

Les radio-isotopes sont les premiers marqueurs utilisés dans les méthodes immunologiques; il existe donc une vaste gamme d'essais radio-immunologiques.

- Les radio-isotopes sont facilement détectés à très faibles intensités, les procédures de marquage sont simples et les marqueurs radioactifs n'ont virtuellement pas d'effet sur la liaison anticorps antigène.
- Les radio-isotopes sont coûteux, dangereux et nécessitent un contrôle et des procédures de destruction strictes.
- La désintégration isotopique nécessite un remplacement régulier de l'anticorps ou antigène marqué.

IV.1. Isotopes radioactifs, radio-isotopes, radionucléides, radioéléments

Les isotopes d'un même élément possèdent le même nombre de protons et un nombre différent de neutrons. Ils ne se distinguent entre eux que par un comportement physique et chimique légèrement différent. Certains isotopes sont radioactifs.

- Un radioélément ou radionucléide possède un noyau montrant une décroissance radioactive. Il s'agit d'atomes dont le noyau atomique est instable et donc radioactif.
- Des radio-isotopes (contraction de radioactivité et d'isotope) correspondent à des radioéléments de même numéro atomique.
- Grâce aux isotopes radioactifs, il est possible de suivre à la trace un atome ou une espèce chimique sans perturber les comportements physiques, chimiques ou biologiques.

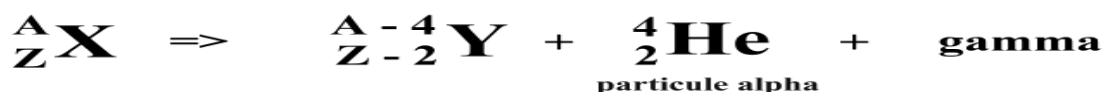
IV.2. Différents types de radioactivité

Un nucléide est défini par : X^A_Z avec $A = Z + N$ = nombre de masse = nombre de nucléons, N = nombre de neutrons, Z = nombre atomique = nombre de protons du noyau.

❖ En fonction du nombre relatif de protons (Z) par rapport au nombre de neutrons ($A-Z$), le nucléide peut être instable. Son retour à la stabilité s'accompagne de l'émission d'un rayonnement qui peut se rattacher à trois types.

IV.2.1. Emission α

Elle correspond à une transformation radioactive par partition, c'est-à-dire, coupure du noyau en deux parties. Elle est observée dans le cas des atomes radioactifs lourds ($Z > 82$). La particule émise est une particule α (noyau d'hélium $He\ 4$).



Le noyau X' obtenu est soit stable, soit excité, revenant alors à son état fondamental par un processus γ , soit enfin instable pouvant émettre une particule α ou β . Les noyaux d'hélium obtenus sont quatre fois plus lourds que l'hydrogène. Ces particules sont très peu pénétrantes et très ionisantes ; elles parcourent quelques millimètres dans les tissus organiques et perdent la totalité de leur énergie sur cette distance.

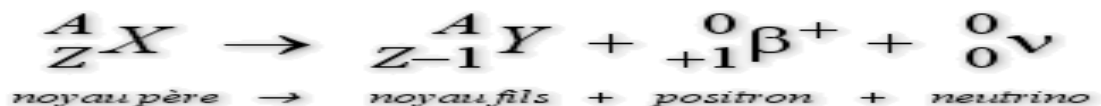
IV.2.2. Emission β

Il s'agit d'une émission au cours de laquelle l'atome père et l'atome fils possèdent la même activité radioactive. On distingue :

- l'émission d'un électron négatif (β^-) : les émetteurs β^- possèdent un excès relatif de neutrons. Un neutron se convertit en proton en éjectant en même temps un électron et un antineutrino ($\bar{\nu}$) :

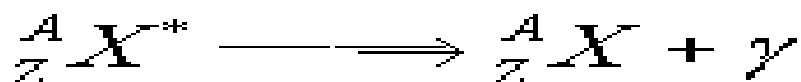


- l'émission d'un électron positif ou positron (β^+) : les émetteurs β^+ possèdent un excès relatif de protons. Un proton se convertit en neutron en émettant en même temps un positron et un neutrino (ν) :



IV.2.3. Emission γ

Dans le cas des phénomènes expliqués précédemment, le noyau fils X' se trouve dans un état excité ou métastable. Son retour à l'état fondamental s'effectue directement ou en passant par des niveaux énergétiques intermédiaires, l'excédent d'énergie étant expulsé sous forme d'un ou plusieurs photons γ :



IV.3. Exemple de Radionucléides utilisés en biologie médicale

Nucléides	Période	Emetteur
14C	5730 ans	β^-
35S	87 jours	β^-
32P	14,2 jours	β^-
125I	60 jours	γ

IV.3.1. Les radio-isotopes utilisés:

❖ **Iode-125** : L'iode 125 est un des isotopes radioactifs de l'iode le plus utilisé en recherches biochimiques et médicales ainsi qu'en diagnostic médical in vivo et in vitro.

- Utilisé pour le marquage de grands antigènes ;
- Capture électronique, avec émission de radiation γ de faible énergie et d'électrons Auger (pas d'émission β) ;
- $t_{1/2}$ =60 jours ;
- Marqueur externe qui requiert un attachement covalent à l'antigène (ex : substitution sur la tyrosine par oxydation). Ceci peut engendrer une différence structurale entre l'antigène et l'antigène marqué.

❖ **Carbone-14 et Hydrogène-3 (tritium):**

- Utilisés pour le marquage d'haptènes ;
- Émetteurs de radiation β ;
- $t_{1/2}$ =5730 ans (C-14) et 12.3 ans (H-3) ;
- Marqueurs internes; les radio-isotopes remplacent des atomes existants.

- ❖ **3H** : Emetteur β^- de très faible énergie, le tritium est un des radionucléides les plus utilisés en recherche biologique et médicale.
 - Dans le cas de molécules marquées, le 3H suit le cycle métabolique de celles-ci ou, en cas de dégradation, de la fraction qui le renferme. La période effective est différente de la période physique (12,3 ans) ; dans le cas de la thymidine, elle est de 190 jours.
- ❖ **14C** : Emetteur β^- de faible énergie, le 14C est un des radionucléides les plus utilisés en recherche biologique et médicale.
- ❖ **51Cr** : Le chrome 51 est utilisé comme agent de marquage des cellules dans nombre de recherches biochimiques et médicales, ainsi qu'en médecine nucléaire.
- ❖ **137Cs**.
- ❖ **32P** : Le phosphore 32 est le radioisotope β^- le plus énergétique utilisé communément en recherche,
 - Son utilisation en biologie moléculaire est devenue extrêmement importante par l'intermédiaire des nucléotides marqués de haute activité spécifique.
- ❖ **³³P** : Période 25,56 jours, Rayonnement β^- .
- ❖ **³⁵S** : Emetteur β^- de faible énergie, le 35S est un des radionucléides les plus utilisés en recherche biologique et médicale.

➤ **Marqueurs les plus utilisés**

- **Radio-isotopes (¹²⁵I, ³⁵S)** : autoradiographie puis observation de la coupe et de la plaque photographique en parallèle au microscope photonique ou électronique.
- **Enzymes (phosphatase alcaline ou peroxydase)**, capables d'utiliser un substrat chromogène c.à.d. capable de donner un produit coloré détectable : observation en microscopie photonique par transmission ;
- **Fluorochromes (fluorescéine ou rhodamine)**, observation au microscope à fluorescence ;

➤ **Signaux émis**

- détectés (méthode **qualitative**).
- mesurés (méthode **quantitative**).
 - **Utilisées pour:** analyse des **Ag en très faible quantité**, sensibilité nmol/L (impossible avec les techniques de précipitation).
- étude des complexes immuns non précipitants

IV.4. Marquage des acides nucléiques

IV.4.1. Marquage et suivi des acides nucléiques

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, Northern,.....). On distingue le marquage dit 'chaud' utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages 'froids' qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

IV.4.1.1. Marquage radioactif

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin). Le Phosphore 32 est le radio-isotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatique-ment au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radio-marqués. Il existe des sondes mono ou double brins Soufre 35, H3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation in situ.

IV.4.2. Les sondes d'acides nucléiques

Une sonde est un marqueur qu'on introduit dans un milieu biologique pour que ses propriétés vis-à-vis des constituants de ce milieu soient révélées par l'émission d'un signal détectable par nos instruments de mesure.

Les oligo-nucléotides sont employés comme sondes parce qu'ils peuvent s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'un acide nucléique dans un milieu biologique.

Lorsqu'elles sont marquées (atomes radioactifs, biotine, fluorochromes), leur présence dans le milieu peut être suivie.

IV.4.2.1. Définition

Une **sonde nucléique** : Séquence d'ADN ou d'ARN marquée (par un composé fluorescent, un radio-isotope, ou une enzyme) que l'on utilise pour détecter des séquences homologues (complémentaires) par hybridation *in situ* ou *in vitro*.

IV.4.2.2. Caractéristiques générales

Une sonde nucléotidique peut être une séquence d'ADN ou d'ARN, mais obligatoirement monobrin. Sa taille est très variable : oligonucléotide de 20-30 nucléotides ou à l'opposé de plusieurs centaines de nucléotides. La sonde est complémentaire et antiparallèle du fragment recherché. Dans un mélange complexe où s'effectue l'hybridation moléculaire, la sonde doit être facilement repérable grâce à un marquage avec un radioisotope (marquage chaud), mais il existe également des sondes appelées sondes froides sans marquage par un radioisotope.

A. Les sondes radioactives (chaudes)

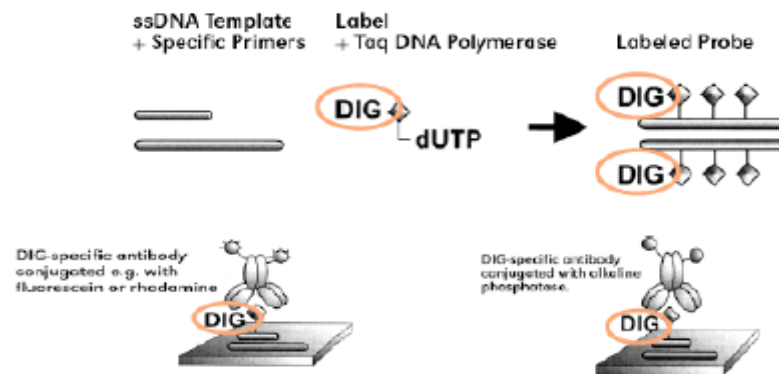
- sondes mono ou double brins
- Phosphore³² (radio-isotope le plus utilisé), Soufre³⁵, H³ (tritium) ;
- Incorpore dans la sonde enzymatiquement au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués.

- **marquage en 5'**: T4 polynucléotide kinase ajoute un P³² en 5' (sonde peu radioactive).
- **marquage en 3'** :
 - avec une ADN polymérase: ADN pol I ou T4, Taq pol (PCR) (sondes très radioactives) ;
 - avec une exonucléase ;
 - avec une terminal transférase.

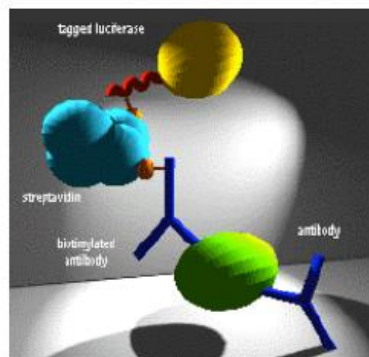


b. Les sondes froides

- ✓ Marquage par la **Digoxigénine**:



✓ Marquage par la **biotine-streptavidine**:



Au lieu d'être révélés après leur séparation, les fragments d'ADN peuvent être marqués au préalable :

- par des éléments radioactifs : ^{32}P , ^{33}P et ^{35}S sont les radioéléments les plus utilisés en biologie moléculaire.

❖ Les sondes doubles brins

1. Marquage par amorçage au hasard (Random Printing)

Très employé dans les laboratoires pour par exemple les Southern et Northern Blot, il permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées, nécessaires pour détecter un gène sur quelques mg d'ADN génomique. Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal. Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit $4^6 = 4096$ combinaisons). Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec la sonde pour une partie d'entre eux. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I qui va reconstituer l'intégrité des deux fragments en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au ^{32}P . Des ADN polymérases par exemple dérivée du phage T7 sont actuellement les plus utilisées.

Marquage en 3':

- * avec une ADN pol.: fragment de Klenow, T4 ADN pol., Taq pol., transcriptase reverse.
- * avec une exonucléase
- * avec une terminal transférase

L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase, par exemple, la T4 polynucléotide kinase extraite d'*E. coli* infecté par le bactériophage T4. En présence d'ATP marqué au ³²P en position γ , soit [³²P] γ -ATP, il est possible d'échanger le groupement 5'-phosphate présent sur le fragment d'ADN avec le phosphate radioactif en position γ de l'ATP. Cette méthode est générale. Elle est plus efficace si les extrémités 5' sont préalablement déphosphorylées, par exemple par l'action d'une phosphatase alcaline.

2. Marquage par translation de coupure (Nick Translation):

Utilisation de 2 enzymes:

- * DNase I dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simples brin dans le fragment d'intérêt
- * DNA pol. I pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud.

Nous avons vu dans les outils enzymatiques utilisés en biologie moléculaire que l'ADN double brin traité par la Dnase I était clivé au hasard. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif (³²P). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au ³²P.

Cette technique est appelée "Technique de Nick Translation".

❖ Les sondes simples brin- d'ADN

- ✓ sondes à activité spécifique importante (Southern, Northern Blot) ;
- ✓ protection contre la nucléase S1, hybridation in situ. Avantage : ne se ré-nature pas sur elle-même lors de l'hybridation.

- d'ARN: ribosondes.

- ✓ Rendements d'hybridation meilleurs par rapport aux hybrides ADN-ADN et plus stables > pour hybridation in situ
- ✓ cartographie des ARN

NP :

Les sondes radioactives présentent de nombreux inconvénients:

- nécessité de se protéger du rayonnement émis = un maniement des sondes inconfortable.
- décroissance rapide du ³²P ce qui nécessite un besoin de marquer les sondes fréquemment. Pour pallier à ces inconvénients, on peut utiliser les sondes 'froides'.

IV.4.3. Marquages froids: fluorescence; colorimétrie; chimioluminescence

IV.4.3.1. Fluorescence

Absorption d'énergie lumineuse par une molécule (fluorochrome). Passage à l'état de Molécule excitée Retour à l'état fondamental par émission lumineuse (de plus grande longueur d'onde que l'onde de stimulation) = spectre de fluorescence.

IV.4.3.2. Colorimétrie

Colorants: biotine, digoxygénine, fluorescéine

Exemple: l'ADN cible est fixé sur une membrane et les sondes sont biotinylées. La détection est réalisée par ajout d'un complexe streptavidine-HRP (HorseRadish peroxidase ou Peroxydase de Raifort), l'enzyme permettant l'oxydation d'un chromogène. La mesure du signal est réalisée par colorimétrie.

IV.4.3.3. Chimioluminescence

La chimioluminescence se produit au cours d'une réaction chimique lorsque l'excès d'énergie est libéré sous forme de lumière.

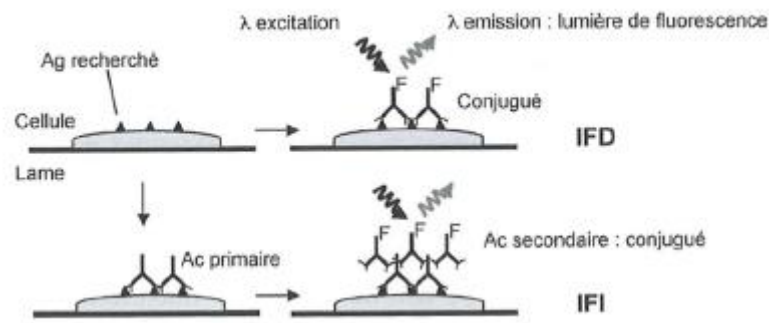
De nombreuses réactions produisent ce phénomène et chacune émet une lumière de longueur d'onde spécifique, et d'intensité proportionnelle à la quantité de molécules réactives présentes.

NP: ces sondes 'froides' présentent un problème de sensibilité et leur utilisation ne fait pas toujours l'unanimité.

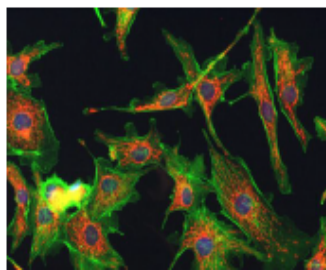
IV.4.4. Méthodes d'immunomarquage : Immunofluorescence

Principe : Fluorochrome sur un anticorps pour détecter un Ag:

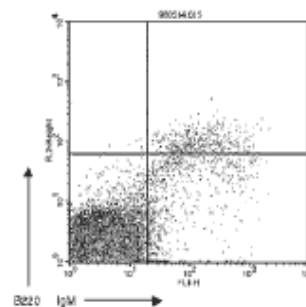
- Isothiocyanate de fluorescéine (jaune-vert) ;
- rhodamine (rouge).
- Emission d'une radiation d'une longueur d'onde plus à celle qu'ils ont absorbée.



But: Détection et localisation d'Ag ou Ac



méthode qualitative
(microscopie par
immunofluorescence)



méthode quantitative
(cytométrie de flux)

IV.5. Méthodes utilisant des molécules marquées par des radioisotopes = précurseurs radioactifs

IV.5.1. Principe

Ces méthodes consistent à mettre une préparation biologique en **contact avec** une molécule radioactive donnée appelée souvent précurseur radioactif = **phase d'absorption**.

Après une durée variable d'incubation, la molécule radioactive est incorporée c.à.d. **intégrée dans le métabolisme cellulaire** = **phase d'incorporation**.

On dose ensuite, dans la préparation biologique, la **molécule précurseur** fournie ou les **produits radioactifs qui en dérivent**. Ces dosages sont effectués à partir de **prélèvements échelonnés** dans le temps, on réalise ainsi une **étude cinétique du devenir du précurseur radioactif à l'intérieur des cellules**.

Les résultats obtenus renseignent donc sur les modalités d'utilisation de la substance fournie par les cellules. Cette démarche est largement utilisée pour l'**étude du métabolisme cellulaire**.

IV.5.2. Les radioisotopes les plus utilisés

Ce sont le tritium ^3H , le ^{14}C et le ^{32}P .

IV.5.3. Méthodes de détection de la radioactivité dans des préparations biologiques

Deux méthodes sont utilisables : l'autoradiographie et la scintillation liquide.

A. L'autoradiographie

C'est une méthode qui permet de **suivre le devenir de constituants biochimiques en termes de localisation tissulaire ou cellulaire**.

C'est une **méthode qualitative** : on détecte la présence et la localisation du composé radioactif.

Cette méthode **s'adresse à des coupes** tissulaires ou cellulaires **destinées à la microscopie photonique ou électronique**. Le tissu a préalablement incorporé le précurseur radioactif ; et l'on a réalisé des coupes selon les étapes déjà décrites.

- On recouvre la préparation biologique (coupe, chromatogramme ou électrophorégramme) par une émulsion photographique ou un film photographique qui contient du **bromure d'argent BrAg**.

- L'énergie libérée par le **rayonnement émis par les radioisotopes** contenus dans la préparation biologique **arrache un électron à un cristal BrAg et cet électron réduit un ion Ag^+ du bromure d'argent BrAg en atome d'argent métallique Ag**. On obtient ce que l'on appelle **l'image latente** (latente car pas encore visible en raison du petit nombre d'atome d'argent métallique formés).

L'obtention de cette image latente est lente : 15 jours de contact avec un marquage par le ^{32}P ou 3 à 5 semaines avec le ^{14}C .

- Cette image latente est ensuite transformée en image visible au cours de la révélation ou **développement du film photographique** qui se déroule en trois étapes :

- **bain révélateur** (agent réducteur qui opère en milieu basique) qui complète la transformation des ions Ag^+ en argent métallique Ag de façon à ce que les grains d'argent métallique soient plus gros (le révélateur n'est actif que sur les cristaux de BrAg ayant été exposés à la lumière, là où a été initiée la réduction des Ag^+ . propriété nouvelle de ces cristaux avec présence d'Ag métallique) ;

- **bain d'arrêt** qui stoppe l'action du révélateur (acide acétique ou citrique qui agit par diminution du pH) ;

- **bain fixateur** (ions thiosulfate) qui complexe les ions argent Ag^+ des cristaux de BrAg restant, entraîne leur dissolution et donc l'élimination du BrAg en excès : le fond du film photographique devient transparent.

- **On observe en parallèle la préparation biologique et le film photographique**. Les grains d'argent forment des taches sombres qui correspondent aux régions de la préparation biologique hébergeant des molécules radioactives.

Cette méthode est **également utilisée pour mettre en évidence des constituants biochimiques radioactifs séparés par chromatographie ou électrophorèse**.

Le chromatogramme (souvent sur papier) ou le gel d'électrophorèse (agarose ou polyacrylamide) est mis en contact avec une plaque photo qui est impressionnée puis révélée.

On identifie ainsi les constituants devenus radioactifs en repérant l'emplacement des taches de radioactivité de la plaque photo par rapport aux spots de migration caractéristique de chaque constituant identifié et séparé par chromatographie ou électrophorèse.

B. Le compteur à scintillation liquide

Cette méthode de détection de la radioactivité peut être **appliquée à des cellules entières, à des fragments de tissu, des homogénats, des fractions cellulaires** ou des **morceaux découpés de chromatogramme ou électrophorégramme**.

C'est une **méthode quantitative** : on peut faire le dosage de constituants grâce à leur radioactivité.

Il s'agit de surcroît d'une méthode de dosage **très sensible**, bien plus que ne le permet un dosage spectrophotométrique par exemple.

Dans le cas d'une étude à partir de fractions cellulaires on peut aussi localiser indirectement la radioactivité, donc les constituants au niveau des ultrastructures cellulaires et les doser.

On utilise des **substances scintillantes** liquides comme le POPOP et le PPO qui sont capables d'émettre une scintillation très fugitive (= lumière) lorsque ces molécules sont traversées par une radiation ionisante comme l'est un rayonnement radioactif.

- La préparation biologique est plongée = **immergée** dans un mélange scintillant contenu dans une petite fiole (pilulier) ;

- La lumière émise est mesurée lorsque le pilulier passe, à l'intérieur du compteur, devant un **photomultiplicateur** électronique. Les **photons** émis lors de la traversée des rayonnements radioactifs sont alors **transformés en impulsions électriques**. L'intensité de la radioactivité détectée est exprimée en coup par minute = **cpm**.

Remarque : le compteur Geiger Müller : = autre appareil de mesure de la radioactivité.

Il est constitué par un cylindre métallique fermé par une membrane extra-mince.

A l'intérieur et dans une atmosphère de gaz rares (hélium, argon + alcool) se trouvent deux électrodes isolées et portées à une tension électrique de l'ordre de 1000 volts.

Quand une radiation qui provenant des radioisotopes traverse la membrane, cette radiation produit une ionisation passagère du milieu gazeux, ce qui permet le passage du courant entre les deux électrodes = impulsion électrique ou coup. L'intensité de radioactivité est exprimée en cpm.

Le compteur Geiger Müller n'est pas utilisé pour mesurer la radioactivité présente dans des échantillons biologiques car les quantités utilisées sont très faibles et elles ne sont pas détectables avec précision avec ce type d'appareil bien moins sensible que le compteur à scintillation liquide.

Par contre le compteur Geiger Müller peut trouver sa place dans un labo de biologie pour déceler d'éventuelles contaminations de pailleasse.

C. Autres méthodes

C.1. La micromanipulation

A l'aide de **micromanipulateurs** placés sur la **platine du microscope** on peut réaliser de véritables **opérations chirurgicales au niveau de la cellule** dont on **observe ensuite les conséquences**.

Exemples :

Énucléation, microinjections, technique du "patch clamp" (étude de la propagation du signal électrique le long de la membrane du neurone et du fonctionnement des canaux ioniques membranaires), microrespiromètres, microélectrodes (mesure du pH cytosolique et vacuolaire)

C.2. La micropuncture à UV et rayon laser

Grâce à l'utilisation de faisceaux lumineux très petits (UV ou mieux laser) on peut effectuer des destructions limitées et en observer ensuite les conséquences.

C.3. La microcinématographie

C'est une méthode utilisée depuis longtemps. On adapte une caméra au microscope et on filme la vie d'une cellule. La caméra peut étendre ou comprimer le temps.
On peut travailler en lumière visible mais aussi en UV et IR.