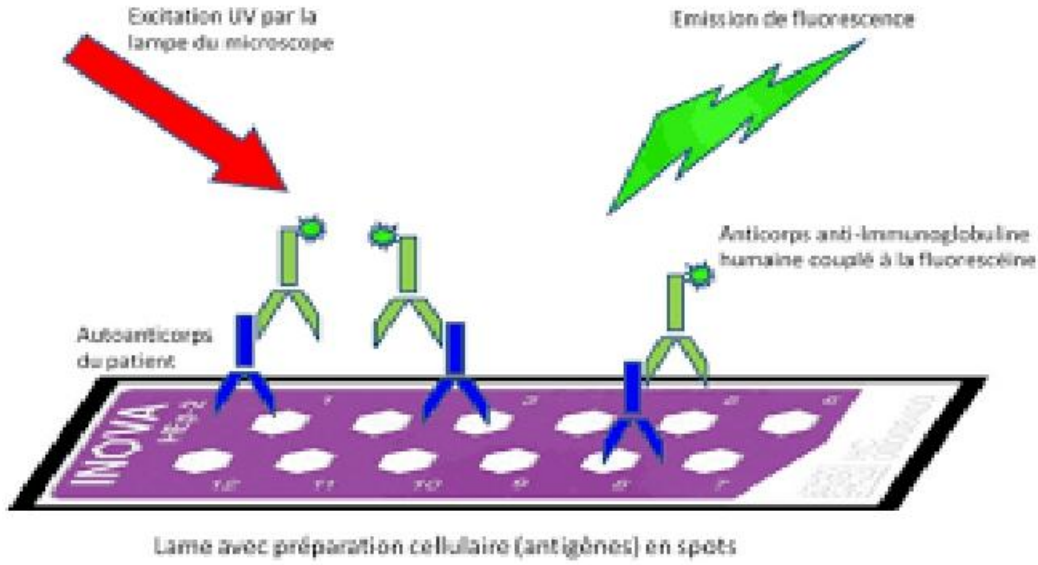
Une fluorescence perceptible d'auto-Ac est suivie d'une dilution du sérum de $\frac{1}{2}$ en $\frac{1}{2}$ jusqu'à extinction de la fluorescence.
- Le titre de l'Auto-Ac recherché correspond à l'inverse de la dernière dilution donnant une fluorescence.

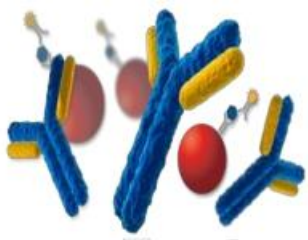


Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

1-Autoimmunité





Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

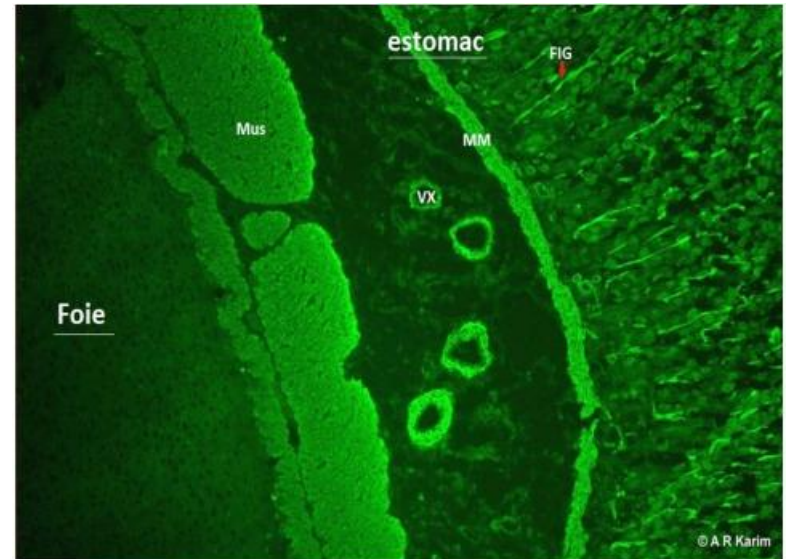
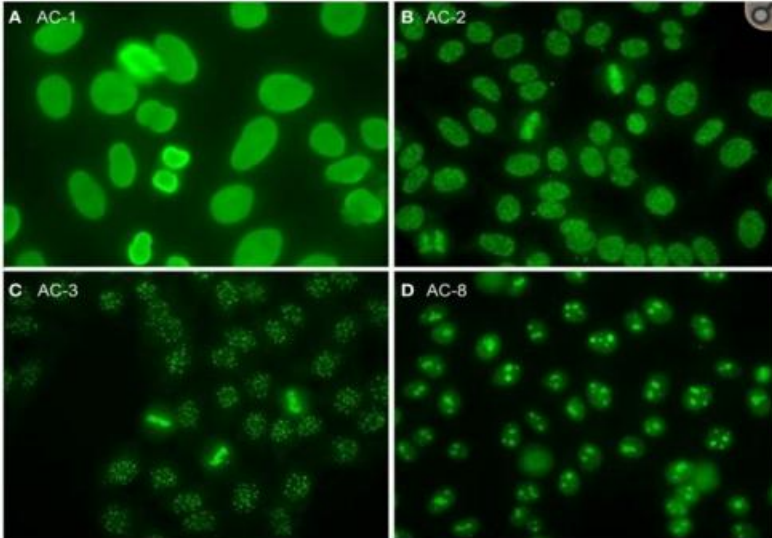
1-Autoimmunité

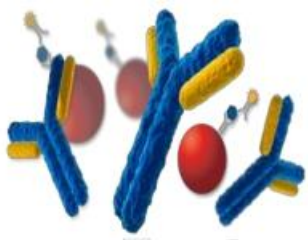
Anticorps antinucléaires

Anticorps spécifiques d'organes

IFI sur Cellules Hep2

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





Les techniques d'immunofluorescence

III . Applications

2-Microbiologie

Identification d'un microorganisme

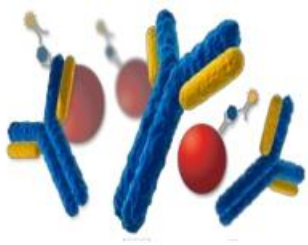
- Immunofluorescence directe permet l'identification des agents infectieux dans tous les liquides biologiques:
 - LCR: Klebsiella pneumoniae, etc..
 - Gorge: Streptocoque A,B,C,G
 - Prélèvement génitaux, urines, selles, etc

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

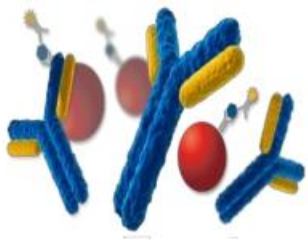
L'immunofluorescence permet:

-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 anatomo-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

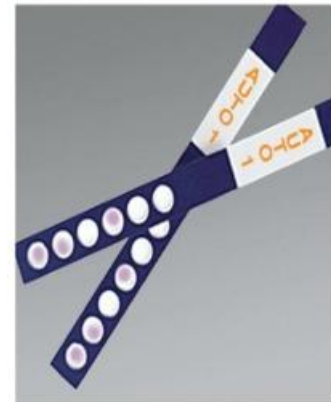
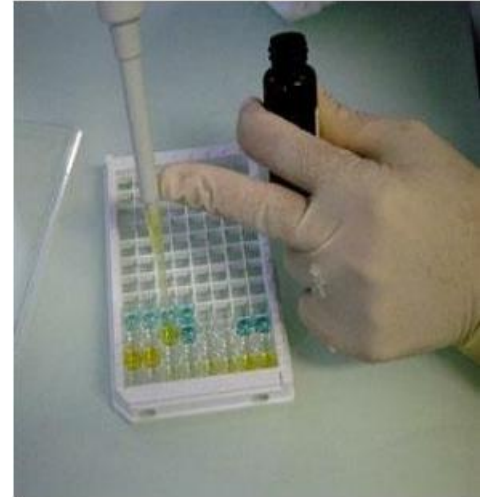
2.1. Technique immunoenzymatique directe

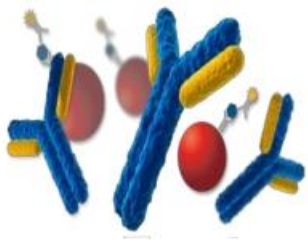
2.2. Western blot

2.3. Immunodot

2.4. Elispot

III. Amplification du signal des techniques immuno-enzymatiques

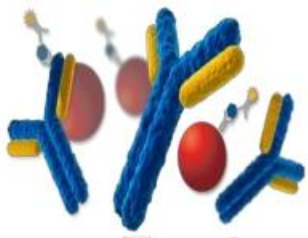




Les techniques Immuno-enzymatiques

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)



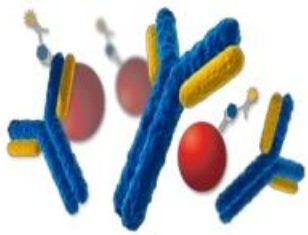
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques quantitatives

ELISA

(ENZYM-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

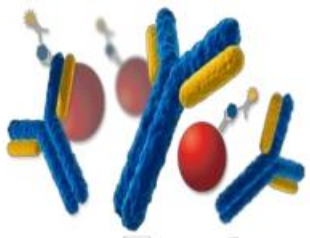


Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

1. Techniques ELISA

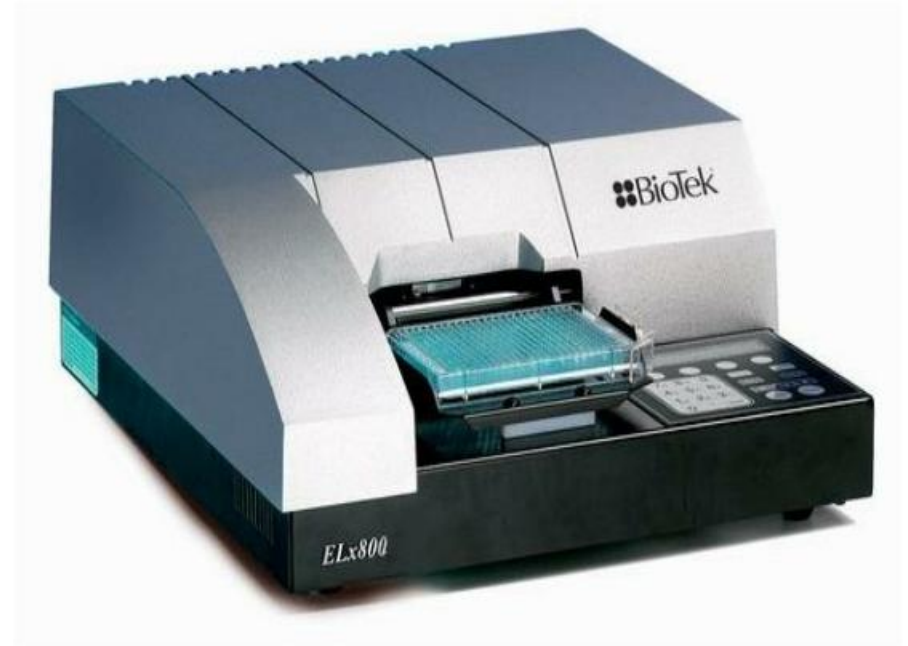
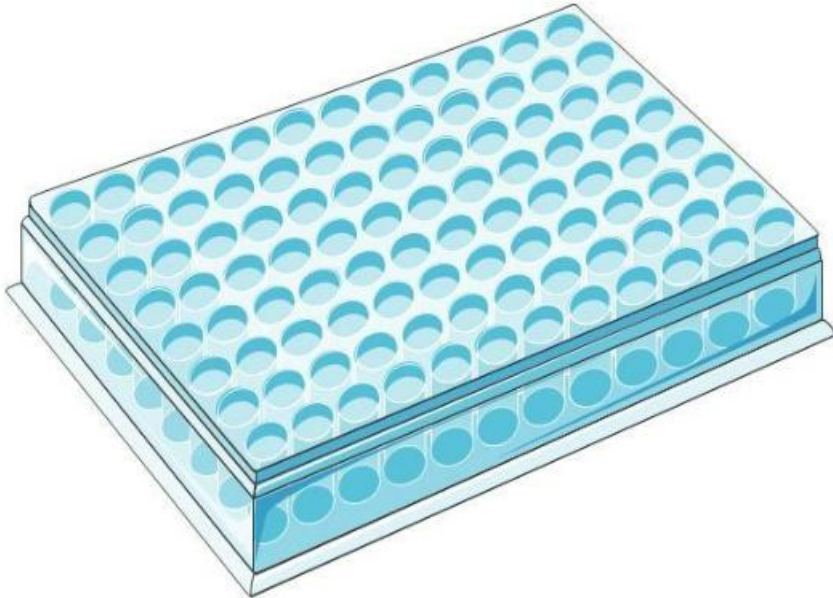
- Techniques largement utilisées
- Bonne sensibilité, spécificité
- Réalisées dans des plaques de microtitration dont le matériau permet la fixation des protéines (Ag ou Ac)
- Plusieurs variantes méthodologiques: par compétition, indirecte, type sandwich.
- La révélation de la réaction Ag-Ac repose sur 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.

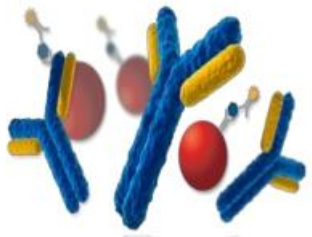


Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

1. Techniques ELISA

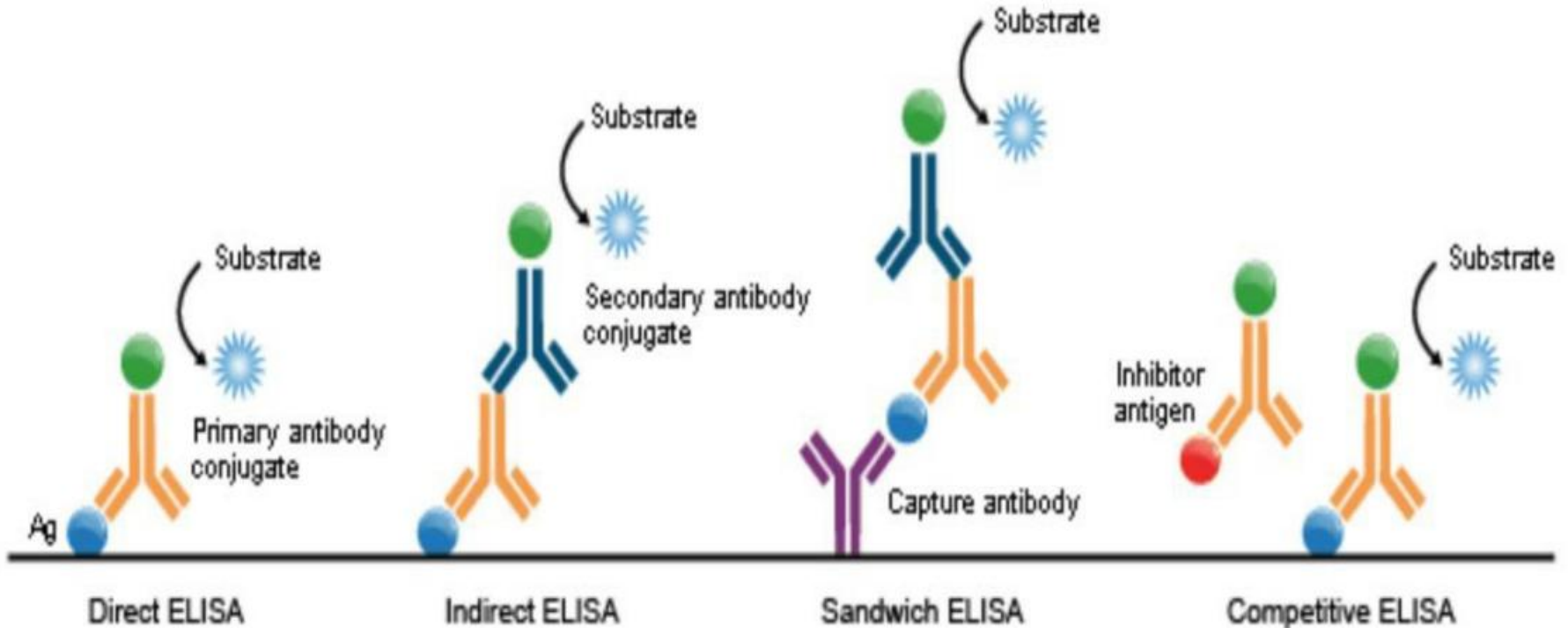




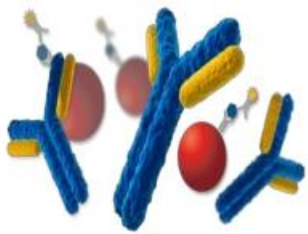
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

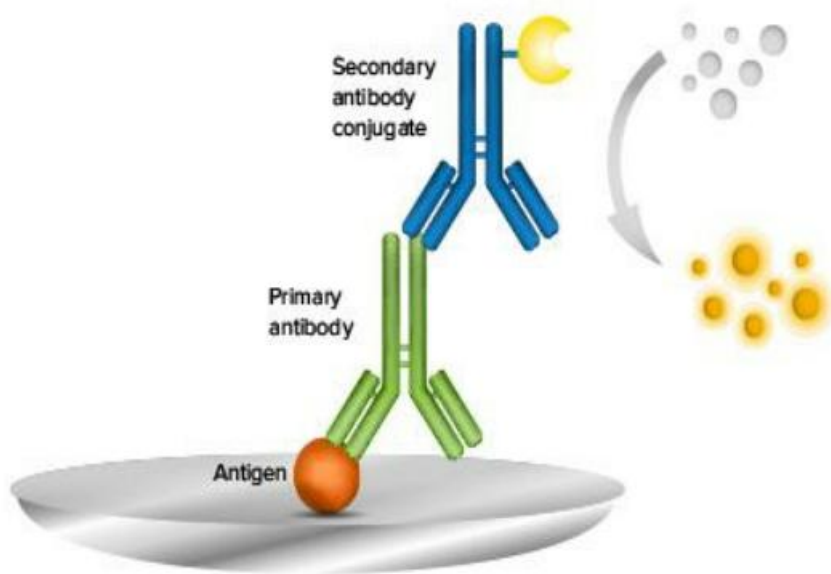


Les techniques Immuno-enzymatiques

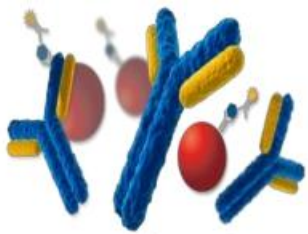


II . Méthodes

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

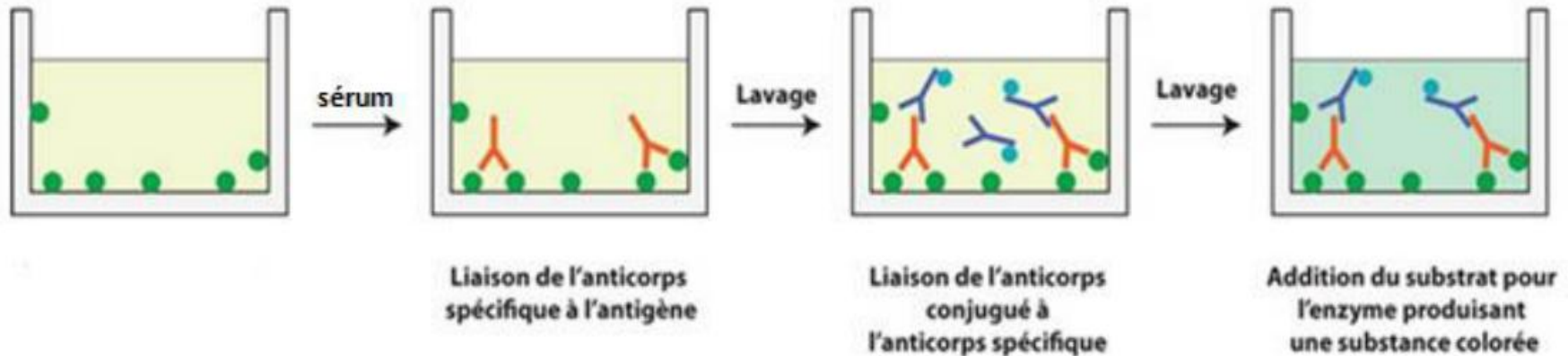


Les techniques Immuno-enzymatiques

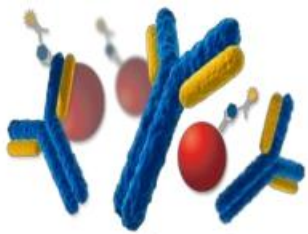
II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

1-ELISA indirecte



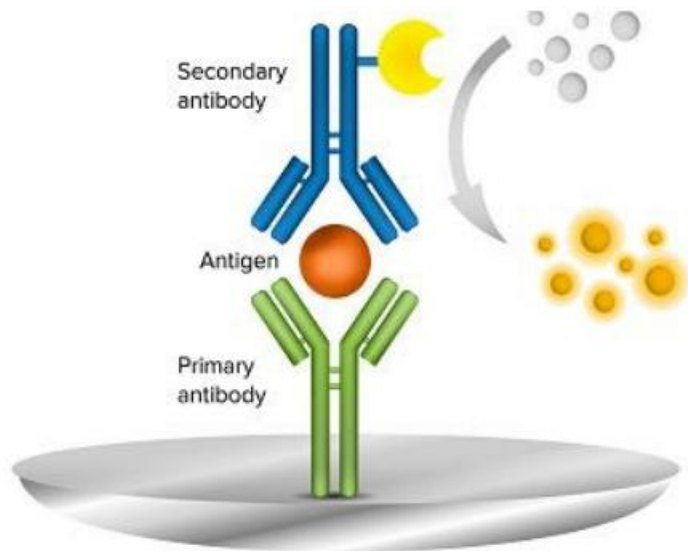
La DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré



Les techniques Immuno-enzymatiques

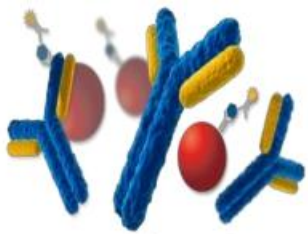
II . Méthodes

2-ELISA Sandwich



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

DO est directement proportionnel à la quantité d'Ac mesuré



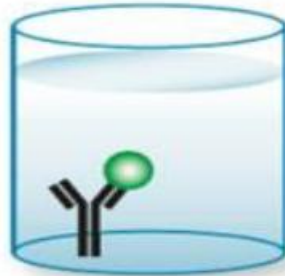
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

2-ELISA Sandwich



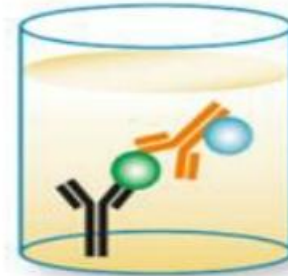
Capture antibody
adsorption to plate



Analyte capture by
capture antibody

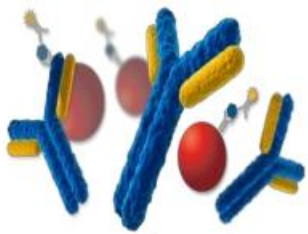


Detection antibody
binding to analyte



Signal generation by
enzyme conjugated
detection antibody

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



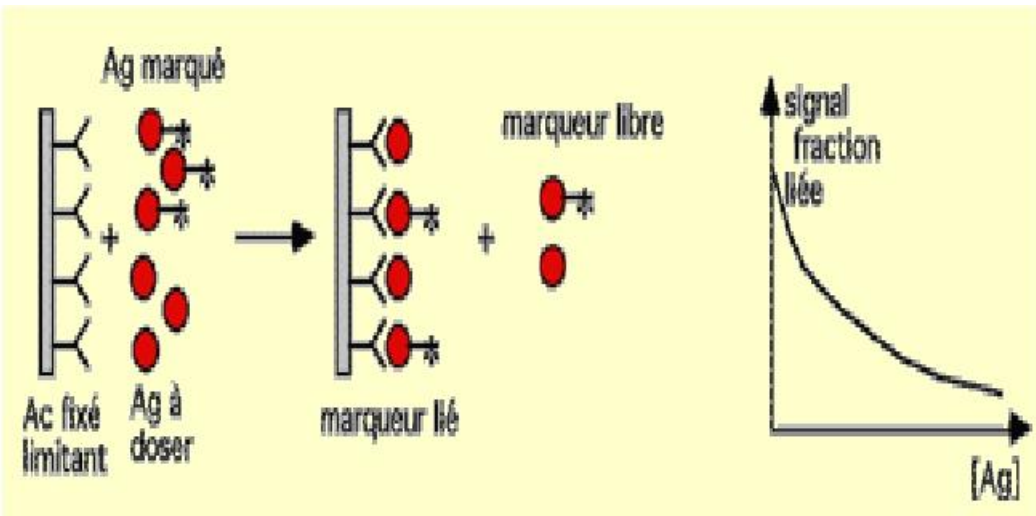
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

2. Les variantes méthodologiques des techniques ELISA

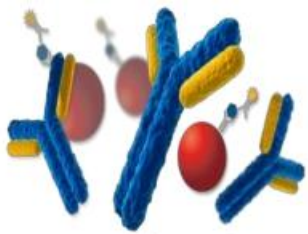
3-ELISA par compétition

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

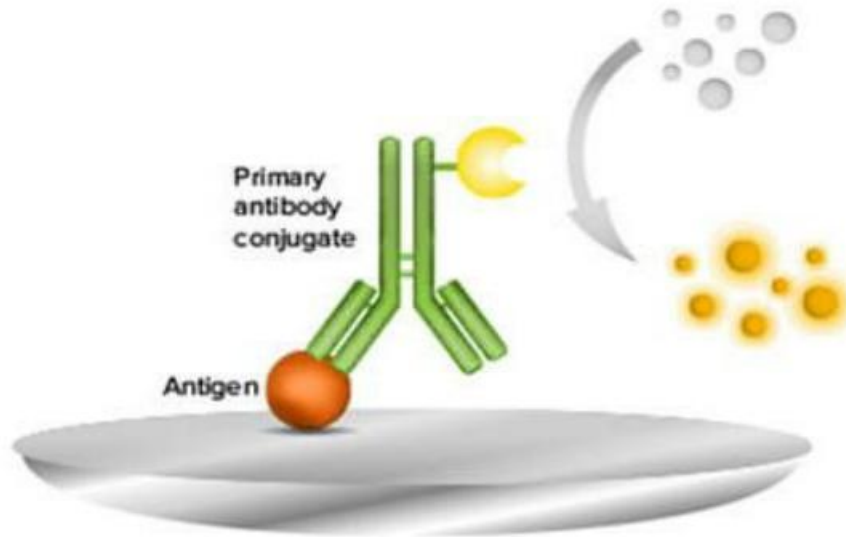


Les techniques Immuno-enzymatiques

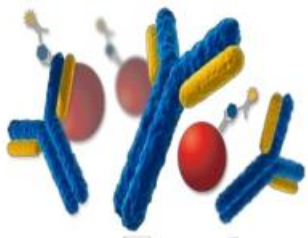
II . Méthodes

Techniques qualitatives

1-ELISA Directe
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.



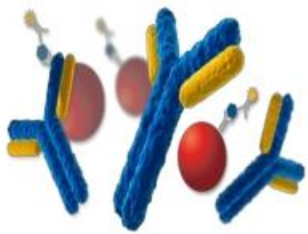
Les techniques Immuno-enzymatiques

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**.

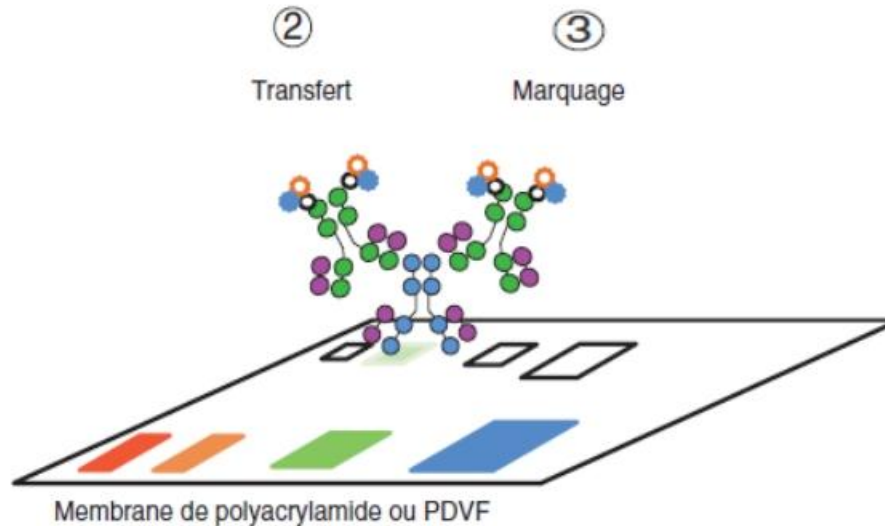
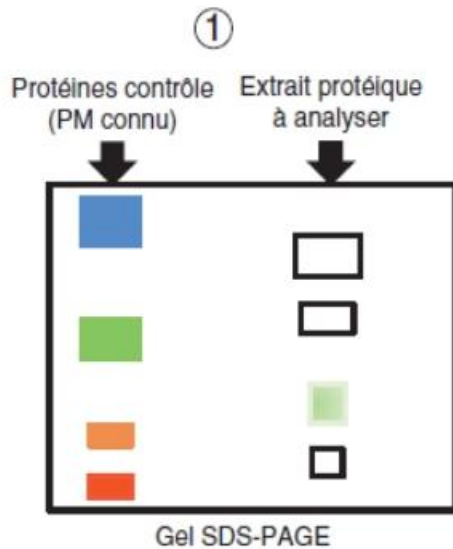


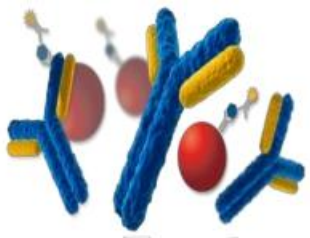
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

Techniques qualitatives

Western Blot (Immuno empreinte)





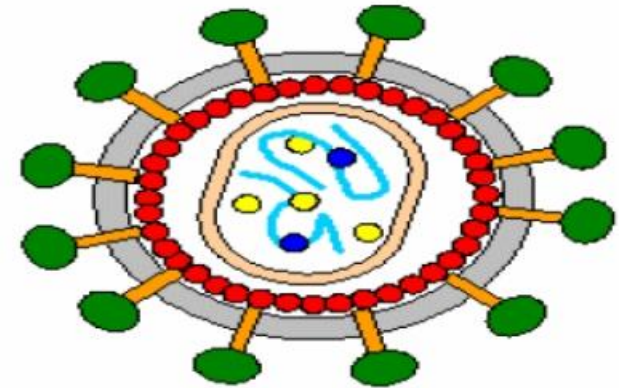
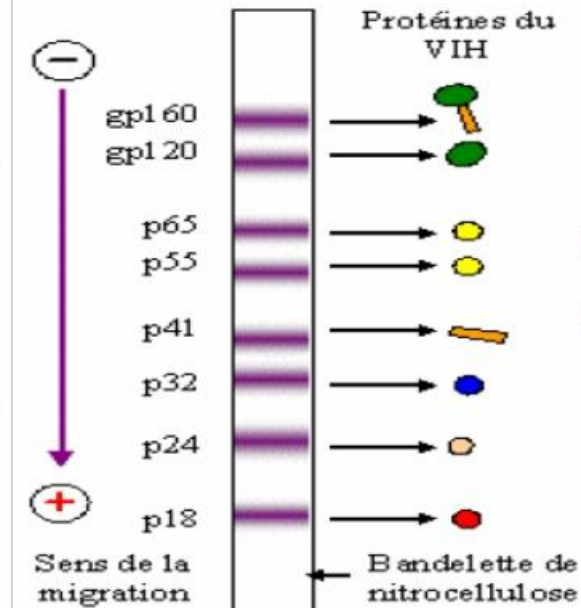
Les techniques Immuno-enzymatiques

II . Méthodes

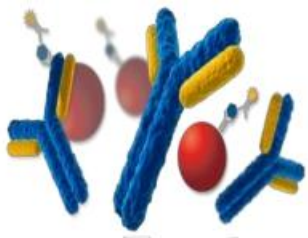
Techniques qualitatives

Western Blot (Immuno empreinte)

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



Western blot positif



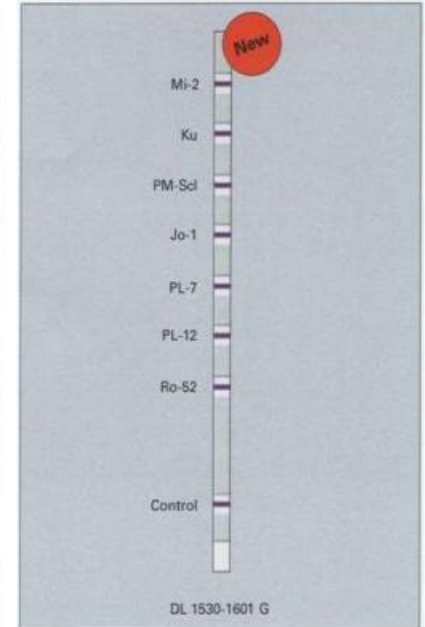
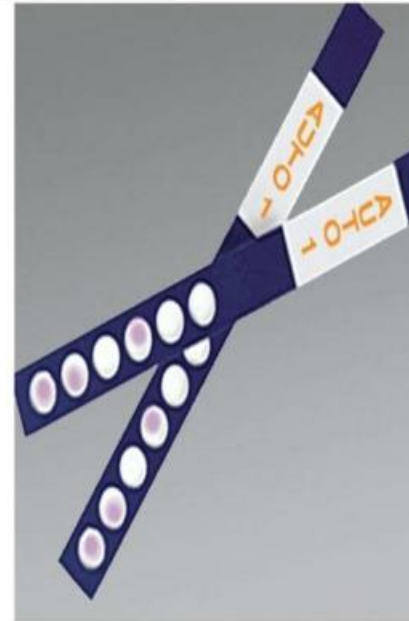
Les techniques Immuno-enzymatiques

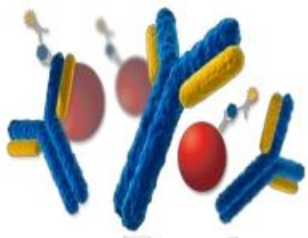
II . Méthodes

Techniques qualitatives

Immuno-dot

- 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.





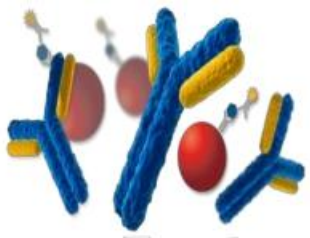
Les techniques Immuno-enzymatiques

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.

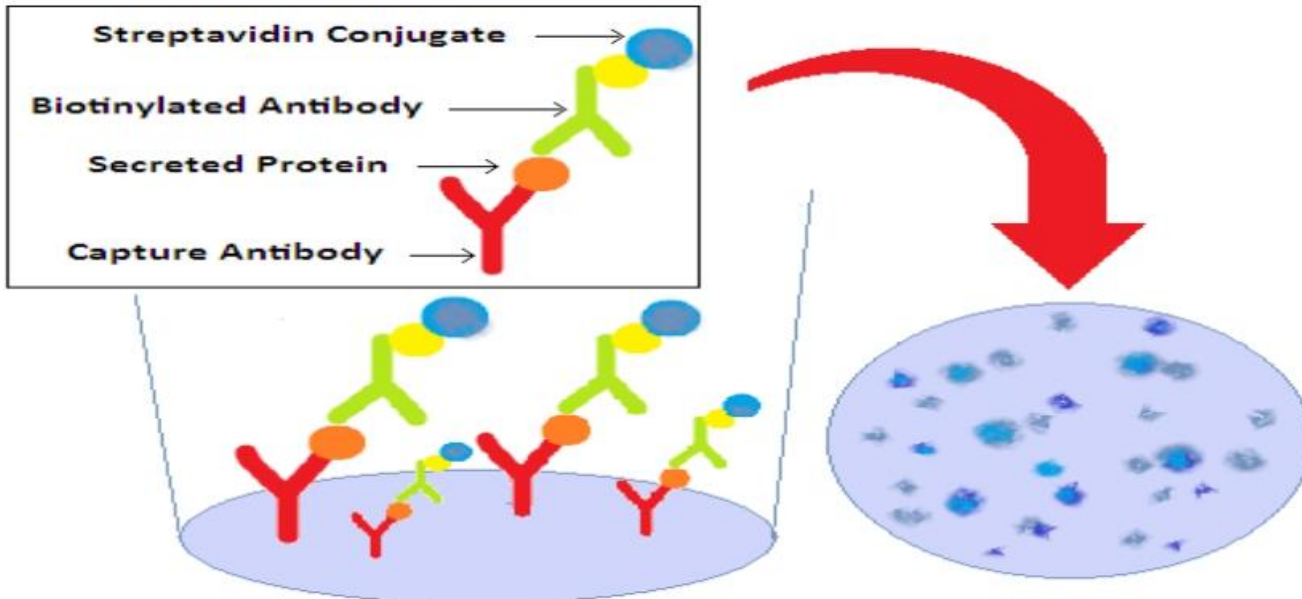


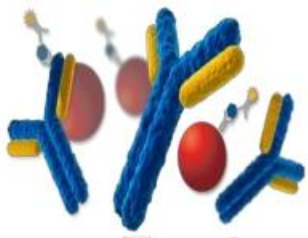
Les techniques Immuno-enzymatiques

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.



Avidin

+

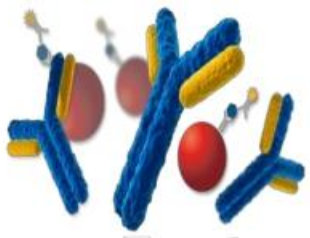


Biotin conjugate

=



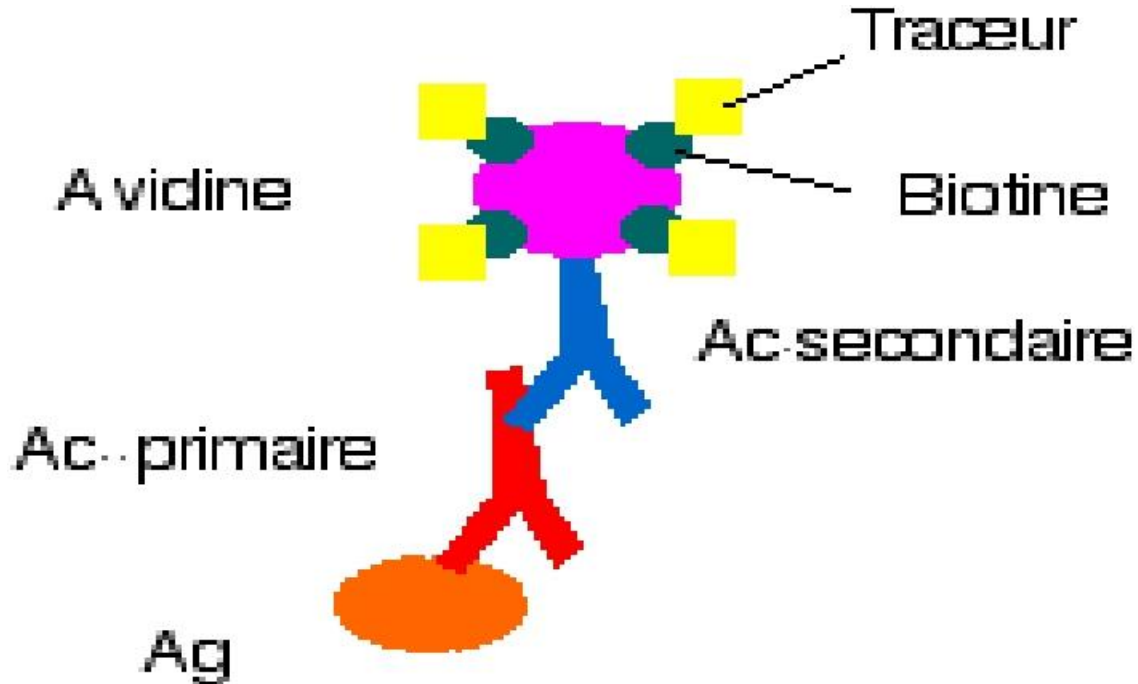
Avidin-Biotin Complex

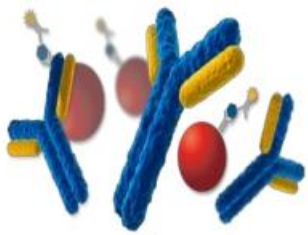


Les techniques Immuno-enzymatiques

III . Amplification du signal des techniques immuno-enzymatiques

Système streptavidine/biotine





Les techniques Radio-immunologiques

Principe :

I . Généralités

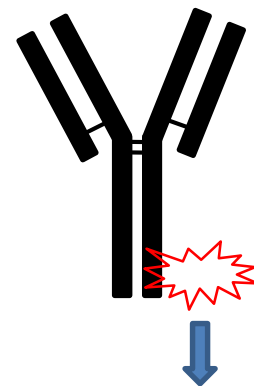
- Méthode de dosage et d'analyse quantitative .
- Réaction antigène-anticorps associée à un marqueur radioactifs (un radio-isotope).
- Caractérisée par sa **grande sensibilité** et sa **grande spécificité**.

Les marqueurs radioactifs :

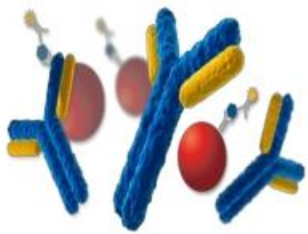
émettent un signal physique direct, il est détecté par la mesure de la radioactivité dont l'amplitude est proportionnelle (directement ou inversement) à la quantité du marqueur radioactif. R^*

Les isotopes radioactifs utilisés

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



Radioactivité



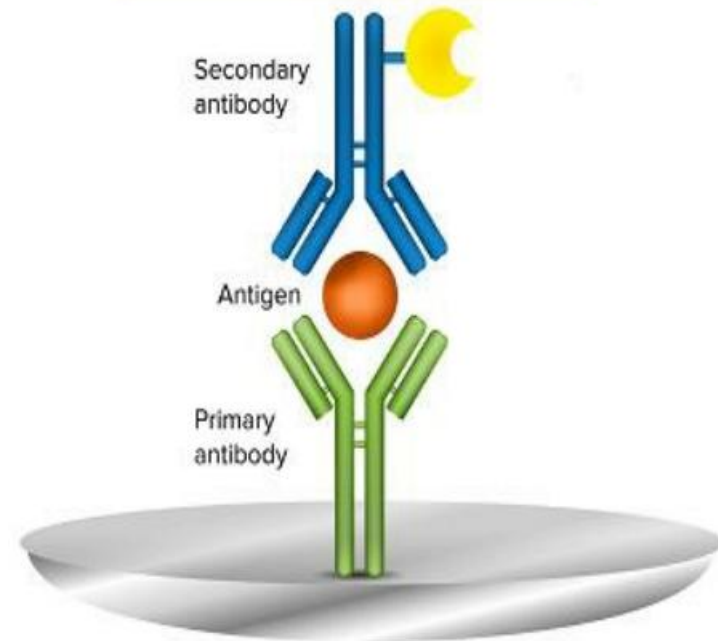
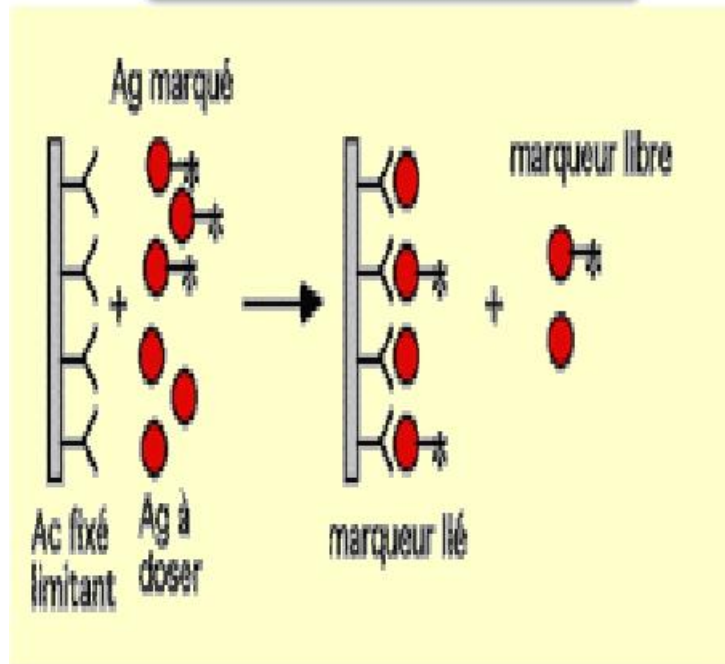
Les techniques Radio-immunologiques

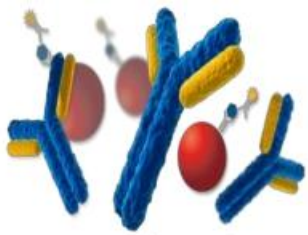
II . Méthodes

Par compétition

Sandwich

Sandwich

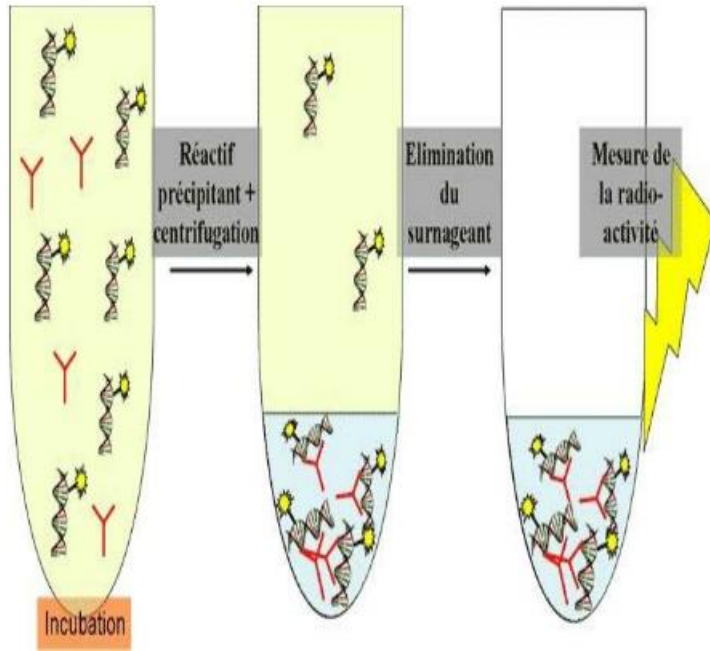




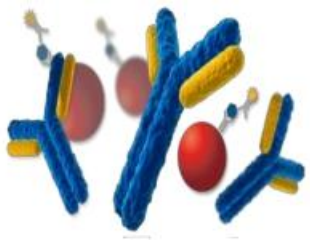
Les techniques Radio-immunologiques

II . Méthodes

Immuno-précipitation en milieu liquide (Test de Farr)

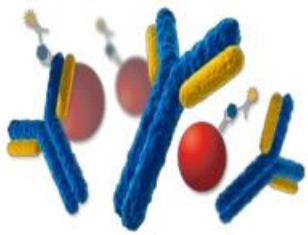


- Le test de Farr est une technique de dosage radio-immunologique : utilisée pour la détection des Ac anti-ADN , elle utilise de l'ADN double brin marqué par un radio-isotope.
- Elle se déroule en 4 étapes :
 - Incubation du sérum du patient avec l'ADN double brin marqué
 - Séparation des complexes immuns 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

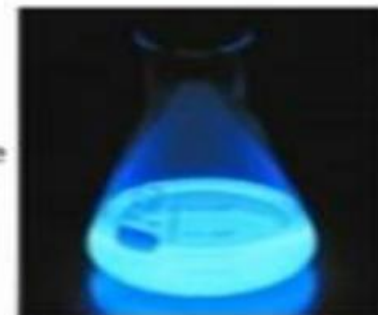
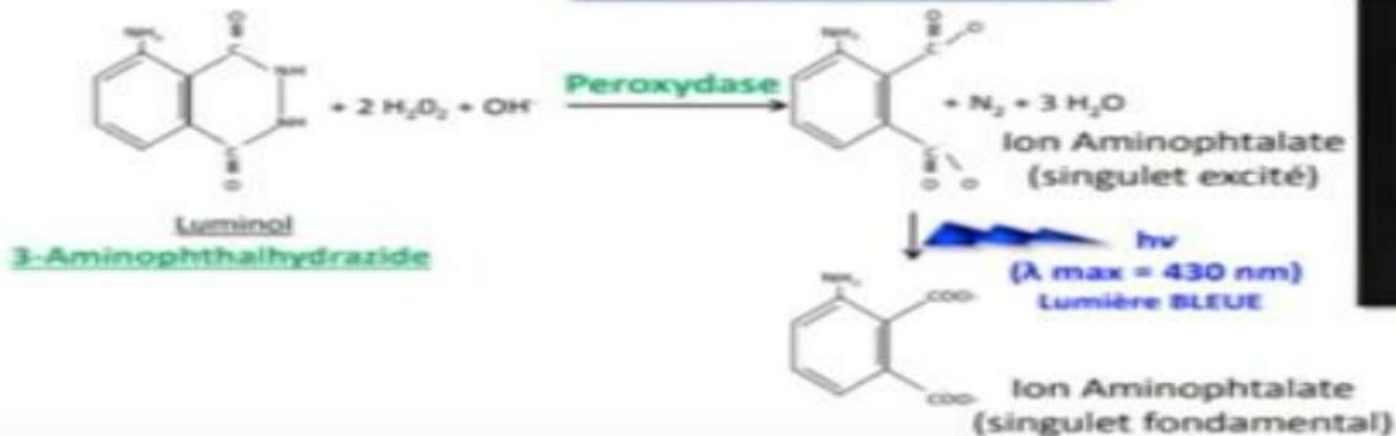
Principe :

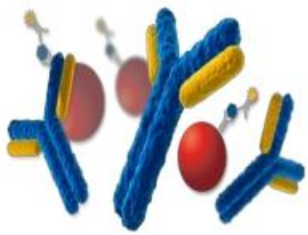
• La **chimiluminescence**, ou **chimioluminescence**, est la production de lumière à la suite d'une réaction chimique. Exp:

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 dés excitent ensuite, avec émission de photons.

Exemple de réaction





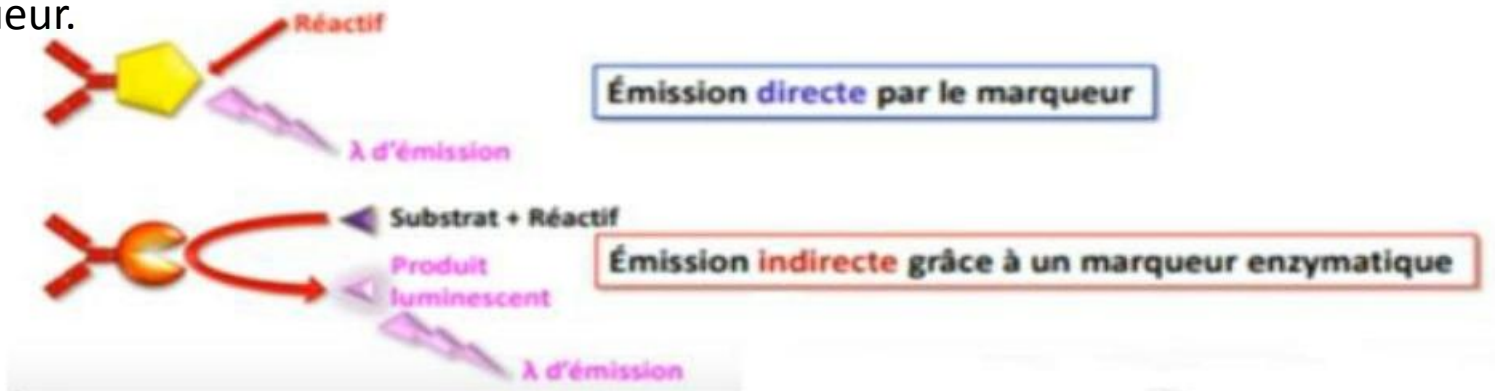
Les techniques de chimiluminescence

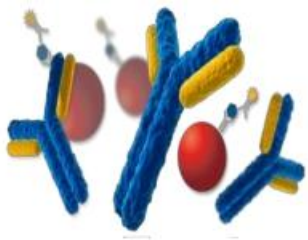
Principe :

- 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.

