

V. Les méthodes immunologiques.

1. Le dosage radio-immunologie : c'est une technique de dosage qui fait appel à la physique nucléaire (radioactivité) et à la l'immunologie. Elle utilise des composés radioactifs associés à des molécules immunologiques (anticorps- antigènes).

1.1. Principe :

La technique consiste à marquer des molécules immunologiques (anticorps- antigènes) avec un radionucléide, qui est généralement de l'iode 131 ou 125 et à détecter les réactions antigène-anticorps qui en résultent.

Soit *in vivo* (injecter antigène directement dans le corps) on obtient alors une reaction local exemple le test d'allergie, soit *in vitro* en plaçant le sérum du sujet en présence de l'antigène radioactif correspondant dans des conditions techniques optimales et de disposer d'un moyen pour observer quantitativement la réaction antigène-anticorps.

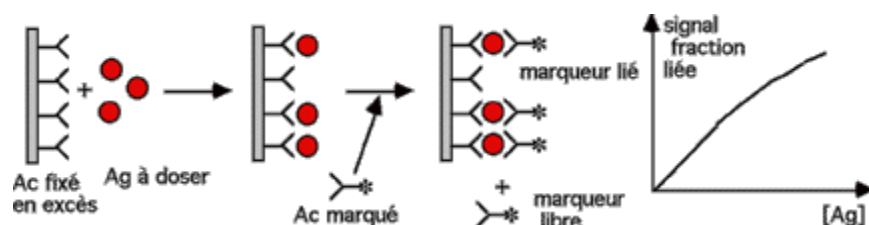
1.2. Différents types d'immunodosages.

On distingue deux grands types d'immunodosage utilisant un marqueur, selon que le réactif est limitant ou en excès par rapport à l'antigène à doser.

a. Dosage avec un excès de réactif : méthodes immun-métriques ou méthodes directes.

La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixé, ces antigènes sont ensuite révélés par des anticorps marqués.

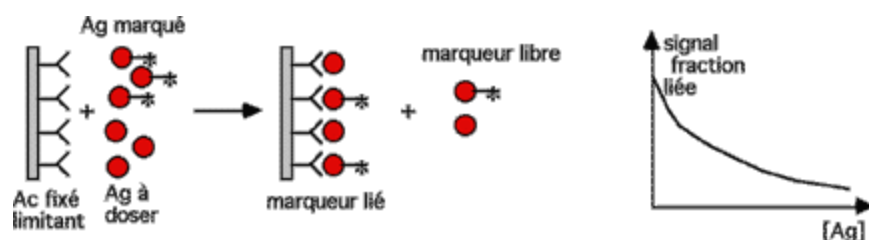
Le dosage consiste à mesurer la fraction liée (Ag à dosé + Ac marqué) qui augmente linéairement avec la concentration en antigène à doser.



b. Dosage avec réactif limitant : méthodes par compétition ou méthodes indirectes.

L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps ; la totalité des sites anticorps disponibles est liée.

Le dosage consiste à mesurer la fraction liée (Ac fixé +Ag marqué) qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser.



1.3. Application :

En médecine nucléaire elle sert à doser de manière très précise des substances biologiques telles que,

les hormones, les enzymes, ou les stéroïdes qui sont contenues dans le sang et les urines.

De nos jours, la méthode immuno-enzymatique ELISA a largement dépassé la radio-immunologie.

2. L'Immuno-enzymatique (ELISA)

Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée (en anglais Enzyme-Linked Immuno Assay) ou ELISA permet de voir une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par un substrat d'une enzyme fixée à l'anticorps secondaire.

2.1. Différents types d'immuno-enzymatique

Il existe plusieurs types de tests ELISA mais le plus couramment utilisé et celui-ci, le test ELISA indirect.

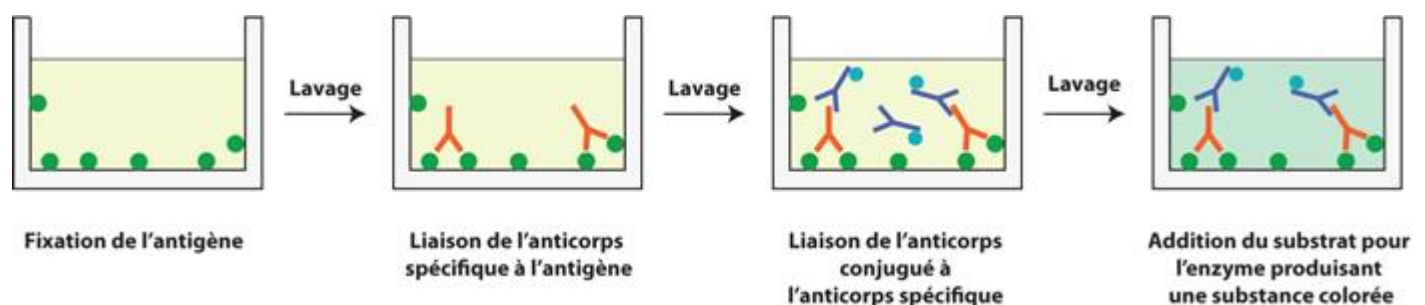
Test ELISA indirect:

Le principe de l'ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

- D'un antigène spécifique à l'anticorps recherché
- D'un échantillon à analyser
- D'un anticorps secondaire anti IgG couplé à une enzyme peroxydase (cet anticorps va reconnaître spécifiquement les anticorps IgG)
- Du substrat spécifique à l'enzyme, ici du TMB.

Le test comporte quatre étapes principales :

- **Fixation de l'antigène :** L'antigène spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.
- **Fixation de l'anticorps à doser :** On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps) sur les plaque précédente. Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.
- **Fixation de l'anticorps de détection :** On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anti IgG qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- **Révélation :** On incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnel à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.



2.2. Application :

ELISA est principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence de protéines, d'anticorps ou d'antigènes, dans un échantillon.

Elle est notamment utilisée pour le dépistage du HIV, et permet de déterminer la concentration sérique d'anticorps dirigés contre le virus.

3. Immunofluorescence.

L'**immunofluorescence** est une technique d'immunomarquage, qui utilise des anticorps ainsi que des fluorochromes (**coloration fluorescente**). Elle permet de repérer la présence de diverses substances grâce à des **anticorps**, rendus **fluorescents**, qui vont se fixer dessus.

3.1. Principes :

En colorant des anticorps puis en les observant exposés à une lumière spéciale, il devient simple de les détecter et de repérer les substances sur lesquelles ils se fixent.

3.2 Différents types d'immunofluorescence.

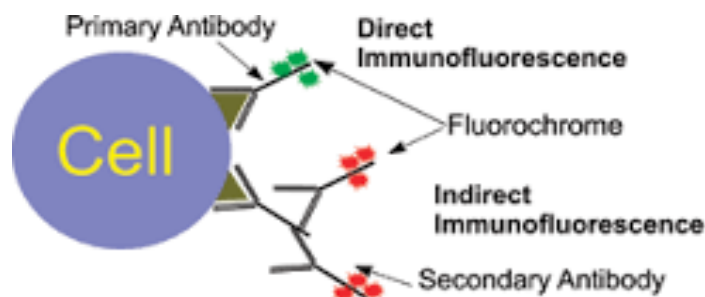
Il existe deux types de fluorescence, conférée par un fluorochrome, substance chimique qui émet de la lumière si elle est excitée à une certaine longueur d'onde

a.Immunofluorescence direct.

Lors de ce marquage, on utilise un anticorps dirigé contre la molécule recherchée, appelée antigène. Cet anticorps est couplé à un fluorochrome. Ensuite pour révéler la préparation, on peut utiliser un microscope à épifluorescence. Cette technique reste une des plus utilisées dans la recherche scientifique

b.L'immunofluorescence indirecte.

Elle est basée sur l'utilisation successive de 2 anticorps : L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire.



3.3. Application :

Cette méthode est utilisée pour rechercher des bactéries ou des anticorps dans des prélèvements biologiques. L'immunofluorescence est aussi employée pour le diagnostic de maladies auto-immunes : diabète de type 1, de la sclérose en plaques ou encore de la polyarthrite rhumatoïde.