

Immunoenzymologie

1° Place de l'Immunoenzymologie :

Elle a pour but de repérer des immuns-complexes Ag-Ac grâce à l'utilisation d'une enzyme fixée directement ou indirectement sur ces immuns-complexes. Elle a remplacé dans beaucoup de cas la technique radio-immunologique car l'utilisation de matières radioactives pose de nombreux problèmes.

L'essor de l'Immunoenzymologie est dû notamment au développement des anticorps monoclonaux qui présentent les avantages :

- D'avoir une spécificité très étroite et constante.
- D'être produits en quantités illimitées.
-

L'Immunoenzymologie est donc :

- Très utilisée dans le domaine de la recherche fondamentale et appliquée.
- Très utilisée sur le plan médical pour le dosage d'un grand nombre de substances existant dans les liquides biologiques qui peuvent être détectées à doses infimes.

2° Les diverses techniques immunoenzymologiques :

Il existe des méthodes en phase hétérogène et des méthodes en phase homogène.

Dans le cas où le comportement de l'enzyme libre et de l'enzyme liée est identique, il est nécessaire de séparer l'enzyme liée afin d'en mesurer l'activité. Ce sont les méthodes en phase hétérogène.

Lorsque la fixation de l'enzyme sur l'immunocomplexe en modifie l'activité, sa séparation avec l'enzyme libre n'est pas nécessaire. On utilise alors des méthodes en phase homogène. On n'examinera ici que les techniques en phase hétérogène qui peuvent être réalisées selon des techniques :

- Compétitives.
- Non compétitives : directes, en sandwich, indirectes.
-

Dans ces méthodes, la séparation de l'enzyme liée et de l'enzyme libre nécessite la fixation des antigènes ou des anticorps sur le support.

Elle a lieu :

- Soit par simple adsorption passive sur tubes et microplaques de polystyrène.
- Soit par création de liaisons covalentes sur Sephadex, cellulose activée, agarose, acrylamide, polystyrène.

2.1. Méthodes en phase hétérogène compétitives :

Vis-à-vis d'anticorps spécifiques, présents en quantité limitée, et fixés sur un support, il y a une compétition entre :

- L'antigène à doser.
- Et l'antigène marqué, de même spécificité, ajouté en quantité définie en même temps que l'antigène à doser.

Quand la réaction a atteint son équilibre, la quantité d'immuns-complexes antigène marqué-anticorps est d'autant plus petite que la concentration en antigène à doser est grande.

2.2. Méthodes en phase hétérogène non compétitives :

2.2.1. Méthode directe :

L'antigène à mettre en évidence est fixé sur un support. La méthode consiste à le faire réagir avec un anticorps couplé à une enzyme.

Après lavage, l'activité enzymatique est révélée directement par addition du substrat de l'enzyme. L'un des produit de la réaction est en général coloré et quantifiable par spectrophotométrie.

Une étude quantitative peut être faite en traçant une courbe d'étalonnage obtenue en travaillant dans les mêmes conditions que pour l'antigène à analyser. L'activité enzymatique est d'autant plus importante qu'il y a plus d'antigène.

C'est une méthode de réalisation simple mais de technique contraignante, car elle nécessite de disposer d'autant d'anticorps marqués que d'antigène à détecter. D'autre part, le couplage de l'enzyme à l'anticorps est parfois difficile à maîtriser, risquant de dénaturer l'anticorps et de modifier son immuno-réactivité.

2.2.2. Méthode du sandwich :

Elle ne s'applique qu'à des antigènes possédant au moins deux épitopes identiques ou non. Le principe est le même qu'en immunofluorescence. Le marqueur couplé à l'anticorps est ici une enzyme dont on mesure l'activité par addition des substrats.

Une étude quantitative peut être faite en traçant une courbe d'étalonnage obtenue en utilisant des solutions étalons d'antigène et en travaillant dans les mêmes conditions que pour l'antigène à analyser. L'activité enzymatique d'autant plus importante qu'il y a plus d'antigène.

2.2.3. Méthode indirecte :

Elle a pour but de repérer et éventuellement de doser un anticorps sérique en le mettant en présence d'un antigène spécifique fixé sur un support. Un immuncomplexe Ag-Ac se forme et les anticorps de ces immuns-complexes sont révélés après lavage par un anticorps anti-Ig marqué par une enzyme.

En effet, après lavage l'activité de l'enzyme est révélée par addition de ses substrats.

Une étude quantitative peut également être faite en traçant une courbe d'étalonnage obtenue en travaillant dans les mêmes conditions que pour l'anticorps sérique à doser. L'activité enzymatique est d'autant plus importante qu'il y a plus d'anticorps.

C'est une technique nécessitant une gamme restreinte d'anticorps marqués, présentant d'autre part une plus grande sensibilité. Mais le temps de réaction est allongé en raison de la nécessité d'une étape supplémentaire.