

Immunofluorescence

1° Le phénomène de fluorescence :

Certaines molécules, éclairées par une radiation lumineuse de longueur d'onde précise, réémettent une radiation de longueur d'onde supérieure. Ce phénomène est intéressant lorsque ces longueurs d'onde appartiennent au visible. La radiation émise est la lumière de fluorescence. La molécule responsable de la fluorescence est un fluorochrome.

Les fluorochromes utilisables en immunologie doivent posséder diverses propriétés dont :

- Fluorescence émise, facilement différenciable de l'auto fluorescence des tissus.
- Possibilité d'établir une liaison covalente avec le réactif immunologique afin de le marquer sans en modifier les propriétés immunologiques.

Pour visualiser la fluorescence émise par la préparation microscopique, on doit donc utiliser un microscope spécial, le microscope à fluorescence disposant, en outre les constituants classiques de tout microscope :

- D'une source lumineuse UV.
- D'un filtre excitateur placé sur le trajet de la lumière, avant le condenseur, afin de sélectionner la longueur d'onde permettant à la préparation de «fluorescer».
- D'un filtre d'arrêt des rayons dangereux pour l'œil de l'expérimentateur, situé entre la préparation et les oculaires.

Ce microscope doit être placé dans une pièce obscure afin que la fluorescence puisse être mieux détectée.

2° Les techniques d'immunofluorescence :

2.1. L'immunofluorescence directe :

Cette méthode est essentiellement utilisée pour la mise en évidence d'un antigène. Elle utilise un anticorps marqué, spécifique de l'antigène à rechercher. La réalisation est simple mais contraignante car elle nécessite de disposer d'autant d'anticorps marqués que d'Antigènes à détecter et le couplage du marqueur à l'anticorps est long, difficile à maîtriser, risquant toujours de dénaturer l'anticorps et de modifier son immuno-réactivité.

2.2. L'immunofluorescence indirecte :

C'est une méthode en deux temps car, après avoir formé un immunocomplexe Ag-Ac, on utilise un deuxième réactif fluorescent révélateur (anticorps fluorescent anti-Ig dit anticorps secondaire).

2.3. Méthode du sandwich :

Il s'agit d'identifier un anticorps intracellulaire d'une préparation fixée sur une lame. Des anticorps spécifiques des anticorps recherchés sont déposés sur celle-ci. Après lavage, afin d'éliminer les antigènes n'ayant pas réagi, les immuns-complexes sont mis en évidence par addition d'un anticorps fluorescent spécifique des épitopes restés libres sur l'antigène. L'antigène se trouve ainsi pris en sandwich entre les deux anticorps. Après lavage, l'observation d'une fluorescence au niveau de la préparation atteste la présence de l'anticorps recherché.