

V.1. Méthodes qualitatives

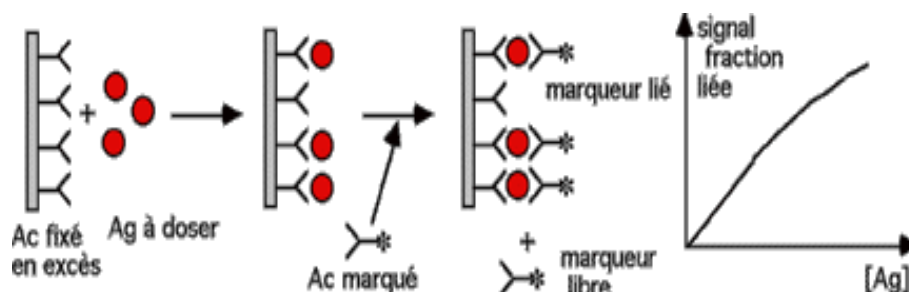
On les utilise en cytologie (ICC = immunocytochimie) ainsi qu'en biochimie p. ex. après électrophorèse (immunoblots). Le principe consiste à fixer un anticorps spécifique sur l'antigène d'intérêt puis à révéler la présence de cet anticorps, soit avec un second anticorps anti-anticorps accroché sur des microparticules d'or ("immunogold") ou sur lequel est fixée une enzyme (ex. peroxydase).

V.2. Méthodes quantitatives

V.2.1. Principes de base

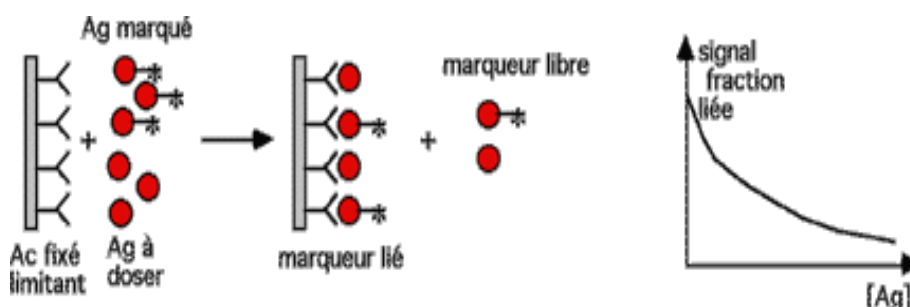
V.2.1.1. Méthodes par compétition et méthodes sans compétition : on distingue deux grands types d'immunodosages utilisant un marqueur, selon que le réactif (anticorps) est limitant ou en excès par rapport à l'antigène à doser.

❖ Dosages avec un excès de réactif : méthodes immunométriques ou méthodes directes



La totalité de l'antigène à doser se lie à l'anticorps fixé. Il est ensuite révélé par un anticorps marqué. On mesure la fraction liée qui augmente avec la concentration en antigène à doser. Cette méthode est plus spécifique, car elle utilise deux épitopes (sites antigéniques) différents de l'antigène ; elle est donc inutilisable pour les haptènes. Elle est aussi plus sensible.

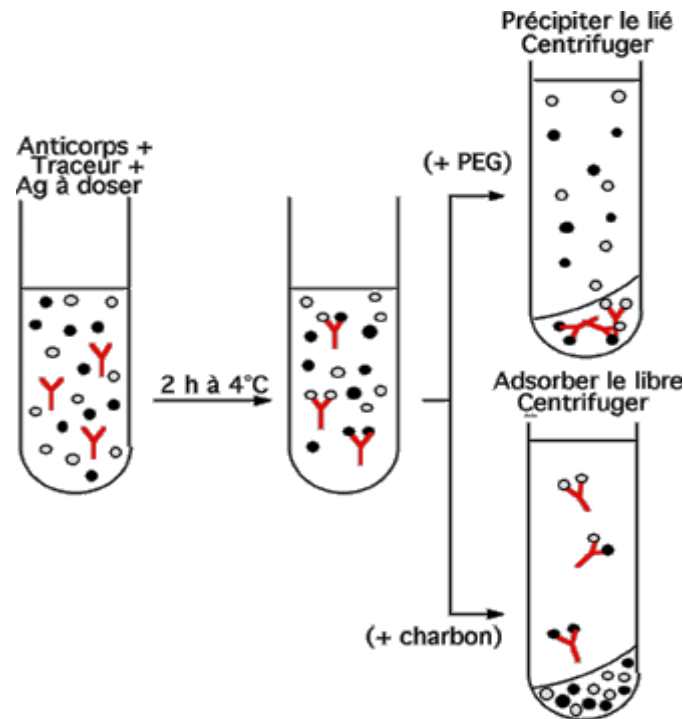
❖ Dosages avec réactif limitant : méthodes par compétition ou méthodes indirectes



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. On mesure la fraction liée qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser. Cette méthode s'applique à tous les antigènes quelle que soit leur taille, y compris les haptènes.

Les méthodes par compétition nécessitent l'emploi d'un **traceur**, qui est un analogue de l'antigène repérable par diverses méthodes : la molécule de traceur peut porter un atome radioactif (tritium, iode), une enzyme, être chimioluminescente voire être accrochée à un virus. La mesure de la liaison du traceur lié à l'anticorps nécessite l'utilisation d'une méthode adéquate de **séparation du traceur libre et du traceur lié** :

- la fraction liée peut être précipitée par du polyéthylène glycol (PEG) ou un alcool après avoir éventuellement rajouté des protéines comme entraîneur.
- la fraction libre peut être adsorbée sur du charbon actif "dextran-coated charcoal".



Ces méthodes ne peuvent être utilisées que lorsqu'on travaille sur des petites molécules, comme par exemple des hormones stéroïdes, et elles ne s'appliquent pas à des hormones protéiques.

V.2.2. Méthodes directes de dosage des anticorps

Trois méthodes sont couramment utilisées pour mesurer la fixation directe des anticorps sur un antigène : le RIA (RadioImmuno Assay), l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) et les techniques d'inhibition compétitives.

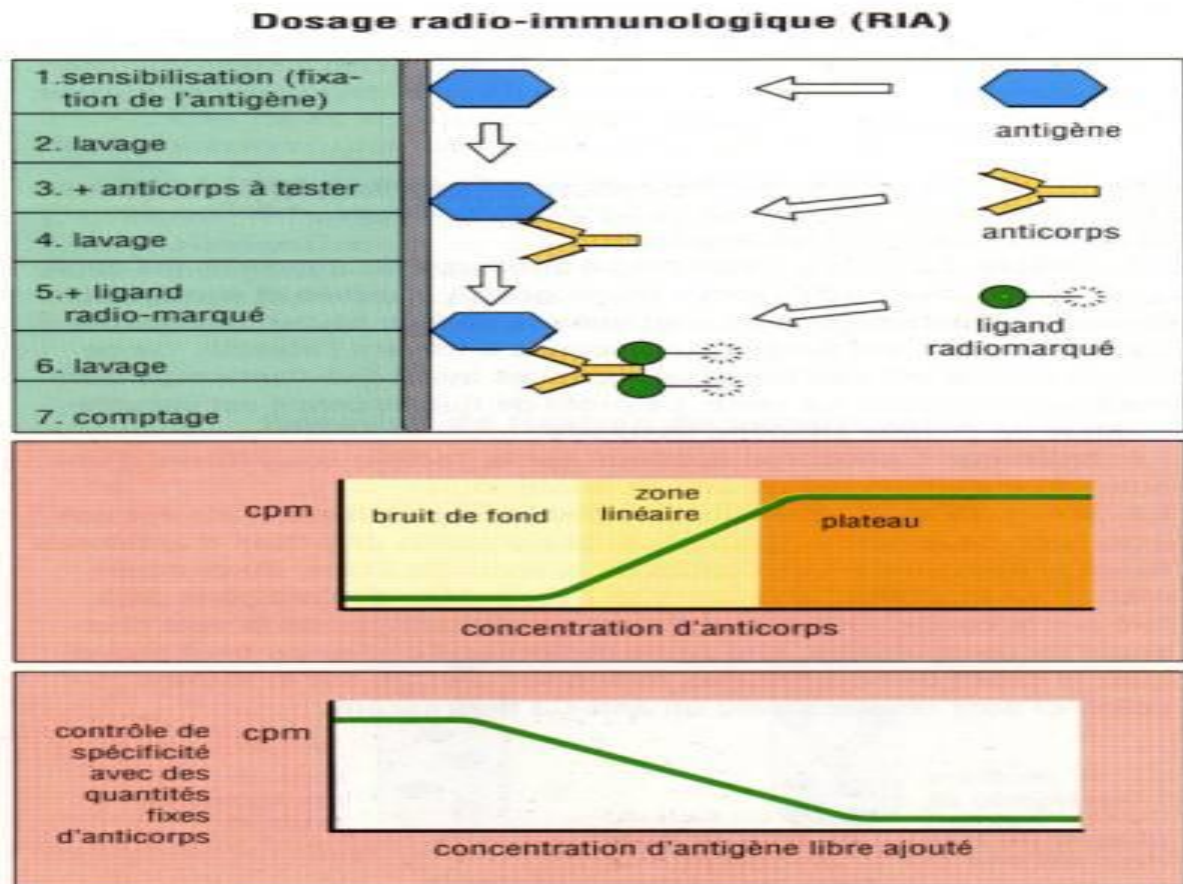
V.2.2.1. RIA (RadioImmuno Assay)

L'antigène spécifique des anticorps que l'on veut détecter est préalablement marqué à l'iode 125. La préparation contenant l'anticorps est alors incubée avec l'antigène marqué. Les complexes Ag/Ac qui se forment en phase liquide sont alors précipités avec une solution de chlorure d'ammonium ou de polyéthylène glycol.

Le culot de précipitation est ensuite lavé avec une solution saline et la présence de l'anticorps à doser est déterminée en mesurant la radioactivité présente dans le précipité et en le comparant avec une gamme étalon réalisée soit avec un sérum titré soit avec une préparation purifiée d'anticorps de concentration connue.

Cette technique, bien que relativement coûteuse et délicate car utilisant des produits radioactifs, présente l'avantage d'une grande sensibilité.

En biologie clinique, cette méthode est encore employée pour détecter la présence d'anticorps anti-ADN natif chez les patients atteints de LED (test de Farr) ou pour la détection des anticorps anti-GAD chez les diabétiques.



V.2.2.2. L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

La technique ELISA, plus simple et moins coûteuse, a presque totalement remplacé le RIA. La révélation du test n'utilise pas, comme dans le RIA, de radioéléments, mais elle est liée au clivage par une enzyme, d'un substrat incolore en un produit coloré.

A. Principe

- Fixation spécifique de la substance à doser sur un support ;
- Marqueur utilisé : enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline) ;
- Mesure de l'activité enzymatique par rapport à une courbe d'étalonnage (courbe sigmoïde).

Cette activité est fonction de la concentration de la substance à doser.

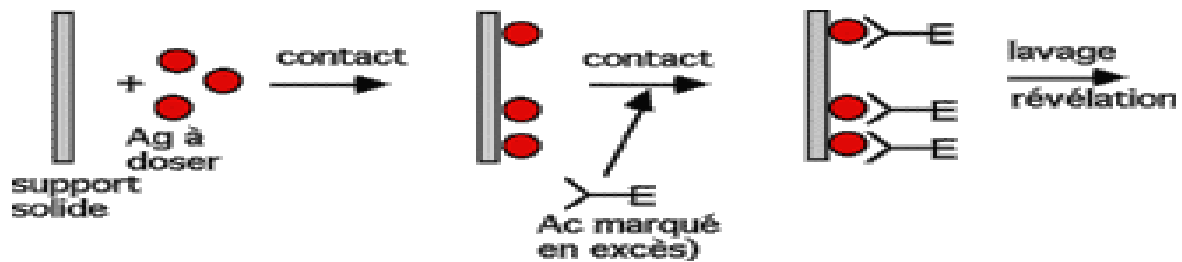
B. But : Dosage d'un Ag ou d'un Ac (méthode quantitative).

C. Différentes méthodes

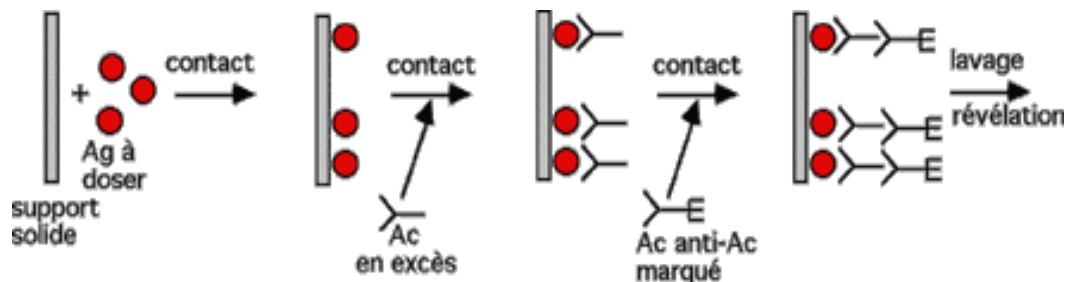
- ELISA direct ; - ELISA indirect ; - ELISA sandwich ; - ELISA compétition.

1. Dosage direct d'un antigène (ELISA direct)

Il est possible de fixer la totalité de l'antigène présent dans l'échantillon à doser sur la paroi du tube ou de la cupule de réaction, puis de révéler cet Ag par l'Ac marqué :



ou par l'Ac spécifique lui-même révélé par un Ac anti-Ac marqué :



➤ Dosage d'un anticorps

L'anticorps à doser est pris en "sandwich" entre l'antigène et un anticorps anti-anticorps marqué.



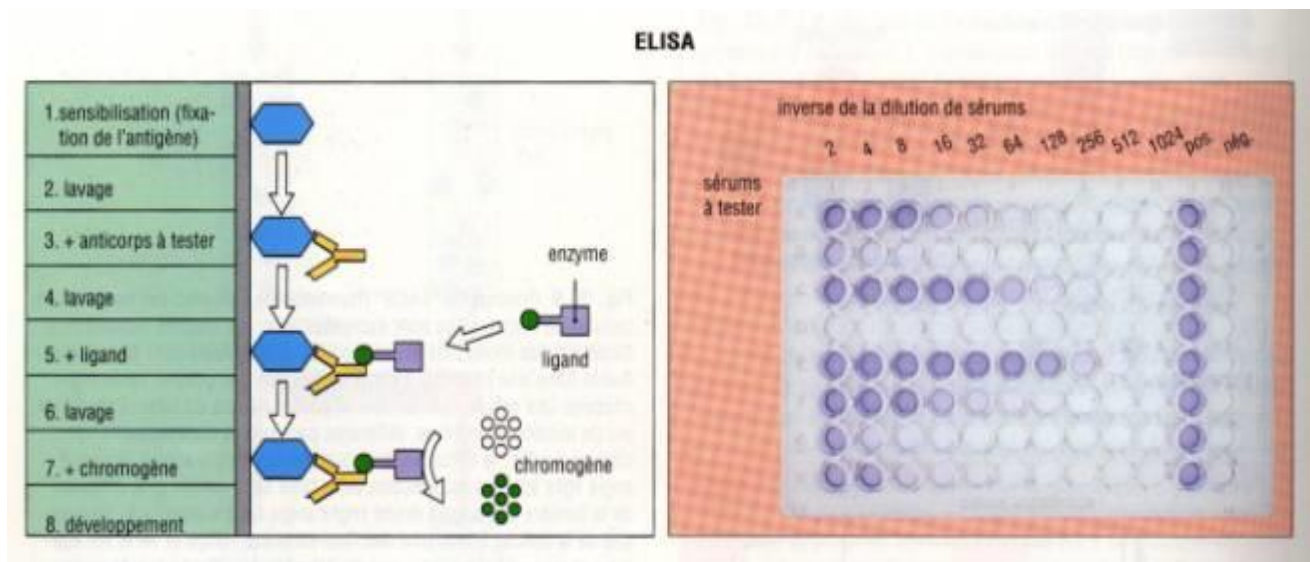
2. ELISA indirect

Pour détecter la présence dans un sérum d'un anticorps spécifique, l'antigène spécifique de l'anticorps à doser est déposé dans un puits à fond plat en plastique. L'antigène est dilué dans un tampon bicarbonate à pH 9,6, ce qui favorise les interactions électrostatiques entre l'antigène et le plastique de la plaque et permet la fixation stable de l'antigène au fond du puits, de façon à le rendre immobile.

Des dilutions limites du sérum contenant l'anticorps à doser sont alors déposées dans les puits. Après un temps de contact suffisant, les puits sont lavés avec une solution saline, de façon à retirer les anticorps non liés et de sorte que seuls les anticorps spécifiques restent fixés sur l'antigène et donc au plastique.

On révèle la présence de l'anticorps fixé au fond de la plaque en déposant ensuite dans le puits un anticorps anti-Immunoglobuline marqué avec une enzyme qui peut être la phosphatase alcaline ou la peroxydase.

Après le second lavage pour éliminer les anticorps non liés, il ne reste plus qu'à révéler la présence des anticorps spécifiques en ajoutant le substrat de l'enzyme ayant servi à marquer les anticorps anti-Immunoglobuline et à lire la réaction colorée.



L'ELISA peut être réalisé à visée quantitative ou qualitative :

➤ **Applications**

- **Essais quantitatifs** : On utilise l'ELISA direct pour le dosage de protéines variées. Quelques exemples tirés d'application en pharmacologie médicale : hormones thyroïdiennes, concentration en médicaments, etc.

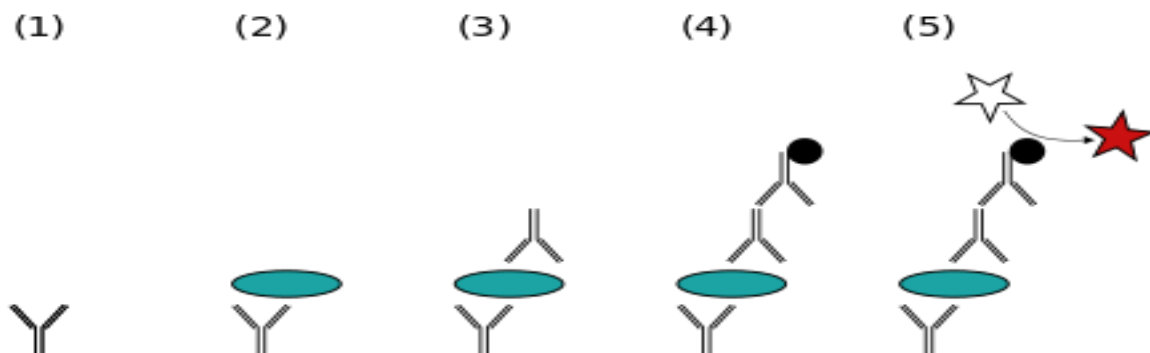
- **Essais qualitatifs** : test VIH par ELISA

L'application la plus connue du grand public est le dépistage en première ligne du VIH.

3. ELISA en sandwich

Le procédé se déroule, dans ses grandes lignes, comme suit :

- Une surface est préparée et une quantité connue d'anticorps dit de capture y est liée.
- L'échantillon contenant l'antigène est appliqué à la plaque.
- La plaque est rincée, de façon à éliminer l'antigène non-lié.
- Les anticorps conjugués à l'enzyme sont ajoutés.
- La plaque est rincée une deuxième fois.
- Le substrat convertible par l'enzyme en signal fluorescent est ajouté.
- Le résultat est analysé « à l'œil » ou dans un spectrophotomètre spécialement conçu pour accepter directement les plaques de 96 puits.
- Toutefois, ainsi qu'illustré, il existe le plus souvent une étape supplémentaire, l'addition d'anticorps de détection, afin d'éviter de créer des anticorps conjugués à l'enzyme pour chaque antigène. L'utilisation d'une enzyme couplée reconnaissant la fraction Fc des autres anticorps permet de l'utiliser dans une variété de situations et de réduire le coût de la procédure.



➤ Dosage d'un antigène par méthode sandwich (ELISA sandwich)

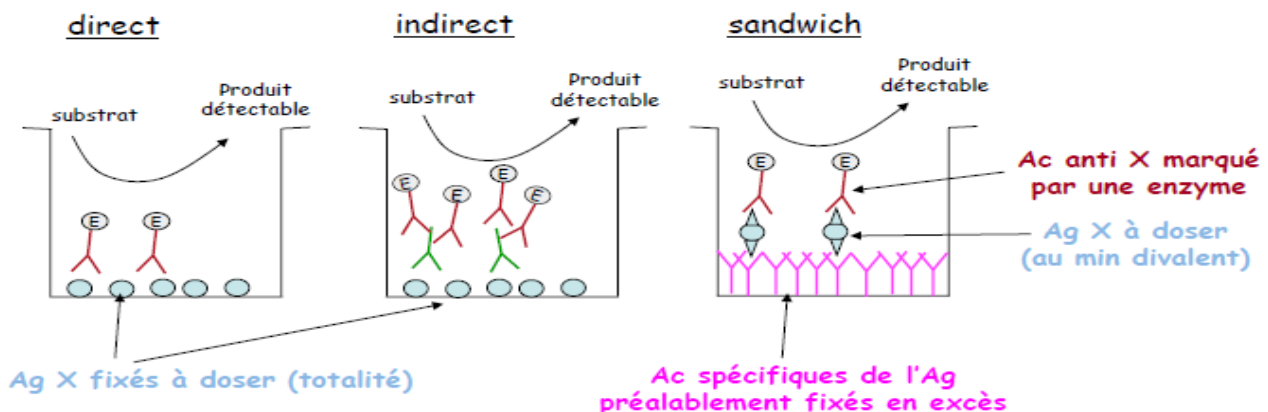


L'antigène doit posséder deux épitopes différents ; il est pris en "sandwich" entre deux anticorps.

➤ Dosage d'un antigène par la méthode du double sandwich



Dans ce cas, la fixation de l'antigène est révélée grâce à un anticorps anti-immunoglobuline marqué, qui se lie sur l'anticorps spécifique qui a reconnu l'antigène.



L'activité enzymatique est proportionnelle au titre de l'Ag.

4. ELISA par compétition (Méthodes avec réactif limitant = Méthodes en phase hétérogène)

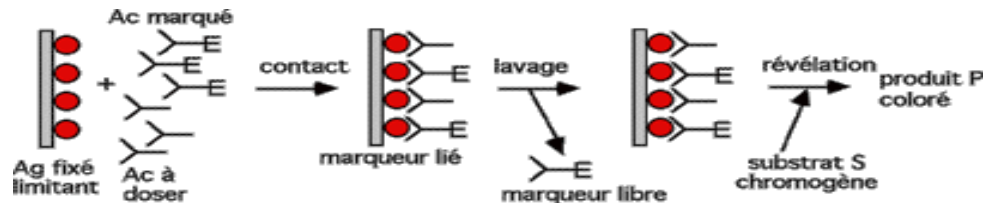
La phase hétérogène est constituée par une phase solide (paroi du tube, de la microplaque, billes magnétiques...), sur laquelle est fixé l'anticorps ou l'antigène (ou haptène). La fixation peut être faite par simple adsorption (sur le plastique) ou par différents types de liaisons plus spécifiques. Ces méthodes nécessitent une étape **de lavage** pour éliminer l'excès de marqueur qui ne s'est pas fixé.

L'utilisation de l'ELISA se fait par compétition de liaison. Elle permet le dosage d'un antigène :

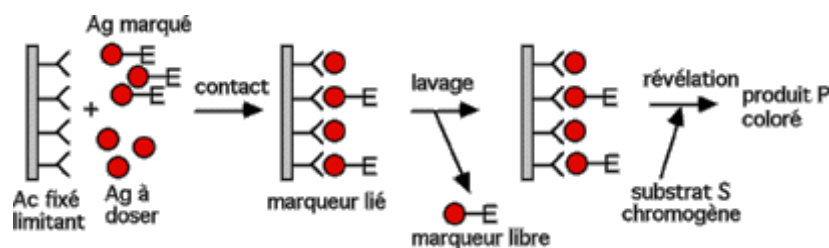
- Une plaque est préparée sur laquelle sont fixés des anticorps (en défaut).
- Un mélange d'antigènes marqués et des antigènes à doser (non marqués) est déposé sur la plaque.
- La plaque est rincée, de sorte que les antigènes non liés aux anticorps sont éliminés.
- La compétition joue donc entre les antigènes marqués (en quantité connue) et non marqués (en quantité à déterminer) pour leur liaison aux anticorps, qui sont en défaut.

- Ainsi plus les antigènes à doser sont nombreux, plus leur proportion parmi les antigènes retenus par les anticorps est grande, et plus le signal sera faible. Inversement, si la concentration initiale de l'antigène est faible, le signal sera fort.

❖ **Dosage d'un anticorps (ELISA compétition)**

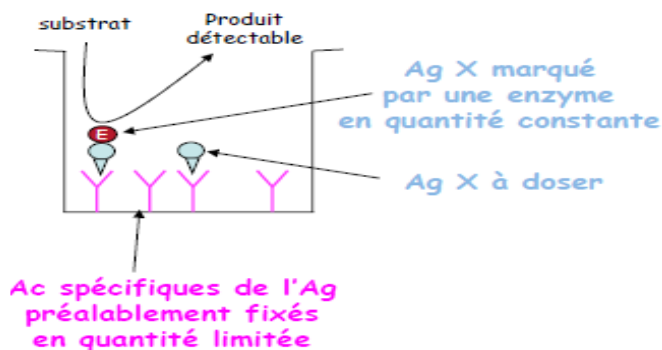


❖ **Dosage d'un antigène (ELISA compétition)**

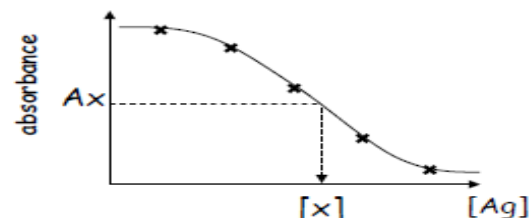


N.B. Cette technique est la technique ELISA "vraie".

compétition



→ Gamme étalon avec des [Ag] connues



L'activité enzymatique est **INVERSEMENT** proportionnelle au titre de l'Ag.

D. Applications

- **Dosage de protéines à faible concentration** : dosages spécifiques de certaines protéines plasmatiques : IgE, ferritine, hormones protéiques : hCG..., marqueurs tumoraux : alpha-foetoprotéine...

- **Recherche et dosage d'anticorps pour le diagnostic de maladies infectieuses (sérologie)** : en parasitologie (toxoplasmose...) et en virologie (virus de l'hépatite B, virus du SIDA...).

V.2.2.3. Immuno-empreinte ou Western blot

A. But : Détection des Ag dans des milieux complexes (méthode qualitative).

B. Principe

Une approche alternative pour éviter les problèmes liés à la manipulation de substances radioactives consiste à lyser les cellules directement dans un tampon riche en détergent.

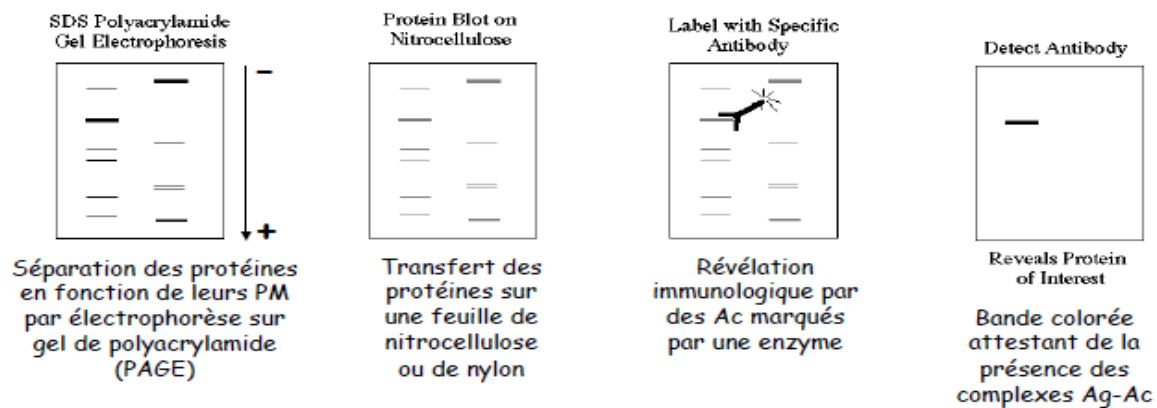
Le lysat cellulaire ou tissulaire ainsi obtenu est incubé avec du SDS et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les protéines ainsi séparées en fonction de leur masse moléculaire sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose.

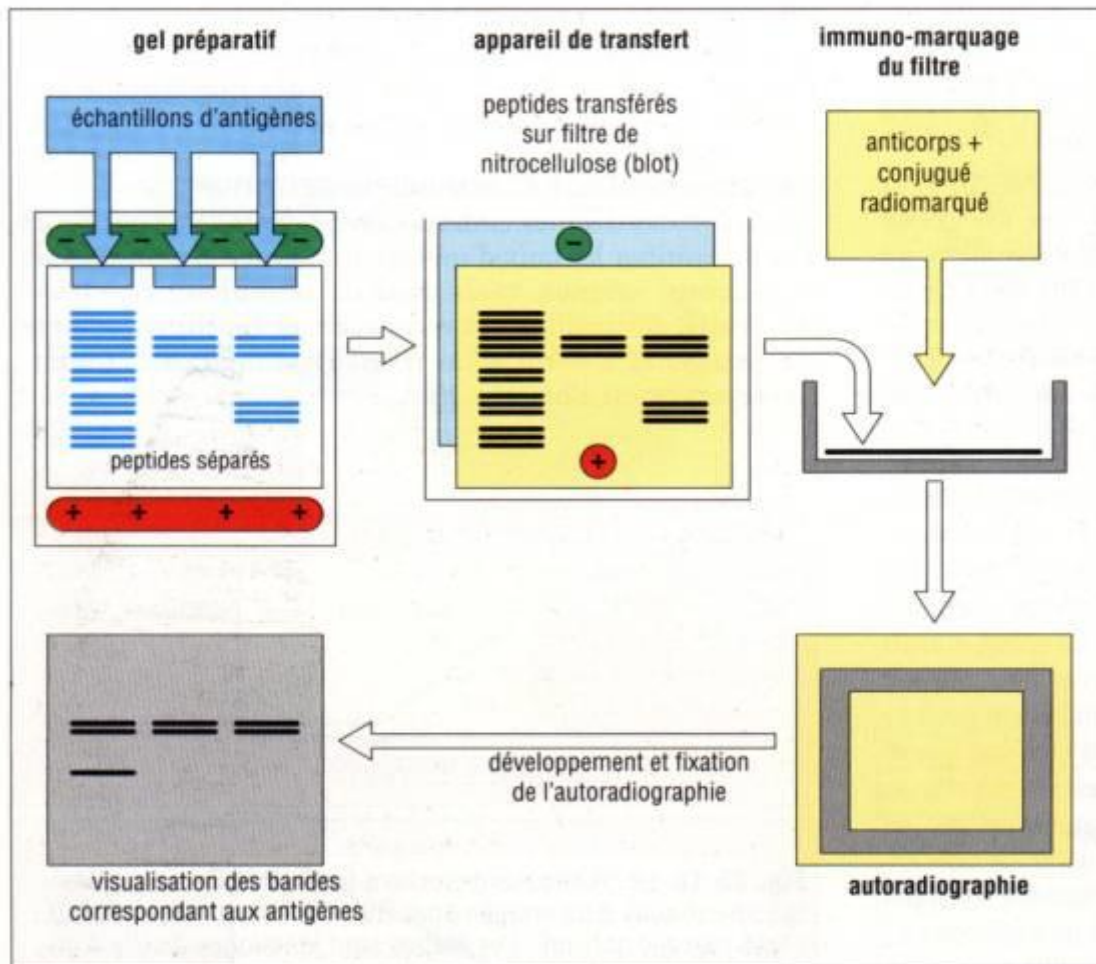
Les membranes sont ensuite incubées avec un anticorps marqué spécifique.

Après lavage pour éliminer la fixation d'anticorps non spécifique, la position des protéines est révélée à l'aide d'un Ac anti-Ig marqué avec un radioélément ou une enzyme.

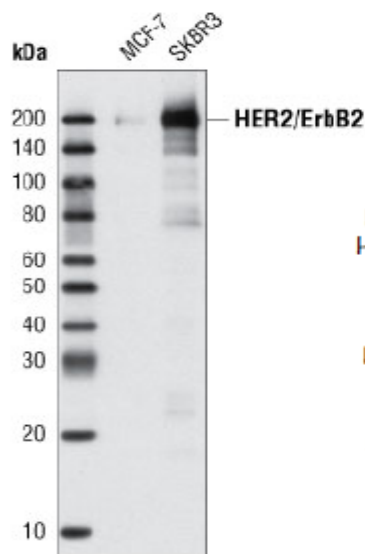
Cette méthode, appelée Western blot, a de nombreuses applications en biologie clinique. Elle permet notamment de détecter la présence dans le sérum des patients HIV+ d'anticorps spécifiques du virus et donc de contribuer au diagnostic de l'infection.



L'immuno-empreinte ("immunoblotting")



Western blot : Utilisation d'anticorps polyclonaux de lapin spécifiquement dirigés contre HER2.



Dans le cancer du sein, le gène codant la protéine HER2 est amplifié chez 20 à 30 % des patientes.

HER2 appartient à la sous-famille des **récepteurs** de facteurs de croissances épidermiques (ErbB), eux-mêmes impliqués dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration ainsi que la différenciation de la cellule.

MCF7 et SKBR3 sont des lignées cellulaires isolées de patientes atteintes de cancers du sein.