

Chapitre 15

Techniques utilisant des réactifs marqués

Le test ELISA

Introduction :

I/ Techniques immuno-enzymatiques : les tests ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

I.1 Principe

Elles reposent sur l'utilisation d'une enzyme pour déceler les complexes immuns. Les techniques ELISA sont très utilisées en :

- recherche fondamentale et appliquée (reconnaissance des épitopes protéiques, des haptènes)
- analyse médicale, pour le dosage de nombreuses substances (Ag, Ac, hormones, marqueurs tumoraux, médicaments...)

* Méthodes

- En phase homogène : La fixation de l'enzyme au complexe immunitaire modifie son activité (révélation directe).
- En phase hétérogène : Activité enzymatique inchangée après la fixation (besoin d'une étape de séparation entre les complexes marqués et l'Ag ou Ac marqués).

* Systèmes biologiques

- Ag : liquide biologique, une préparation brute ou purifiée de l'Ag ou de l'haptène.
- Ac : immunosérum total, des Ig purifiées ou des Ac (évite les réactions croisées).

* Phase solide et « fixation »

- Par adsorption passive sur du verre, du plastique, du polystyrène, latex... sous forme de billes, de plaques, de tubes, de microplaques...
- Par liaison covalente entre l'Ag ou l'Ac à la phase solide appropriée (cellulose activée, agarose ou acrylamide par le glutaraldéhyde).

* Conjugés, enzymes et substrats en phase hétérogène

L'agent chimique utilisé pour coupler une enzyme à un Ag ou à un Ac ne doit pas altérer l'activité enzymatique ni celle du réactif immunologique.

Quelques exemples d'enzyme.

ENZYME	ORIGINE	SUBSTRAT
Peroxydase (1)	Raifort (radis noir)	Diaminobenzidine, H ₂ O ₂ Tétraaminobenzidine, H ₂ O ₂
Phosphatase alcaline (2)	E. coli ou muqueuse intestinale de veau	4-nitro-phényl-phosphate
β -D galactosidase (3)	E. coli	2-nitro-phényl- β - Dgalactopyrannoside (ONPG)
Glucose oxydase	Aspergillus niger	Chromogène + H ₂ O ₂
Glucose 6 phosphate déshydrogénase	Leuconostoc mesenteroïdes	Glucose 6 phosphate + NAD ⁺

(1) : pour les dosages rapides

(2) et (3): pour un grand nombre d'échantillon

En fonction du substrat, le produit de la réaction est mesuré par spectrophotométrie, colorimétrie (examen visuel) ou par fluorométrie.

1.2 Différentes méthodes d'ELISA en phase hétérogène.

1.21 Dosage des antigènes

- Méthode directe :




- Méthode en « sandwich »

S'applique aux Ag possédant au moins **2 épitopes** (identiques ou non)



- Par compétition : Vis à vis d'Ac présents en quantité limitée, et fixés sur un support, il y a compétition entre l'Ag à doser et l'Ag marqué (de même spécificité) ajouté en quantité définie dans le même temps.



- Directe : Dosage immuno-enzymométrique ou IEMA

- Amplification par le système avidine-biotine (ABC) La biotine (coenzyme facile à lier aux Ig) a une très forte affinité pour l'avidine (blanc d'oeuf) et la streptavidine (*Streptomyces avidinii*). L'Ac biotynilé se lie sur l'Ag fixé à la phase solide puis, de la streptavidine conjuguée à une enzyme se lie à la biotine (complexe ternaire).

1.21 Dosage des anticorps.

Indirect avec antigène marqué

Indirecte avec anticorps secondaire marqué

1.3 Des exemples d'application:

- Dosage des protéines : la β 2m, drogues, hormones (insuline, glucagon...), médicaments, enzymes (énolase, lipase...), les facteurs rhumatoïdes, vitamines, IgE...
- Diagnostic sérologique : parasitaire, bactériologique par titrage d'anticorps (Brucella, Salmonelle, Treponema...), virologique (HIV, rubéole, hépatite A-B, varicelle, herpès, grippe...)
- Maladies auto-immunes : recherche et dosage des FR, des Ac anti-ADN, anti-histones, anti-Dsg1/3
- Des exemples et des techniques
 - Dosage direct Ag : -----
 - Dosage d'un Ag par méthode sandwich : -----
 - Dosage d'un Ag par méthode compétitive : -----
 - Dosage d'un Ac par méthode indirecte : -----

1.4 Compléments techniques.

Phase hétérogène :

Phase homogène :

Notion d'étude quantitative :

----- :

Critères du choix de la technique ELISA.

Technique utilisant l'immuno-empreinte (immunotransfert ou « western blot ») :

Quelques notions :

Cette technique combine le pouvoir de séparation de l'électrophorèse et la grande sensibilité de l'immunodétection, ce qui en fait un outil performant pour l'identification d'un Ag ou d'un Ac.
