

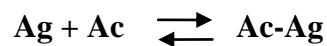
Chapitre III

Les dosages hormonaux.

Les méthodes immunoanalytiques sont les plus utilisées pour les dosages hormonaux: ces techniques consistent à utiliser des anticorps spécifiques des hormones. Les immunodosages classiques sont le *radio immunoassay* (RIA), l'*immuno radiologic measurement assay* (IRMA) ou l'*enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Aujourd'hui apparaissent, notamment avec l'avènement des automates, des techniques nouvelles dérivées de ces techniques fondamentales [11].

III.1. Principe.

L'immunoanalyse se base sur le principe révolutionnaire proposé, en 1959, par Yalow et Berson [18] dans lequel un anticorps (Ac) repère et capture une substance à doser (analyte) reconnue comme antigène (Ag) selon la réaction équilibrée :



Ainsi, l'immunoanalyse correspond à un ensemble de techniques qui mettent à profit la réaction antigène-anticorps pour détecter ou doser des antigènes, des anticorps et éventuellement des immunocomplexes [9]. Ces techniques comportent une étape de reconnaissance immunologique, suivie de la mesure du signal émis par un marqueur, ce dernier pouvant être fixé aussi bien à l'antigène qu'à l'anticorps. Le marqueur peut être un atome (radioactif par exemple), un ion (lanthanides Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} aux caractéristiques de fluorescence intéressantes), une molécule organique de faible masse molaire (fluorescéine, ester d'acridinium) ou de masse molaire élevée (enzyme) [14].

III.2. Classification.

Trois critères principaux permettent de décrire les principes d'un immunodosage :

- le type de dosage : direct ou par compétition ;
- le système traceur ;
- les supports utilisés pour les réactions.

III.2.1. Classification selon le type de dosage : direct ou par compétition.

En fonction des concentrations relatives en anticorps et en antigène, on distingue deux grandes catégories des immunodosages:

III.2.1.1. Les dosages dites « par compétition ».

Dans un dosage par compétition, l'hormone à doser (l'analyte) est mélangée avec de l'hormone marquée (un analyte marqué), puis incubée avec des anticorps spécifiques, le plus

souvent polyclonaux, présents en faible concentration par rapport à celle de l'hormone (l'antigène défaut d'anticorps) ; afin d'avoir un large excès d'hormone. Dès lors, l'hormone à doser et l'hormone marquée par le traceur entrent en compétition pour la liaison aux anticorps. Après isolement des complexes anticorps/hormones par précipitation ou fixation sur une phase solide, on mesure le signal émis par la fraction liée (la quantité d'hormone marquée). La quantité d'hormone à doser est inversement proportionnelle à ce résultat. La technique de référence est le RIA: le traceur est radioactif (Iode 125 ou tritium); les anticorps peuvent être en solution ou fixés à un support solide [10; 11] (Fig. 06A).

III.2.1.2. Les dosages directs dites «non compétitifs ou immunométriques».

Dans un dosage direct ou immunométrique, l'hormone à doser est incubée en présence d'un excès d'anticorps. La technique la plus courante est la technique « sandwich » : l'hormone à doser est reconnue par deux anticorps fixé la totalité de l'hormone, le second couplé à un traceur marquer les molécules hormonales fixées au premier anticorps. La quantité d'hormone est proportionnelle à la quantité de traceur mesurée. Le premier anticorps est fixé aux parois des tubes de réaction ; le traceur du deuxième anticorps est un isotope radioactif. La technique ELISA: dérive directement de l'IRMA: le traceur radioactif est remplacé par une enzyme qui catalyse une réaction colorée [11] (Fig. 06B).

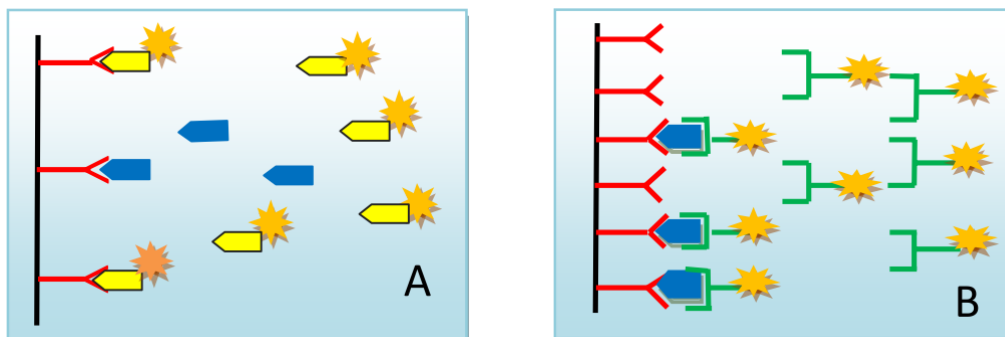


Figure 06 : Les dosages par compétition et direct.

A. Le dosage par compétition radio immunologic assay (RIA) : les hormones à doser (en bleu) sont mélangées à des hormones marquées (en jaune) ; les hormones sont en excès par rapport aux anticorps (en rouge), ce qui entraîne une compétition entre hormones à doser et hormones marquées pour la fixation aux anticorps ; on mesure la quantité d'hormone marquée fixée aux anticorps qui est inversement proportionnelle à la quantité d'hormone à doser.

B. Dosage direct immuno radiologic measurement assay (IRMA) : des premiers anticorps (en rouge) sont en excès par rapport aux hormones à doser (en bleu), permettant une fixation directe et complète ; des seconds anticorps (en vert), également en excès et qui sont marqués, se fixent sur un autre épitope de l'hormone, réalisant un « sandwich » ; on mesure la quantité d'anticorps marqué fixé qui est proportionnelle à la quantité d'hormone à mesurer.

Les dosages par compétition sont moins sensibles (limite de détection plus élevée) et moins spécifiques que les dosages immunométriques. Et sont surtout utilisées lorsque l'hormone ne possède qu'un seul épitope, c'est-à-dire que l'on ne dispose que d'un seul anticorps spécifique. Citons l'exemple du cortisol, encore souvent dosé par RIA. [10,11]

La réaction antigène-anticorps peut être influencée par de nombreux paramètres : le pH, la force ionique, la concentration en protéines du milieu. Ces paramètres dépendent du liquide biologique et, pour le sérum ou le plasma, du tube de prélèvement [10]

III.2.2. Classification selon le système traceur (le marqueur).

Les principaux marqueurs utilisés en immunoanalyse courante sont: les radioéléments, les enzymes, les fluorophores et Les molécules chimiluminescentes [12].

III.2.2.1. Méthodes radio-immunologiques (RIA et IRMA).

Historiquement, le signal radioactif est le premier à avoir été utilisé en immunoanalyse. Les critères de choix d'un radio-isotope reposent sur la période radioactive qui ne doit être ni trop courte (marquages trop fréquents, correction de décroissance radioactive), ni trop longue (signal radioactif insuffisant), sur la facilité de détection qui dépend de la nature et de l'énergie du rayonnement émis et sur la simplicité des opérations de marquage. En pratique, les radio-isotopes les plus utilisés sont l'iode 125 (^{125}I), le tritium (^3H) et le cobalt 57 (^{57}Co) [14]. La période de ^{125}I représente le compromis idéal entre une activité (nombre de désintégrations par unité de temps), c'est-à-dire un signal mesuré suffisant, et une durée de vie acceptable du réactif marqué (environ 6 semaines). De plus, les rayonnements émis (λ et X de faible énergie) sont faciles à détecter par scintillation en milieu solide. Ces raisons font que ^{125}I est, actuellement, le radio-isotope de choix en radio-immunoanalyse compétitif et immunométrique (RIA et IRMA) même pour le marquage des molécules de petite taille (haptènes). Le marquage au tritium est de plus en plus rare et réservé aux cas où le marquage à ^{125}I n'est pas réalisable ou conduit à des molécules trop instables. Le marquage au ^{57}Co est utilisé associé à ^{125}I pour le dosage simultané de deux analytes (dosage simultané de vitamine B₁₂ et d'acide folique, par exemple) [14].

III.2.2.2. Méthodes immuno-enzymatiques (méthodes ELISA).

Les enzymes ont été introduites dans les immunodosages dès 1971 comme alternatives aux radio-isotopes et constituent, actuellement un des marqueurs les plus utilisés. Dans ces méthodes, un signal d'absorption ou d'émission lumineuse est obtenu, après la réaction immunologique, par action de l'enzyme sur un substrat approprié [14]. Les enzymes sont des

catalyseurs biologiques spécifiques d'une réaction chimique qu'ils accélèrent en abaissant l'énergie d'activation et qui se retrouvent non modifiées à la fin de la réaction. La plupart sont des protéines ou des glycoprotéines de masse molaire élevée [14]. Les principales enzymes utilisées en immunoanalyse sont la peroxydase de raifort et la phosphatase alcaline surtout, mais aussi la B-D-galactosidase, le glucose oxydase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase [15].

Tableau 01 : Principales enzymes utilisées en immunoanalyse [14].

(EC dénomination internationale, Mr masse molaire relative)

Enzyme	Substrat chromogène	Produit (λ_{\max})
Peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxydase</i> HRP) EC 1.11.1.7 Mr = 44000	H ₂ O ₂ + o-phénylènediamine (OPD) Azino-di [éthylbenzothiazoliny sulfonate] (ABTS) Tétraméthylbenzidine (TMB)	o-nitroaniline (492 nm)
Phosphatase alcaline EC 3.1.3.1 Mr = 140000	p-nitrophényl phosphate (PNPP)	p-nitrophénol (405 nm)
β-D-galactosidase EC 3.2.1.2.3 Mr = 540000	o-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG)	o-nitrophénol (405 nm)
Glucose oxydase EC 1.1.3.4 Mr = 186000	Glucose \rightarrow H ₂ O ₂ + HRP et OPD	o-nitroaniline (492 nm)
Glucose-6-phosphate déshydrogénase EC 1.1.1.49 Mr = 128000	Glucose-6-phosphate + NADP ⁺ ou NAD ⁺	NADPH + H ⁺ ou NADH + H ⁺ (340 nm)

La particularité du marqueur enzymatique contrairement au radio-isotope est que le signal délivré peut subir une modulation (inhibition ou moins fréquemment activation) lors de la réaction antigène-anticorps, ce qui permet de suivre directement son déroulement sans avoir à séparer les formes libre et liée. Les méthodes correspondantes sont dites « en phase homogène » et sont utilisées en raison de leur simplicité et leur rapidité dans le dosage d'analytes qui ne requièrent pas une limite de détection basse (dosages de médicament de stupéfiants) [16].

III.2.2.3. Méthodes immuno-luminescentes.

Des anticorps marqués à l'aide de fluorophores sont utilisés depuis 1941 dans les techniques d'immunofixation en histologie. En revanche, les applications à l'immunoanalyse datent seulement d'une vingtaine d'années [14]. Associés aux marqueurs chimiluminescents et bioluminescents, les marqueurs fluorescents entrent dans le cadre plus général des marqueurs luminescents [16,17]. Ceux-ci émettent un signal provoqué par un apport d'énergie extérieure contrairement au signal du marqueur radioactif qui est spontané et direct [14].

III.2.2.3.1. Méthodes d'immuno-florescence.

Ces marqueurs émettent de la lumière après une excitation photonique de longueur d'onde appropriée. Les principaux marqueurs utilisés sont :

Les fluorophores conventionnels : fluorescéine, rhodamine, ombelliférone, leur détection est réalisée par fluorimétrie conventionnelle; certains peuvent être employés dans les immunodosages par polarisation de fluorescence.

Les chélates de lanthanides (Eu³⁺, Tb³⁺, Sm³⁺) : ils sont détectés par fluorimétrie à résolution temporelle [14].

III.2.2.3.2. Méthodes d'immuno-chimiluminescence.

On distingue plusieurs familles de composés chimiluminescents :

Les phtalhydrazides : le luminol , l'isoluminol et ses dérivés substitués sont les plus utilisés. Par oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène et d'un catalyseur, ces composés sont transformés en espèces excitées qui se désexcitent avec émission de photons selon la réaction :



Il existe deux manières d'utiliser ces molécules en immunoanalyse. En chimiluminescence directe, le marqueur est constitué par la molécule chimiluminescente et il suffit d'ajouter les réactifs (peroxydase et H₂O₂) en fin de dosage. L'autre possibilité qui correspond à la chimiluminescence indirecte, consiste à fixer la peroxydase sur l'antigène ou l'anticorps et à ajouter les réactifs (substrat luminogène et H₂O₂) en fin de dosage [14].

Les esters d'acridinium : contrairement à la catégorie précédente, ne nécessitent pas obligatoirement la présence d'agents catalytiques. L'addition de peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin suffit à déclencher la réaction de chimiluminescence. Le composé formé (N-méthyl acridone) dans un état singulet excité se désexcite en émettant de la lumière dont le maximum de longueur d'onde est situé à 470 nm [14].

Les dioxétanes : sont des composés spontanément chimiluminescents. Il est possible de les stabiliser en greffant un groupement phosphate ou galactose. L'émission lumineuse est, alors, obtenue grâce à l'action de l'enzyme correspondante (phosphatase alcaline ou B-D-galactosidase). Le substrat le plus répandu est un ester d'adamantyl dioxétane phosphate (AMPPD) [14].

Les avantages ou inconvénients des marqueurs utilisés aux techniques d'immunoanalyse ont été résumés dans le tableau suivant [14] :

Tableau 02 : Avantages ou inconvénients des marqueurs utilisés en immunoanalyse [14].

Marqueur	Avantages	Inconvénients
Radioactif	Faible encombrement stérique Signal direct spontané Signal très spécifique Signal non perturbé par l'environnement physicochimique. Bonne reproductibilité	Acquisition du signal longue Durée de vie limitée du réactif marqué (radiolyse) Séparation de phase quasi obligatoire Contraintes législatives Déteçtabilité insuffisante
Enzymatique	Mise au point d'immunodosages sans séparation de phase possible Mesure du signal (absorbance) simple et rapide Amplification du signal possible Stabilité des produits marqués	Encombrement stérique important Signal indirect (nécessité d'une étape supplémentaire) Mauvaise spécificité du signal d'absorption Dynamique faible du signal d'absorption
Fluorescent	Stabilité des produits marqués Facilité de marquage Signal intense et spécifique (chélates de lanthanides) Grande dynamique du signal Mise au point d'immunodosages sans séparation de phase possible Mise au point possible du dosage stimulante de plusieurs analytes	Appareillage complexe (mesure avec résolution en temps) Signal peu spécifique (fluorophores conventionnels) mauvaises déteçtabilité et reproductibilité Risque de contamination par eu exogène
Chimiluminescent	Stabilité du marqueur Signal intense Pas de lumière parasite (signal très spécifique) Acquisition rapide Grande dynamique	Appareillage spécialisé Signal fugace (imprécision de la mesure) Quenching possible

III.2.3. Classification selon les supports utilisés pour les réactions.

Différents supports peut être utilisé pour les réactions immunoanalytiques :

III.2.3.1. Les réactions en phase liquide.

Consistent à incuber en solution les anticorps et les hormones à doser. La séparation des complexes anticorps/hormone fait ensuite appel à différentes techniques biochimiques de précipitation, d'adsorption (par exemple, anticorps biotinylés adsorbés sur de la streptavidine). Parfois, ce sont les hormones libres qui sont éliminées (par exemple, adsorption sur charbons actifs) [11].

III.2.3.2. Les réactions en phase solide.

Les anticorps sont le plus souvent liés à un support solide comme le tube de réaction : il s'agit de réactions en phase solide. Les tubes peuvent être associés en plaques. Les anticorps peuvent aussi être fixés à des microbilles magnétiques, et récupérés par l'application d'un champ magnétique. Parfois enfin, les anticorps sont fixés sur des membranes [11].

III.2.3.1. Les supports complexes.

Parfois les supports sont complexes : citons le cas particulier des bandelettes de dosage qualitatif des b-hCG urinaires (test de grossesse). Il s'agit d'un dosage sandwich. L'urine migre par capillarité le long d'une membrane. Dans la partie inférieure, des anticorps monoclonaux de souris sont libres et se couplent en phase liquide aux molécules d'hCG. Ces anticorps sont couplés à des particules d'or colloïdes leur donnant une coloration après réhydratation (par l'urine). Ils vont migrer avec l'urine et rencontrer deux lignes d'anticorps fixés à la membrane : une première ligne d'anticorps anti-anticorps de souris (contrôle positif) et plus loin des anticorps anti-hCG reconnaissant un autre épitope de l'hCG. Ainsi, en cas de présence d'hCG, les deux lignes d'anticorps fixés se colorent, et en l'absence d'hCG, seule la première ligne se colore [11].