Les dosages Radioimmunologiques

Plan du cours

Introduction : 1
Les anticorps : 1
La structure générale 2
Les caractéristiques d'un immun-sérum : 2
Les antigènes : 2
L'échantillon biologique 2
Les solutions étalons : 2
L'étalon international : 2
La réaction antigène-anticorps : 3
A l'équilibre 3
Influence des conditions physico-chimiques sur la réaction AC-AG : 3
Les principes généraux des radioimmunodosages : 4
Les méthodes par compétition : 4
Le principe : 4
Avantages et inconvénients 4
Les méthodes radioimmunométriques : 5
Principe : 5
Avantages et inconvénients : 5

Introduction :

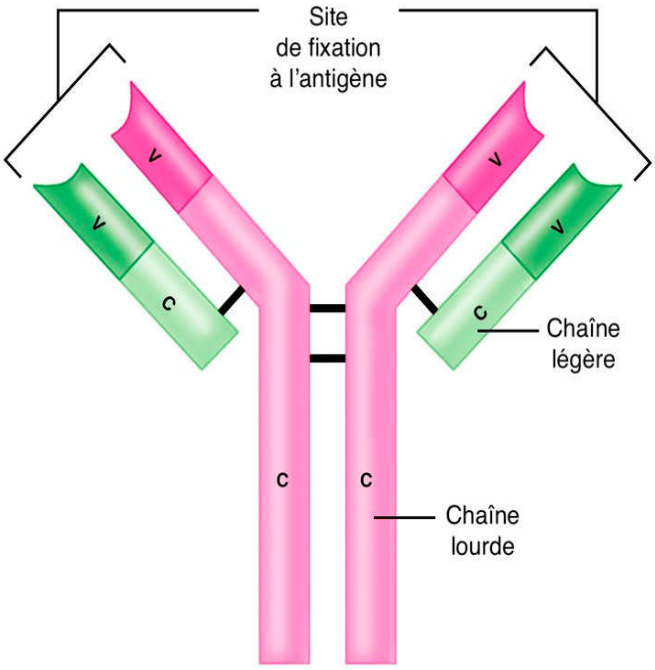
Le premier immmundosage décrit est celui de l'insuline en 1959 par YALOW et BERSON. Ils regroupent l'ensemble de méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène (AG) – anticorps (AC). Les plus nombreux utilisent actuellement un troisième élément (le traceur ou marqueur). Ce marqueur peut être soit un noyau radioactif, soit une enzyme ou bien une molécule fluorescente.

Les anticorps :

Lorsqu'on injecte à un animal un antigène, la réponse immunitaire se traduit entre autres par une sécrétion d'anticorps. Ces anticorps sont des immunoglobulines. Il s'agit de glycoprotéines produites par les lymphocytes B activés en plasmocytes. Elles portent des sites capables de reconnaître spécifiquement certains déterminants antigéniques appelés épitopes.

La structure générale

Une immunoglobuline (Ig) est constituée de chaînes lourdes H (heavy) et de chaînes légères L (light). Les différentes chaînes loures (π, α, μ, δ, ε) d'individualiser cinq classes d'immunoglobulines et qui sont les IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Les chaînes légères sont de deux types Kappa (κ)et lambda (λ) et sont différentes par leur antigénicité. Les IgG représentent $\frac{3}{4}$ des immunoglobulines. On en différencie quatre classes possédant des chaînes lourdes différentes, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgG_5. Dans un immun-sérum coexistent plusieurs populations d'anticorps qui reconnaissent des épitopes différents de l'antigène, de ce fait il a été produit in-vitro : il s'agit des anticorps monoclonaux.



Les caractéristiques d'un immun-sérum :

- Le titre : Est défini par la dilution pour laquelle on observe 50% de liaison de l'antigène marqué. Il s'exprime par l'inverse du facteur de dilution.
- L'affinité : Elle exprime quantitativement par la mesure de la constante d'association Ka exprimée par 1/mole
- La spécificité : pour un antigène est sa capacité à ne reconnaître que cet antigène.

Les antigènes :

Les antigènes (AG) correspondent aux molécules à doser. La liaison antigène anticorps dépend de l'avidité de cet anticorps pour cet antigène.

L'échantillon biologique

La molécule à doser peut se trouver soit sous forme libre soit sous forme liée aux protéines.

Les solutions étalons :

Les solutions étalons utilisées au cours de chaque série de dosages permettent de réaliser une courbe d'étalonnage et de déterminer la concentration de la solution considérée dans un échantillon biologique. Ces étalons doivent répondre à :

- Une identité de structure entre la molécule étalon et molécule à doser.
- Une identité de comportement.

L'étalon international :

Pour les substances biologiques dont la structure n'est pas totalement élucidée par des méthodes chimiques ou physiques, il est nécessaire de se référer à l'étalon international.

L'expression de la concentration d'un antigène (choix des unités) :
A chaque fois qu'une molécule est bien définie chimiquement, la concentration peut être

- Soit la concentration massique (gramme et ces sous multiples par litre).
- Soit la concentration molaire (moles par litre).

Lorsqu'il n'existe pas d'accord général sur la structure ou la structure chimique est inconnue, l'unité établie pour les étalons international de référence sont pour la majorité des activités biologiques UI.

La réaction antigène-anticorps :

La réaction antigène-anticorps est la base de tous les immmundosage dosages et un AG réagit avec un AC.

$$[AC] + [AG] \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftarrows}} ([AC - AG]$$

k1 et k2 représentent les vitesses respectives d'association et de dissociation.
Cette réaction est réversible et on obtient un équilibre lorsque la quantité $[AC - AG]$ formée par unité de temps est égale à la quantité de ce même composé dissocié par unité de temps.

$$\frac{d[AC - AG]}{dt} = \frac{[AC - AG]}{k1[AC][AG] - k2[AC - AG]}$$

A l'équilibre

$\frac{d[AC-AG]}{dt} = 0 \quad \Rightarrow$ k1 [AC][AG] = k2 [AC-AG]

$\frac{k1}{k2} = \frac{[AC-AG]}{[AC][AG]} = ka$

ka est appelée constante d'affinité à l'équilibre. Son unité = litres par mole.

$$kd = \frac{1}{ka}$$

Kd est appelée constante de dissociation à l'équilibre. Son unité =mole par litre.
Remarques :
Ka et Kd dépendent des concentrations d'AC et AG.
Si $[F]$ est la concentration en AG libre.
Si $[F^*]$ est la concentration en AG* libre.
Si $[B]$ est la concentration en Ag liée [AC-AG]
Si $[B^*]$est la concentration en Ag* liée [AC-AG*]
$[AC]$T est la concentration totale des AC

$$ka = \frac{[B]}{[F].[AC]}$$

$$[AC] = [AC]T - [B]$$

$$\frac{[B]}{[T]} = ka.([AC]T - [B])$$

Influence des conditions physico-chimiques sur la réaction AC-AG :

La constante d'affinité dépend du milieu. Les facteurs essentiels sont :

- Ph si Ph diminue, l'intensité de la réaction diminue.
- La température joue un rôle à la fois sur la constante d'affinité et sur la vitesse de la réaction AC-AG.

Les principes généraux des radioimmunodosages :

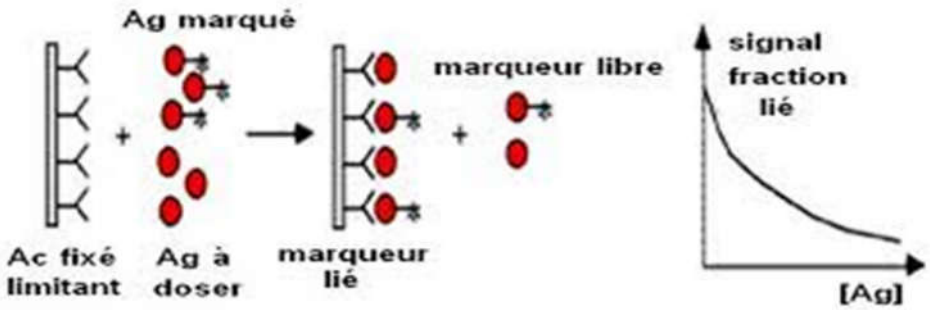
Ces méthodes combinent deux procédés :

- La réaction AC et AG
- La détection du signal radioactif

Les méthodes par compétition :

Aussi appelées par défaut d'anticorps ou Radio Immuno Assay (R.I.A)

Le principe :



- La concentration des AC doit être inférieure à la concentration totale des AG. Donc il y'a une compétition vis à vis des sites AC avec formation simultanée des complexes $[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}^*]$ $\boldsymbol{et}$ $[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}]$
- En maintenant fixe la concentration en AC et en molécules marquées (AG*), l'augmentation de la concentration en AG entraîne une augmentation des complexes $[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}]$ au détriment du complexe $[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}^*]$.
- Si on dispose d'une méthode qui permet de séparer les composés libres, les complexes $[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}]$ et$[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}^*]$ sans modifier l'équilibre de la réaction, on peut facilement déterminer grâce au signal délivré par le marqueur radioactif la concentration de AG* $[\boldsymbol{F}^*]$et des complexes $[\boldsymbol{AC}-\boldsymbol{AG}^*]$ $\boldsymbol{ou}$ $[\boldsymbol{B}^*]$ pour chaque concentration d'Ag.
- A l 'équilibre : Les rapports

$$\frac{[F]}{B}=\frac{[F^*]}{[B^*]}$$

En établissant d'une courbe d 'étalonnage se fait à l'aide de solutions étalons (concentrations connues) puis on détermine les concentrations inconnues d'AG.

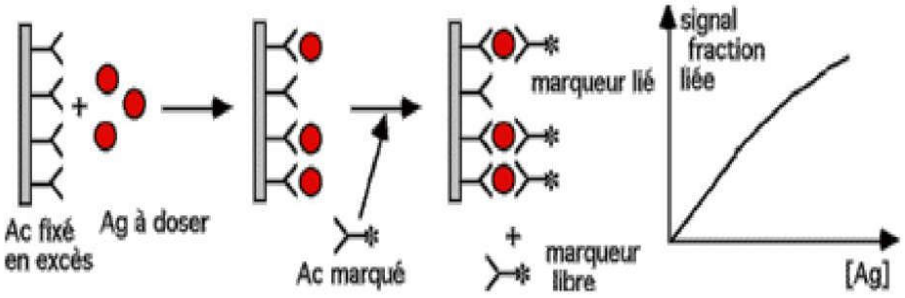
Avantages et inconvénients

- S'appliquent à tous les AG quelques soit leurs tailles
- Nécessite une constante d'affinité élevée
- Nécessite un nombre constant d'AC dans chaque tube.
- Un seul épitope étant nécessaire à l'AG, mais les fragments et les métabolites de l'AG porteur de l'épitope peuvent être reconnus comme la molécule mère, donc des résultats par excès.

Les méthodes radioimmunométriques :

Aussi appelées par excès d'anticorps ou méthodes sandwich ou I R M A. Récemment développées, ces méthodes ont pris une véritable extension depuis l'utilisation des anticorps monoclonaux et tentent de remplacer les méthodes par compétition.

Principe :



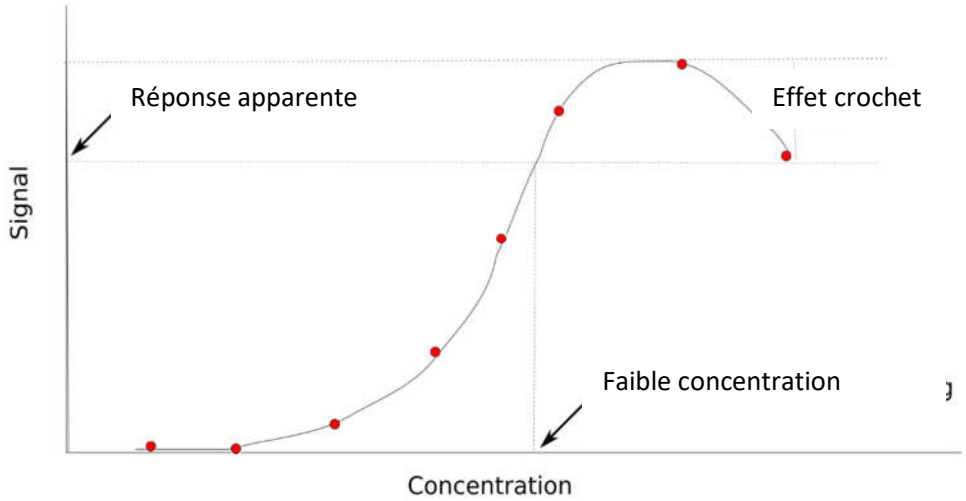
Elles se distinguent des méthodes par compétition par :

- Présence d'excès d'AC
- L'utilisation d'un deuxième AC_2* qui est marqué. Ce dernier est utilisé comme révélateur de la réaction entre l'AG et le premier AC_1 qui est fixé sur le support solide. La quantité fixée doit être de telle sorte que le nombre de sites de liaisons disponibles doit être supérieur au nombre de molécules AG présent dans la solution.
- AG va se fixer sur les sites spécifiques.
- L'addition de l'AC_2* est suivie de sa fixation sur Ag préalablement fixé sur l'AC_1. L'AG se trouve ainsi pris en sandwich entre deux anticorps (AC_1 et AC_2*).
- Un simple lavage permet de séparer les complexes (AC_1-AG- AC_2*) = B* et AC_2*(F*).
- L'AC_2* doit réagir contre un épitope différent de l'AG

Avantages et inconvénients :

Sont liés à l'utilisation AC monoclonaux et au principe même de la méthode :

- L'utilisation de deux AC monoclonaux dirigés contre deux épitopes différents de l'AG donc amélioration de la reconnaissance spécifique de ce dernier.
- La limite de détection est abaissée par rapport aux méthodes par compétition.
- La gamme de mesure est plus étendue.
- Augmentation de la précision des mesures.
- L'AG doit avoir deux épitopes (utilisation impossible pour les petites molécules).
- Le phénomène du crochet qui apparaît pour les concentrations élevées d'Ag où on observe une diminution de la valeur du signal passant au-dessous de celle obtenue par le dernier point de la gamme.


Réponse apparente
Effet crochet
Signal
Faible concentration
Concentration