

Chapitre II

METHODOLOGIE et APPAREILLAGE

I- Principes théoriques

La plupart des radio-isotopes employés en biochimie sont de types ^{14}C , ^3H , ^{32}P , ^{35}S , le plus fréquemment utilisé en biochimie étant ^{125}I .

Radio-isotopes	Stabilité	Demi-vie	Rayonnements émis	Usage	Inconvénients/ applications
Carbone 14	Très stable	>5000 ans	B- moyennement énergétique	Petites molécules : glucose, Ac. Aminés etc.	Persiste dans l'environnement (stabilité)
Tritium ^3H	Assez stable	>12 ans	β assez faible	Petites molécules ou macromolécules	Difficiles à détecter (β assez faibles)
Phosphore 32	Peu stable	>14,3jours	B très énergétique	Ac. Nucléiques Phosphorylation des protéines	Prudence, danger de radiation puissantes
Soufre 35	Peu stable	87,5jours	B	Protéines [^{35}S]-méthionine	Etude des changements rapides de la synthèse des protéines
Iode 125	Peu stable	60jours	γ	Protéines : conjugaison d'iodure sue la tyrosine	En RIA (anticorps secondaire marqués a ^{125}I)
^{22}Na , ^{45}Ca , ^{59}Fe , ^{40}K , etc.			B ou γ	Rarement employés sauf : étude et accumulation des ions	

L'énergie libérée par une désintégration varie selon les isotopes. Chaque isotope émet à un niveau d'énergie donné, généralement exprimé en MeV. Ainsi le ^3H émet à 0,018MeV de tels isotopes sont souvent qualifiés de 'faibles' ou de 'mous'. D'autres, au contraire, émettent des particules hautement énergétiques. Par exemple, le ^{32}P produit 1,71 MeV. On les qualifie souvent forts ou 'durs'. Entre ces

deux extrêmes, on retrouve des émetteurs moyens comme le ^{14}C (0,156MeV) ou le ^{35}S (0,169MeV).

Cette caractéristique influe évidemment sur le danger d'irradiation de chaque isotope ainsi que sur la facilité avec laquelle on peut le détecter.

II- Obtention de traceurs radioactifs (précurseurs radioactifs)

De très nombreuses approches expérimentales de biochimie nécessitent le recours à des molécules contenant un atome radioactif.

La procédure la plus courante est de 'marquer' une molécule biologique. On emploie souvent les termes de 'chaud' pour désigner une molécule ainsi marquée avec un isotope radioactif et de 'froid' pour désigner une molécule non radioactive. Les molécules biologiques marquées peuvent être obtenues par conjugaison ou par synthèse.

1- Marquage par conjugaison chimique

On peut attacher de ^{125}I à la concanavaline A fraîchement isolée de fèves. L'iodination à l'iode 125 est la technique la plus facile car elle ne nécessite que des réactions relativement simples sur une tyrosine de la protéine. Le marquage au tritium est passablement plus complexe.

2- Synthèse au laboratoire

Dans ce cas, il s'agit généralement de petites molécules (glucose, acides aminés, ATP) relativement faciles à synthétiser *in vitro*. Ces synthèses peuvent être complètement chimiques ou utiliser des enzymes pour catalyser une ou plusieurs étapes de synthèse.

III- Détection qualitative

Pour localiser un isotope, par exemple si l'on veut étudier la répartition dans les protéines séparées par électrophorèse, on a recours à des procédés comme l'autoradiographie ou la fluorographie. Ces approches consistent à appliquer une émulsion photographique, généralement un film à rayon X, sur l'objet contenant le

matériel radioactif. Les particules β émises impressionneront, directement ou indirectement, ce film vis-à-vis de l'endroit où est concentré le produit marqué.

IV- Mesure quantitative des radio-isotopes

Il existe diverses méthodes pour mesurer précisément la quantité d'un radio-isotope. Ces méthodes dépendent du type de radiation émise :

1- comptage par scintillation en milieu liquide

C'est la façon la plus fréquente de quantifier les émetteurs de particules β . Cette approche consiste à solubiliser l'échantillon dans une solution (d'où milieu liquide) contenant des molécules pouvant émettre des photons (d'où 'scintillation') lorsqu'elles sont excitées par les particules β de l'isotope. Ces photons peuvent être détectés quantitativement par une cellule photoélectrique.

1-1- Préparation des échantillons

Les isotopes doivent être uniformément répartis dans le cocktail de scintillation

- Si l'échantillon est en solution, on le met directement dans la fiole en présence du cocktail.
- Si l'échantillon est solide, il faut le solubiliser dans l'eau ou dans un solvant organique.
- Si l'échantillon est un tissu, il faut procéder à une digestion alcaline (base forte à 50°C ou plus). Ce processus peut être fait directement dans la fiole, avant l'addition de cocktail (la base de la fiole doit être préalablement neutralisée avant l'ajout du cocktail). La présence de détergents doux "TritonTM X100" ou fort "SDS" est parfois requise.

Les fioles utilisées sont généralement de petits volumes 5-7 ml

Les volumes des échantillons aqueux doivent être minimes, de l'ordre de 10-15 % de celui du cocktail.

Les fioles sont transparentes aux photons émis dans le processus de comptage et enregistrés par les cellules photosensibles du compteur (300-400nm). Elles ne doivent pas contenir des quantités de radio-isotopes pouvant interférer avec le

comptage (le vers pouvant contenir le ^{40}K). De nos jours on utilise surtout des fioles en plastique, polyéthylène ou polypropylène.

Cocktail de scintillation

Le mélange scintillant ('cocktail à scintillant') contient trois composants de base :

- Un solvant organique (toluène, dioxanne), capable d'absorber des radiations β et d'émettre des photons
 - Un scintillateur primaire (ou 'fluore' primaire) exemple : le PPO
 - Un scintillateur secondaire (ou 'fluore' secondaire) exemple : POPOP
- Solubilisation des scintillants, molécules organiques souvent aromatiques
Capter l'énergie émise par les particules β

2- comptage de scintillation sur milieu solide

Certains cristaux émettent de la lumière sous forme d'éclairement très bref (scintillation) lorsqu'ils absorbent une particule radioactive. Pour les émetteurs γ , on utilise souvent ce type de compteurs (scintillateurs solides).

Le rayonnement γ , une onde électromagnétique hautement énergétique, passe facilement à travers une solution ou les parois d'une fiole sans interagir avec elles. Cela rend la scintillation en milieu liquide peu efficace. Par contre, si cette onde frappe un cristal d'iodure de sodium dopé avec des impuretés, celui-ci agit alors comme scintillateur. Il y aura émission de photons détectables par une cellule photosensible conventionnelle. Le rayonnement β fort peut aussi être mesuré avec ce type d'appareil.

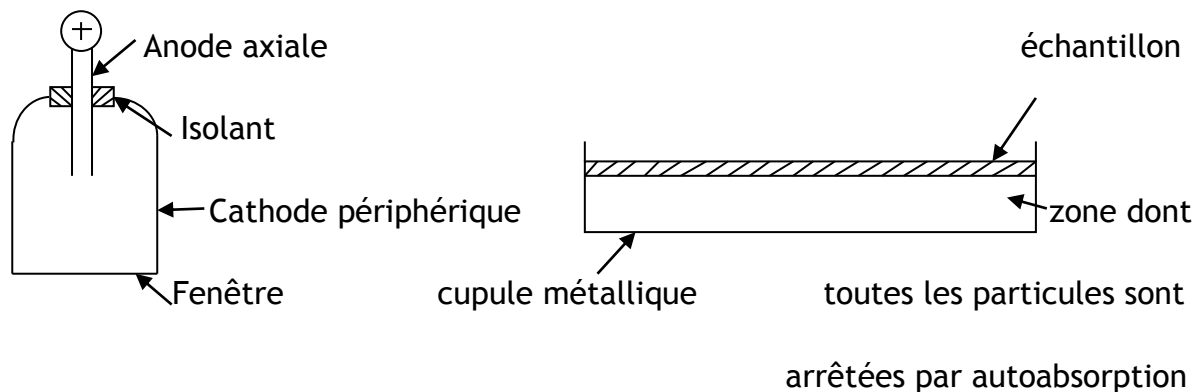
Appareillage

Compteur à gaz ou compteur cloche Geiger Müller :

Mis au point en 1928, ce compteur est aujourd'hui encore un appareil indispensable pour la mise en évidence d'un rayonnement radioactif. Il est constitué d'une cloche métallique, fermée à son extrémité inférieure ou d'un tube cylindrique (cathode) rempli d'argon sous faible pression, dans lequel un fil conducteur (anode) est tendu le long de son axe. L'ensemble est soumis à une tension

électrique élevée (500 V). Les particules créent lors de leur passage dans le compteur une ionisation des molécules du gaz. Ces ions sont collectés par l'anode axiale ce qui donne naissance à un courant ultérieurement amplifié.

Pour une certaine différence de potentielle le compteur fournit des impulsions dont le nombre est proportionnel au nombre de particules ayant atteint le compteur, donc à la radioactivité de l'échantillon.



Compteur cloche GM

méthode « couche épaisse »

(Geiger Müller)

Le comptage est souvent réalisé sur des échantillons liquides séchés dans des cupules métalliques. Une couche mince est ainsi obtenue.

En absence de toute radioactivité, le système électronique du compteur enregistre un certain nombre d'impulsions qui correspond à ce que l'on appelle le mouvement propre ou « bruit de fond » (en anglais, background), cette valeur doit être retranchée de toutes les mesures effectuées avec le compteur.

Dans toutes les mesures les résultats sont exprimés non pas en désintégrations par minutes (dpm) mais en impulsions reçues par minute ou coups par minutes (cpm). Le rapport cpm/dpm définit le rendement de l'appareillage utilisé.

Application

1- marquage des acides nucléiques

Il existe deux principale méthodes de marquage des acides nucléique soit en utilisant des précurseurs radioactifs soit en utilisant des précurseurs fluorescents. Ces précurseurs s'incorporent dans l'ADN et par leurs propriétés il est aisé de les révéler

2-marquage isotopique et technique d'imagerie médicale

En oncologie, le traceur utilisé pour l'imagerie médicale est le glucose marqué par le fluor 18. Ce traceur s'accumule préférentiellement dans les cellules cancéreuses, grandes consommatrices de sucre. Pour cette technique on utilise des isotopes radioactifs dont le temps de demi-vie est beaucoup plus court que les produits élastiques de la médecine nucléaire. Ainsi le fluor 18 a un temps de demi-vie radioactive de 110 min. pour cette raison le traceur est fabriqué sur place de manière à ce qu'au moment de son injection au patient la dose administrée ait une activité de 260 MBq.

In vivo, les cellules sont mises en contact avec un précurseur radioactif pour marquer spécifiquement l'ADN, on utilise un précurseur avec la thymidine. La phosphorylation de la thymidine donne TMP...TDP...TTP qui s'incorpore dans l'ADN.

La thymidine est marquée par le tritium pour marquer l'ARN on utilise l'uridine (qui peut être marquée au tritium). Pour marquer l'ADN et l'ARN en même temps, il est possible d'utiliser le phosphate radioactif ($^{32}\text{PO}_4^{3-}$), il pénètre dans la cellule et est incorporé sur les différents précurseurs. Cette méthode a pour avantage de ne marquer que les acides nucléiques en cours de synthèse.

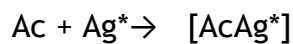
In vitro, il est possible de marquer l'ADN dans sa masse (marquage dans sa longueur ou marquage interne, soit aux extrémités. On peut également utiliser des marqueurs fluorescents.

Chapitre III

DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE**Principe**

La technique radio immunologie est basée sur un phénomène de compétition entre un antigène marqué par un radio isotope et un antigène non marqué que l'on veut doser, cette compétition s'exerce vis-à-vis d'un anticorps spécifique

Ac= anticorps spécifique d'un antigène Ag* marqué



L'équilibre dépend de l'affinité de l'Ac pour l'Ag et la constante K rend compte de cette affinité

$$K = \frac{[\text{AcAg}^*]}{[\text{Ac}][\text{Ag}^*]}$$

$$[\text{Ac}][\text{Ag}^*]$$

Si la quantité d'antigène augmente, la concentration du complexe antigène-anticorps augmente également de telle façon que le rapport K reste constant.

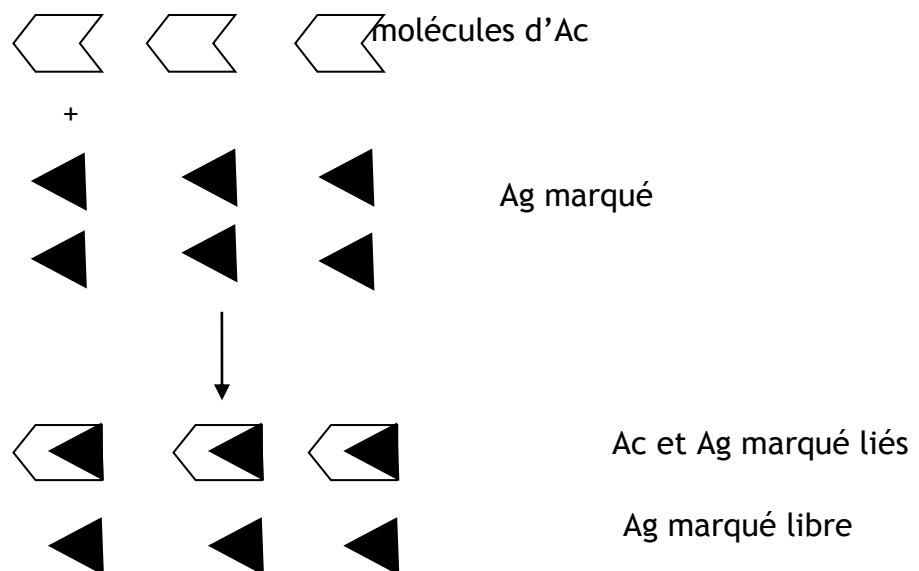


Fig. : Principe du dosage radio immunologique

Si l'antigène non marqué est ajouté au milieu, on observera un phénomène double : d'une part il y a augmentation de la concentration du complexe antigène-

anticorps. D'autre part il se produit un déplacement des molécules de l'antigène marqué par les molécules d'antigène non marquées, sur les sites de fixation de l'anticorps.

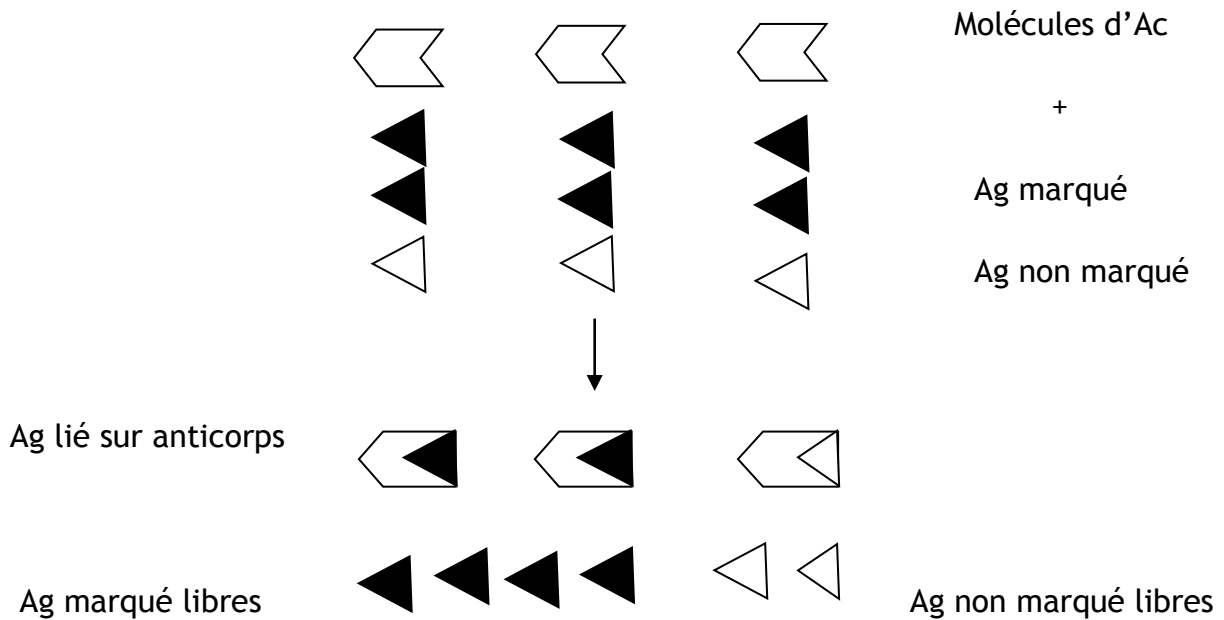


Fig. : Principe du dosage radio immunologique

Lorsqu'on augmente la quantité d'antigène non marqué, on déplace l'antigène marqué. La radioactivité de l'antigène marqué libre augmente par addition au milieu d'Ag non marqué, inversement la radioactivité de l'Ag marqué lié à l'anticorps diminue.

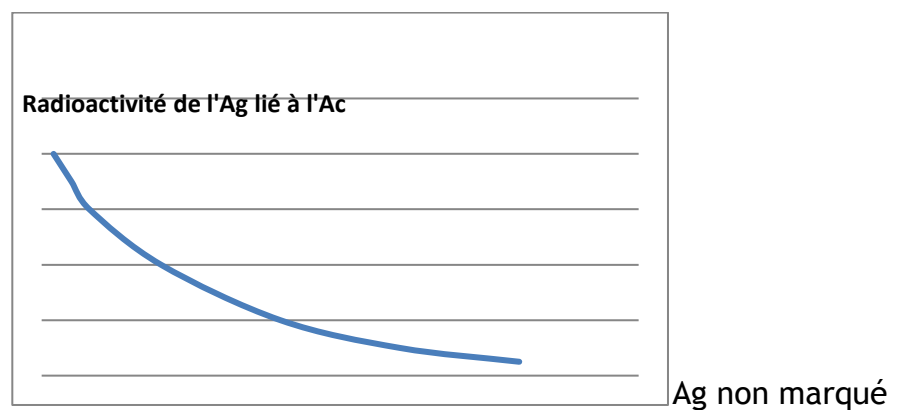
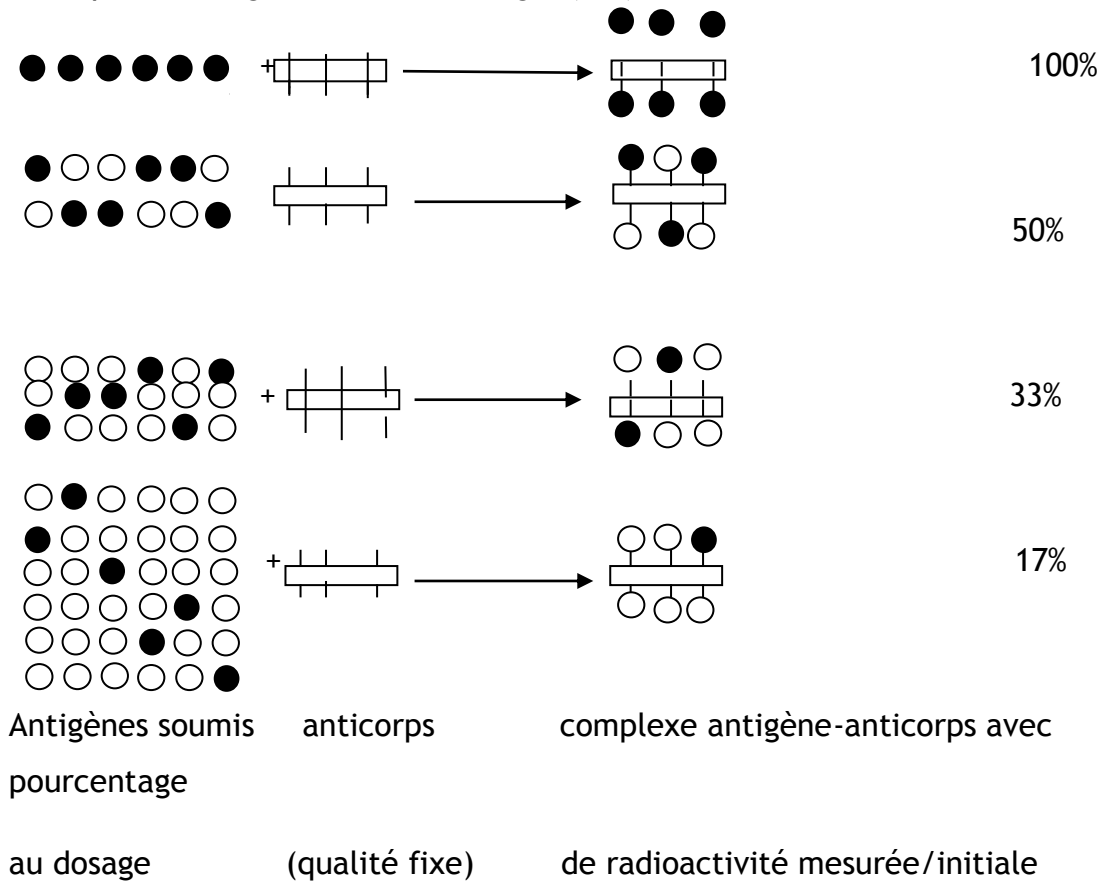


Fig. : Etalonnage d'un dosage radio immunologique

Principe de dosage radio-immunologie (RIA)



● Antigènes marqués (quantité fixe)

○ Antigènes non marqués (quantité variable) venant de l'échantillon

Préparation de l'antigène marqué

Le marquage est souvent réalisé dans le cas des hormones protéiques par l'iode radioactif ^{131}I ou ^{125}I . L'iode est fixé sur les noyaux tyrosine de la molécule. Ce marquage est un des facteurs limitants en radio immunologie. En effet, plus l'activité spécifique de l'antigène marqué est élevée, plus la sensibilité du dosage sera grande.

Dans certains cas on utilise des antigènes marqués par le tritium (dosage du cortisol par exemple). Le marquage des protéines est également possible par filtration de radicaux marqués au ^{14}C ou au ^3H sur des fonctions chimiques des acides aminés constitutifs.

Spécificité de la réaction immunologique

Elle dépend de la pureté de l'antigène utilisé et de l'anticorps obtenu, mais aussi de l'existence de réactions croisées avec des substances proches chimiquement et immunologiquement de la substance à doser.

Séparation de l'antigène marqué libre de l'antigène marqué fixé à l'anticorps

Diverses méthodes ont été proposées :

- Séparation par électrophorèse (Ag libre avec Ag lié)
- Immunoprécipitation (méthode par double anticorps)
- Gel filtration (le complexe Ac-Ag peut être séparé de l'Ag sur séphadex)
- Relargage (le complexe Ag-Ac peut être séparé par précipitation par le sulfate d'ammonium ou des solvants organiques)
- Adsorption de l'Ag libre (talk, charbon «support solide »), Ag-Ac reste en solution
- Fixation de l'anticorps (fixer les Ac sur un «substrat solide» tube plastique) qui fixent les Ag → vider → mesurer leur radioactivité