

**Enseignement d'Immunologie
Septembre 2009**

ET03

**Tests immuno-enzymologiques
(ELISA, Exemples de sérologie)**

DES de Biologie Médicale



**Universités des Sciences de la Santé
CAMBODGE – LAOS**

Avec la participation de l'Université Pierre et Marie Curie



Soutenu par :

Projet d'Appui à l'Enseignement Supérieur Médical en R.D.P. Lao
Projet d'Appui à l'Université des Sciences de la Santé au Cambodge
Fondation Mérieux au Cambodge et au Laos (Centre Christophe Mérieux)

DOSAGES IMMUNO-ENZYMATIQUES

I. DOSAGES IMMUNOENZYMATIQUES

- A. Généralités
- B. Dosage d'Ac par ELISA indirect
- C. Technique sandwich
- D. Technique de compétition
- E. Variantes
- F. Matériel
- G. Systèmes d'amplification
- H. Expression des résultats
- I. Quelques pièges de l'ELISA
- J. Applications de l'ELISA

II. EVOLUTIONS

- A. Automatisation
- B. La technologie Luminex®
- C. Les puces à protéines

I. DOSAGES IMMUNOENZYMATIQUES

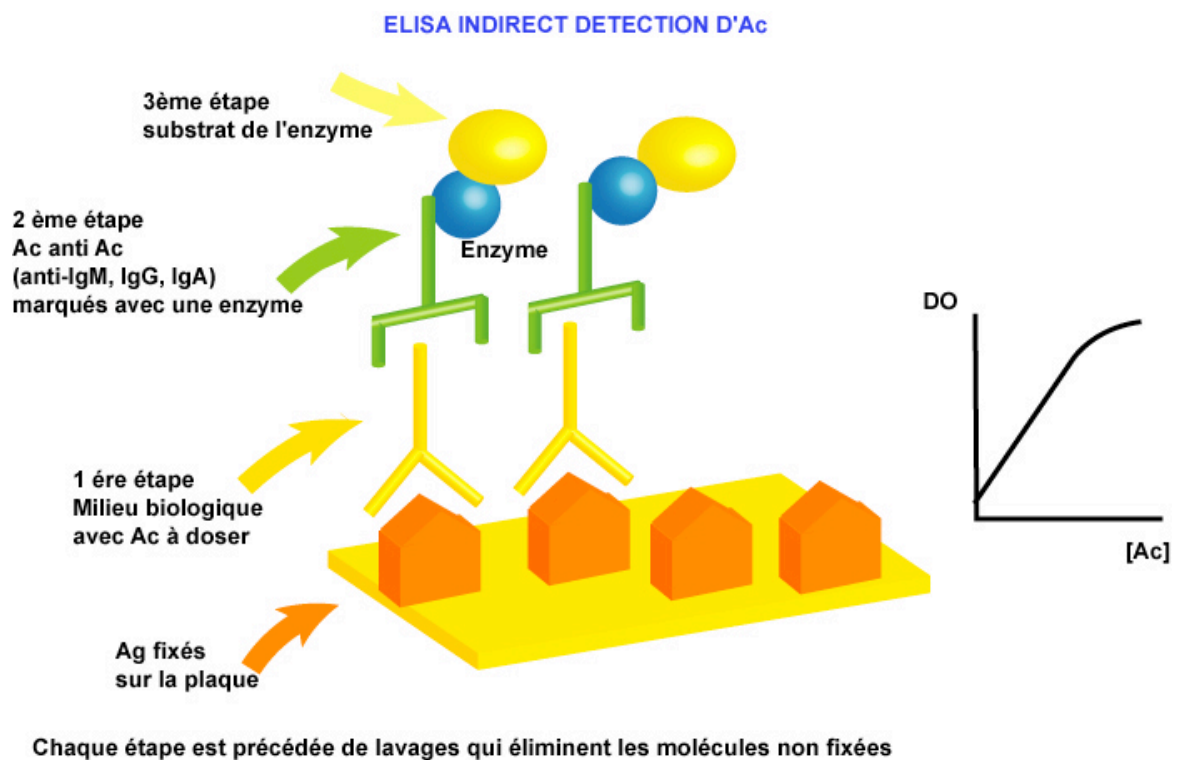
A. Généralités

Les dosages immuno enzymatiques sont relativement récents. Engwall et Van Weeman réalisent les premiers **ELISA** (enzyme linked immuno sorbent assay) en 1971. **Il s'agit d'un dosage dans lequel un des réactifs (l'Ag ou l'Ac à doser) est immobilisé (adsorbé) sur un support plastique. La révélation de la réaction Ag-Ac est possible grâce au marquage du réactif libre (Ac ou Ag) par une enzyme (= une enzyme est fixée de façon covalente à l'Ag ou à l'Ac libre, on dit que l'Ag ou l'Ac libre est conjugué à une enzyme). L'activité de cette enzyme conjuguée est mise en évidence par des substrats chromogènes ou par fluorométrie ou par chimioluminescence.**

Plusieurs modalités de dosage sont possibles, soit par **compétition**, soit par **révélation directe ou indirecte (technique sandwich)**. Ils peuvent servir à doser aussi bien des Ag que des Ac. De nombreux montages sont ainsi possibles. Quelques uns sont décrits dans les chapitre suivants.

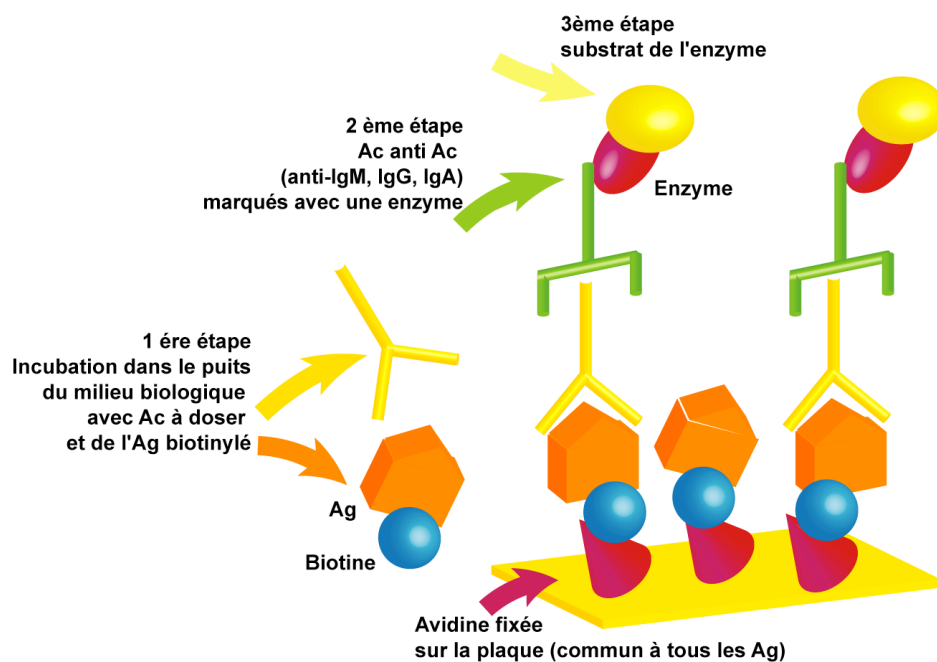
B. Dosage d'Ac par ELISA indirect

Dans ce procédé, les Ac à doser réagissent dans un premier temps avec l'Ag immobilisé. Dans un deuxième temps, la quantité d'Ac fixé sur l'Ag en excès est mesurée à l'aide d'un deuxième Ac (anti-immunoglobuline) conjugué à une enzyme. L'activité enzymatique est élevée quand il y a beaucoup d'Ac marqué fixés, donc beaucoup d'Ac ayant réagi dans le premier temps. L'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité d'Ac à doser. Cette technique permet de caractériser la classe d'Ac à doser (en utilisant en deuxième Ac un anti- μ , - γ , - α marqué).



C. ELISA indirect avec capture de l'Ag sous forme liquide par le système avidine-biotine

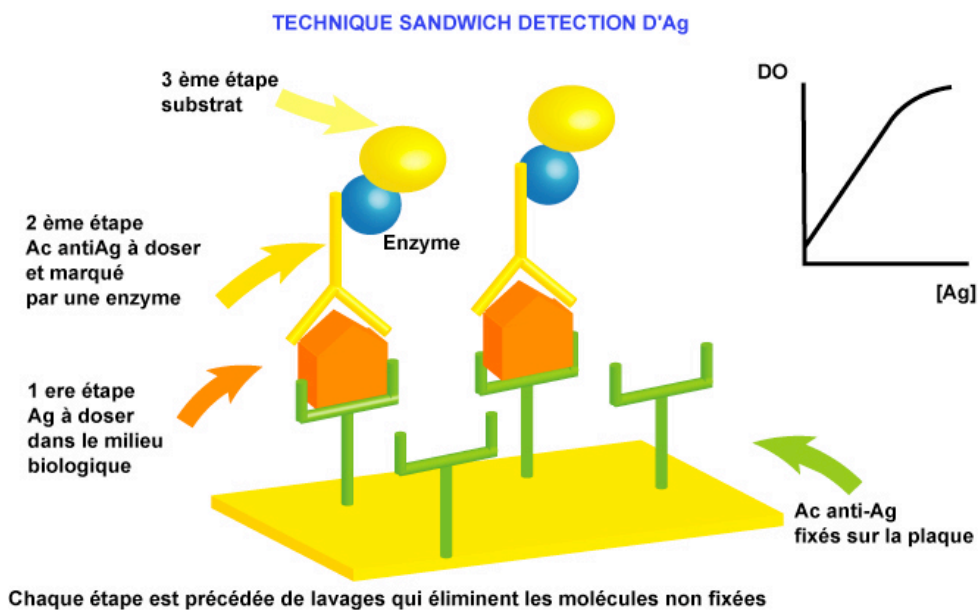
Une méthode récente (BIOONE®, Zentech) se distingue de l'ELISA indirect classique par l'utilisation d'Ag biotinilés sous forme liquide et d'une microplaque commune recouverte de streptavidine. Dans une première étape, les Ag biotinilés réagissent avec les Ac du sérum et le complexe Ag-Ac se fixe à la streptavidine adsorbée sur la microplaque par l'intermédiaire de la biotine (l'avidine et la biotine ont une très forte affinité l'une pour l'autre, cf infra). Les étapes suivantes, fixation du conjugué puis du substrat sont identiques à l'ELISA indirect. Cette technique serait quantifiable grâce à une courbe standard unique constituée d'IgG biotinilés. Elle aurait pour avantage une meilleure conservation des Ag sous forme native en évitant les modifications conformationnelles des protéines suite à leur adsorption sur le support solide, et à une plus grande souplesse d'utilisation due à l'utilisation de microplaque commune, quelque soit le dosage.



Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

D. Technique sandwich

Dosage d'Ag par ELISA de type sandwich



Un Ac spécifique d'un Ag est immobilisé sur un support (l'incubation, souvent en tampon alcalin, de l'Ac dans les puits en polystyrène, suffit en général). Dans un premier temps, l'Ag à doser est capté par l'Ac spécifique immobilisé sur le support. Dans un deuxième temps, la quantité d'Ac complexé à l'Ag est mesurée après sa réaction avec un Ac rajouté dans le milieu réactionnel, de même spécificité et couplé à une enzyme (ou Ac conjugué). Pour ce dosage, il est nécessaire que l'Ag possède plusieurs épitopes (identiques répétés ou non identiques) de façon qu'après sa réaction avec l'Ac immobilisé, il puisse encore réagir avec le deuxième Ac spécifique couplé à l'enzyme. L'activité enzymatique responsable d'une réaction colorée quantifiable dans un spectro est proportionnelle à la quantité d'Ag fixé par le premier Ac. La concentration d'Ag est proportionnelle au signal.

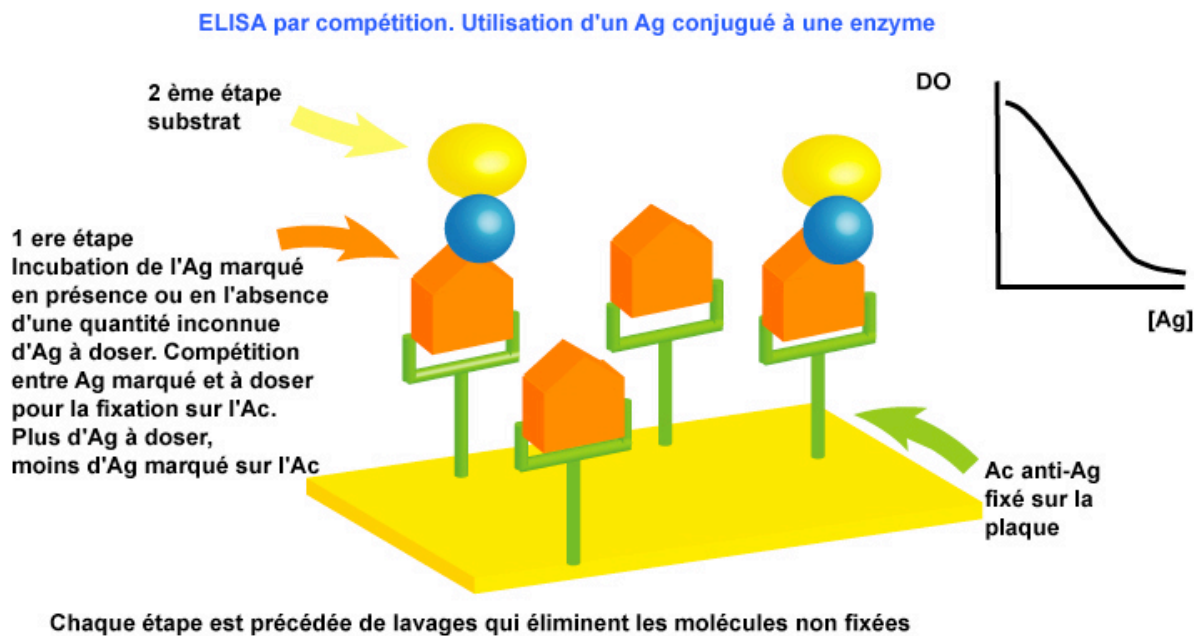
Le dosage de type sandwich est le procédé qui donne les résultats les plus satisfaisants, aussi bien du point de vue de la sensibilité que de la reproductibilité.

La limitation de cette méthode est la nécessité d'avoir **un Ag possédant au moins deux déterminants antigéniques** identiques ou différents. On emploie en général un Ac polyclonal et un Ac monoclonal. Le deuxième Ac est souvent polyclonal. Lorsque l'on emploie deux Ac monoclonaux pour les dosages sandwichs, on fait appel à deux Ac reconnaissant des épitopes différents, l'un pour l'immobilisation sur la phase solide, l'autre pour la préparation du conjugué. Cette nécessité d'avoir au moins deux déterminants antigéniques fait que pour le dosage de petites molécules comme les haptènes, les drogues ou les hormones, on utilise des dosages par compétition.

E. Technique de compétition

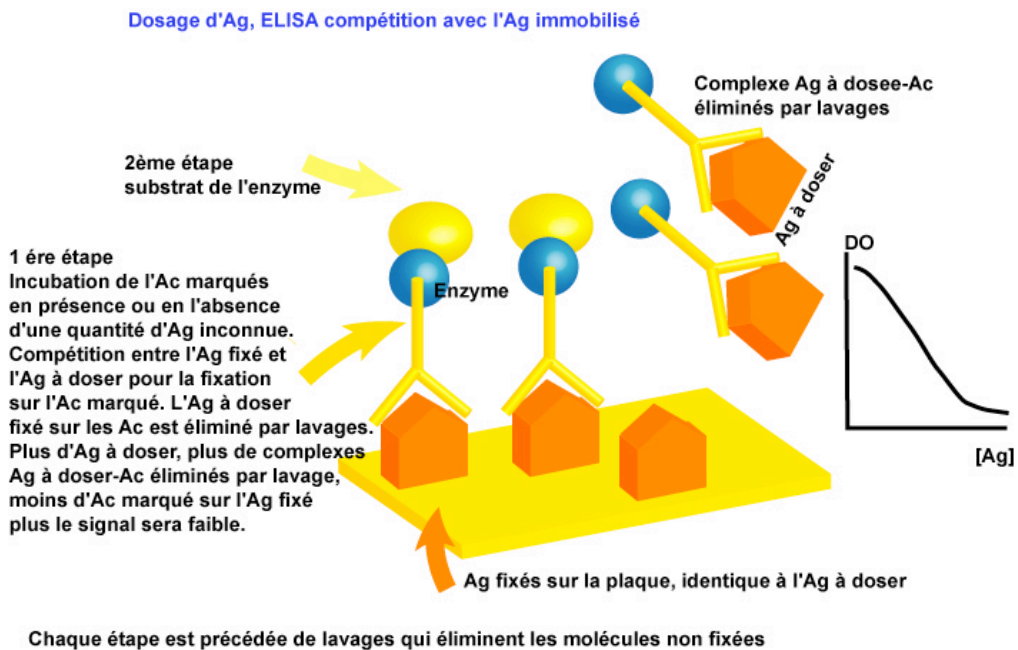
1. Dosages d'Ag par compétition avec un Ag marqué

L'Ag à doser est mélangé avec des quantités déterminées d'Ag marqué à l'enzyme, dans des conditions telles qu'il y ait compétition entre l'Ag à doser et l'Ag marqué pour un nombre limité de sites d'Ac immobilisés sur la phase solide. Quand il n'y a pas d'Ag à doser, l'activité enzymatique est la plus élevée, mais plus la quantité d'Ag est grande, moins d'Ag marqué se combine à l'Ac immobilisé et moins l'activité enzymatique est élevée. **L'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la quantité d'Ag à doser.**

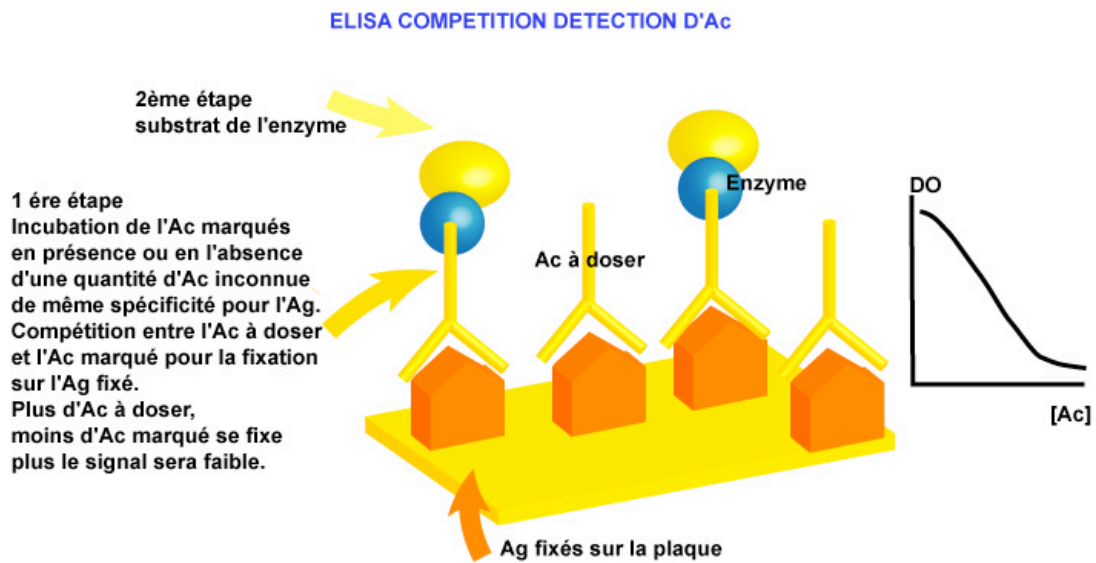


2. Dosages d'Ag par compétition avec l'Ag immobilisé

L'Ag à doser est mélangé en présence d'un Ac marqué et en présence du même antigène immobilisé sur la phase solide. Il y a compétition pour la fixation sur l'Ac marqué entre l'Ag à doser et l'Ag fixé sur la phase solide. Plus la quantité d'Ag à doser est grande, plus la quantité d'Ac marqué capable de se fixer sur l'Ag de la phase solide est petite. L'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la quantité d'Ag à doser.



3. Dosages d'Ac par compétition avec un Ac marqué



Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

L'Ac à doser est mélangé avec des quantités déterminées d'Ac marqué à l'enzyme, dans des conditions telles qu'il y ait compétition entre l'Ac à doser et l'Ac marqué pour un nombre limité de sites d'Ag immobilisés sur la phase solide. Quand il n'y a pas d'Ac à doser, l'activité enzymatique est la plus élevée, mais plus la quantité d'Ac est grande, moins d'Ac marqué se combine à l'Ag immobilisé et moins l'activité enzymatique est élevée. L'activité enzymatique est inversement proportionnelle à la quantité d'Ac à doser.

Cette technique ne permet pas la détermination des classes d'Ac à doser.

F. Matériel

1. La phase solide

Les macromolécules se fixent parfois par liaison covalente mais le plus souvent par adsorption physique passive (par des interactions hydrophobes, électrostatiques entre autre) à la surface de microplaque en plastique, en général du polystyrène. La plupart des protéines diluées (1 à 10mg/mL) dans une solution alcaline sont adsorbées sur le plastique en quelques heures.

Des petits peptides synthétiques de quelques acides aminés peuvent se fixer directement sur la plaque, ou être fixés préalablement à des macromolécules comme l'albumine qui se fixent ensuite dans les puits.

Certains ELISA peuvent être destinés au dosage de molécules à forte teneur en lipide. Les molécules en question peuvent alors être solubilisées dans un solvant organique, et se fixent sur le plastique lors de l'évaporation du solvant.

Il existe plusieurs types de plastiques à capacité d'adsorption différente, par exemple plaques Maxisorb à capacité d'adsorption élevée et uniforme, plaques Immobilon A et B, à capacité d'absorption moindre, mais utiles si l'Ag est de forte affinité dans la première couche. Enfin, un plastique de structure chimique identique ne possède pas toujours la même capacité d'adsorption en fonction des protéines à immobiliser, et de plus, des phénomènes de désorption peuvent parfois se produire avec certaines molécules. En résumé, une même qualité de plastique peut très bien convenir à la fixation d'un Ag et pas d'un autre Ag.

Idéalement, le support doit:

- avoir une haute capacité de fixation
- avoir une dissociation minimale
- entraîner une dénaturation faible des protéines fixées
- permettre une orientation correcte des Ag ou des Ac

La capacité de fixation varie selon les supports et les protéines, et environ 1,5 ng de protéine se fixe par mm².

2. Les lavages

Utilisation d'un détergent doux (Tween) qui empêche l'adsorption des protéines sur les parois du plastique et diminue les réactions Ag-Ac non spécifiques

3. Les enzymes

Elles doivent être stables au cours du test, et avoir une détection sensible et rapide. Les enzymes les plus couramment utilisées sont

- La peroxydase
- La phosphatase alcaline
- La β -galactosidase.
- La glucose 6-phosphate déshydrogénase.

Ces enzymes sont révélées par l'hydrolyse d'un substrat provoquant une réaction colorée (substrat chromogène) dont la densité optique est lu par un spectrophotomètre qui permet des dosages précis. Les enzymes peuvent être conjuguées à l'Ag ou l'Ac par des réactions chimiques ou par le système avidine-biotine. L'agent chimique de couplage de l'enzyme sur l'Ac ne doit pas altérer la capacité de reconnaissance de l'Ac, ni l'activité de l'enzyme (on utilise pour le couplage de la carbodiimide, du glutaraldéhyde...)

Certains substrats peuvent être décelés en plus faible quantité. On peut utiliser par exemple un substrat enzymatique fluorogène comme un dérivé de l'ombelliférone. L'ombelliférone libérée par hydrolyse donne naissance à une fluorescence qui peut être décelée au fluorimètre pour des concentrations 100 fois inférieures à celles qui sont décelées lorsque l'on utilise une réaction colorée dans le spectre visible. On peut aussi utiliser des réactions de chimiluminescence qui mette en jeu la production chimique de lumière dans certaines conditions. La luminescence obtenue peut être mesurée au photomètre ou au fluorimètre. Ce système mesure cependant un éclair de lumière produit par catalyse enzymatique plutôt que l'accumulation d'un dérivé coloré; il faut donc mesurer la réaction très peu de temps après l'addition du substrat.

4. Quelques enzymes et substrats

En fonction du substrat, le produit de la réaction est mesuré par spectrophotométrie, fluorométrie ou chimiluminescence.

Enzyme	Origine	Substrats	Lecture
Peroxydase	Raifort (radis noir)	- OPD (Ortho-phénylènediamine), mutagène - ABTS (2,2', azinodi(3-éthyl) benzothiazolinéi-6-sulfonique acide) - TMB (3,3' 5,5' -tétraméthylbenzidine) - Acide para-hydroxyphényl propionique - Luciférine	} Spectrophotométrie Fluorimétrie Chimieluminescence
Phosphatase alcaline	E. coli Muqueuse du tube digestif du veau	- Para-nitrophénylphosphate - Phosphate de 4-méthylombelliférone	Spectrophotométrie Fluorimétrie
β -galactosidase	E. coli	- Orthonitrophényl- β -D galactopyranoside (ONPG) - 4-méthylombelliféryl- β D-galactoside	Spectrophotométrie Fluorimétrie
Glucose 6-phosphate déshydrogénase	Leuconostroc mesenteroïdes	- Luminol en présence de NAD - Glucose 6-phosphate en présence de NAD	Chimieluninescence Spectrophotométrie

G. Systèmes d'amplification

Il existe des systèmes permettant d'augmenter la sensibilité, c'est à dire de diminuer le seuil de détection des constituants.

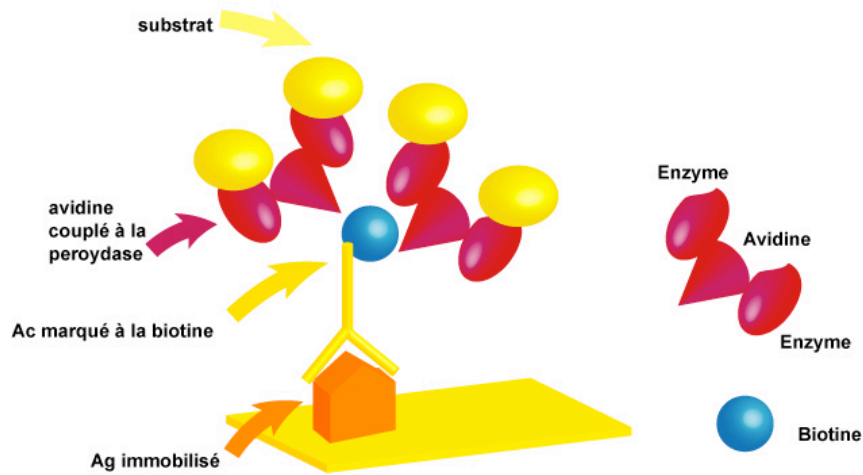
La première méthode consiste à utiliser des substrats donnant **pour une même quantité d'enzyme un signal plus important**, par exemple utiliser des conjugués à la β -galactosidase révélée avec un substrat fluorogénique, ou des conjugués à la peroxydase avec émission d'un flash de lumière révélé par chimieluminescence.

La deuxième approche consiste à amplifier le signal en **augmentant la quantité d'enzyme dans le complexe Ag-Ac-enzyme**. Mais comme il est impossible de préparer des conjugués plus marqués (avec plus de molécules d'enzymes) au risque de dénaturer l'activité des Ac ou des enzymes, il est fait appel à des couplages permettant de véritable échafaudage, comme le système avidine-biotine. Chaque étage de l'échafaudage amplifie le précédent.

- **Utilisation du système avidine-biotine**

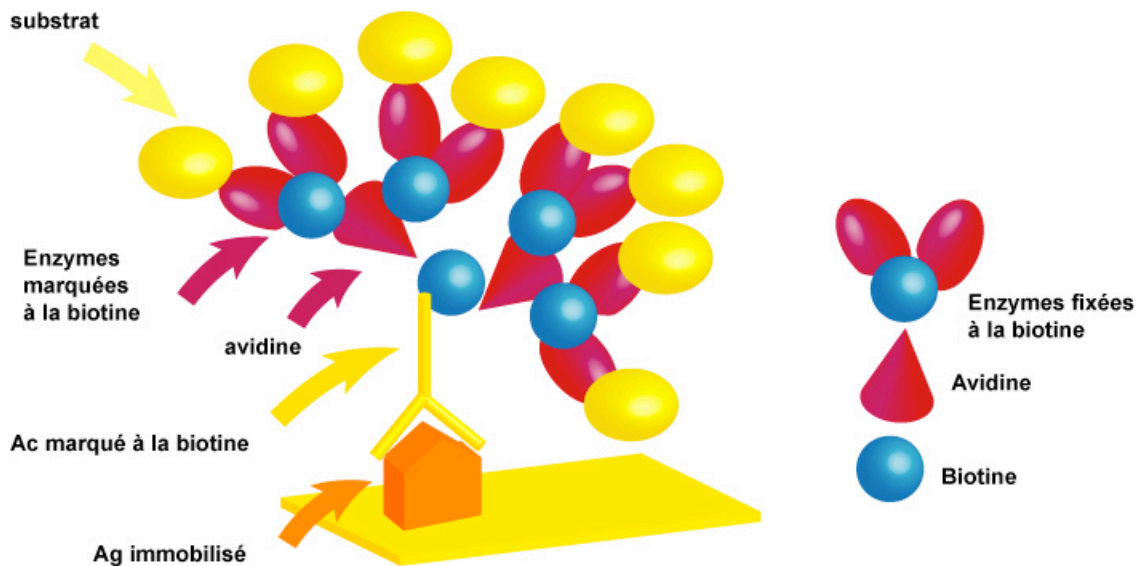
On augmente la quantité d'enzymes-marqueurs dans le complexe Ag-Ac-enzymes. On met à profit la forte affinité entre la biotine et l'avidine. Et une molécule d'avidine peut se lier à quatre molécule de biotine, augmentant considérablement la sensibilité du dosage. La biotine est une vitamine spécialisée dans le transport de groupements monocarbonés sous leur forme la plus oxydée. L'avidine est aussi une vitamine, contenue en particulier dans le blanc d'oeuf, qui se lie sans covalence et avec une grande affinité à la biotine. L'ester activé de la biotine (hydroxysuccinimide) se fixe en milieu alcalin par covalence aux groupements aminés des protéines, sans altération de leurs propriétés

immunologiques. Ces Ac "biotinés" peuvent alors réagir avec leur Ag, et le complexe Ag-Ac "biotiné" est révélé après fixation de molécules d'avidine couplées à plusieurs molécules de peroxydase assurant le marquage enzymatique et l'amplification du signal. L'activité de la peroxydase n'est pratiquement pas modifiée après son couplage par covalence à l'avidine.



Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

Un autre système consiste à utiliser l'avidine comme pont entre l'Ac biotiné et l'enzyme biotinée. Plusieurs molécules d'enzymes marquées à la biotine pourront ainsi se fixer à plusieurs molécules de biotine fixées elles-mêmes sur l'Ac.



Chaque étape est précédée de lavages qui éliminent les molécules non fixées

H. Expression des résultats

1. Dosage des Ag

L'ELISA pour doser des Ag se fait en incorporant dans la même plaque de réaction des quantités connues d'Ag permettant d'établir une courbe étalon ou une valeur seuil. La concentration d'Ag à doser est évaluée de façon précise en reportant les densités optiques (DO) obtenues pour quelques dilutions sur la partie linéaire de la courbe étalon établie dans les mêmes conditions. On obtient des résultats en poids ou en unités internationales ou arbitraires.

2. Dosage des Ac

Dans les ELISA servant à doser les Ac, on obtient une évaluation de l'activité de liaison de l'Ac à l'Ag qui ne peut être traduite qu'approximativement en unité pondérale contrairement au dosage d'Ag. La mesure de l'activité enzymatique est un reflet de la quantité mais aussi de l'affinité des Ac. La liaison de l'Ac à l'Ag dépend en effet de la nature de l'Ac (IgM, IgG,...) et surtout de son affinité, même quand l'Ag est immobilisé. Dans le cas de la recherche de certains Ac pathologiques, il existe des sérums standards de référence permettant d'établir une courbe étalon (obtenu par différentes dilutions du standard) et d'évaluer l'activité Ac des sérums de malades en reportant la DO sur la courbe étalon.

Le résultat peut être **qualitatif** présence ou non de la substance à détecter, et exprimé par rapport à une DO seuil, Le seuil peut être déterminé par un index,

$DO \text{ positif} / DO \text{ négatif} > \dots$

Le résultat peut aussi être exprimé par $DO \text{ sérum à doser} - DO \text{ blanc} > \dots$

ou $DO \text{ sérum à doser} - DO \text{ blanc} / DO \text{ blanc}$

Il faut définir les valeurs différenciant les sérums dits normaux (négatifs) des sérums dits pathologiques (positifs). Pour cela, un très grand nombre de sérums normaux sont testés et la valeur moyenne de la densité optique obtenue plus 2 déviations standard (en général) est prise comme valeur seuil.

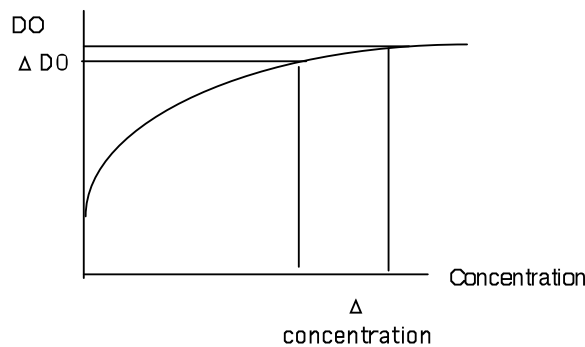
Le résultat peut être **quantitatif**, à partir d'une courbe d'étalonnage établie à partir de dilution d'un sérum étalon, et exprimé en unité internationale La courbe peut aussi être obtenue par dilution de sérums positifs et le résultat rendu en unités arbitraires calculées à partir des dilutions des sérums positifs de références (on transforme les dilutions en

unités). Il faut toujours s'assurer que les résultats sont reproductibles, le même contrôle positif doit toujours donner le même ratio par rapport au seuil.

Attention, en ELISA indirecte ou en ELISA sandwich, plus la DO est importante, plus la quantité de substance à doser est importante. En ELISA compétition, plus la DO est importante, moins il y a de substance à doser.

I. Quelques pièges de l'ELISA

- En ELISA quantitatif, **il ne faut pas mesurer une concentration au niveau du plateau**. La dilution doit être adéquate.



- **Nature et qualité de l'Ag**

De nombreux Ag peuvent être utilisés, **Ag natifs (de préférence)** ou **dénaturés** d'origine humaine ou animale. L'utilisation de **peptides** ou de **protéines recombinantes** donne des tests très spécifiques mais la sensibilité peut être moindre qu'avec la protéine native. L'ELISA met en évidence des **épitopes conformationnels**. Une protéine recombinante peut ne pas subir des modifications post traductionnelles intervenant dans sa structure tri-dimensionnelle. A fortiori pour un peptide synthétique. Par ailleurs, une réaction Ac est polyclonale. Plusieurs types d'Ac contre des épitopes différents sont en général générés lors d'une réaction immunitaire. L'utilisation de peptides synthétiques ou recombinants tronqués ne peut mettre en évidence que les seuls Ac contre l'épitope porté par ces peptides et néglige les autres Ac de la réaction polyclonale.

- **Immobilisation des Ag**

Le choix du support à utiliser pour fixer les Ag est important, car il conditionne non seulement la quantité de protéines pouvant être adsorbées, mais aussi la bonne

orientation de la molécule et sa stabilité. Par exemple, pour détecter les Ac anti- β 2 GPI, on utilise de plaques de polystyrène préalablement irradiées ou des plaques de chlorure de polyvinyle.

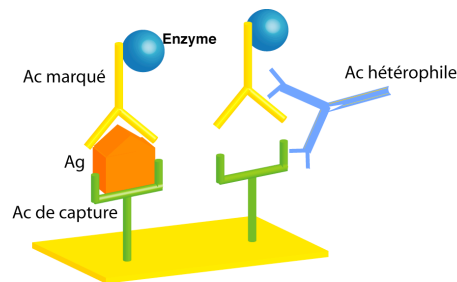
- **Problème de fixations non spécifiques responsables de faux positifs**

Par exemple, fixation non spécifique de protéines plasmatiques sur le support due à une mauvaise saturation des sites libres du support. Certains constituants, agrégats d'IgG, Ig monoclonale peuvent conduire à des résultats faussement positifs.

- **Autres cas de faux positifs**

Des Ac hétérophiles, anti-souris par exemple trouvés dans certains sérums humains, peuvent créer des ponts entre les Ac liants et les Ac marqués (se fixent d'une part sur l'Ac de capture et d'autre part sur l'Ac traceur, simulant ainsi la présence de l'Ag) et fournir des résultats erronées le plus souvent par excès.

Il existe des faux positifs par interférence avec les facteurs rhumatoïdes.



- **Les conditions de prélèvement du sérum peuvent influencer**

Héparine, qui peut perturber la liaison Ag-Ac

EDTA qui peut inhiber la phosphatase alcaline

Azide de sodium, inhibiteur de la peroxidase

Un sérum hémolysé peut perturber la liaison Ag-Ac

L'hyperlipidémie peut aussi être néfaste en perturbant la liaison Ag-Ac.

- **Des problèmes purement techniques sont aussi à l'origine de résultats faux**

Dilutions erronées, mauvaises conservations des standards et des réactifs, utilisation de récipients qui adsorbent les protéines (ne pas utiliser des dilutions faites la veille dans des tubes), fluctuation de la température, impuretés optiques dans les plaques,...

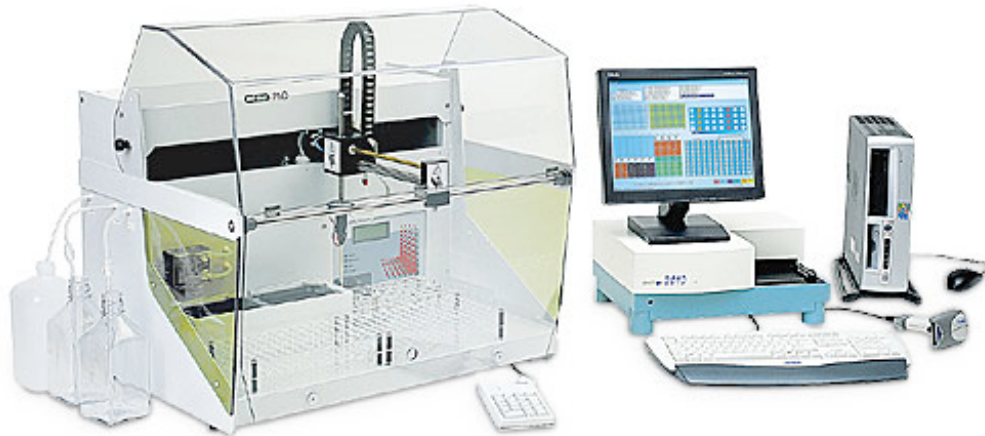
J. Applications de l'ELISA

- Ag
 - Recherche d'Ag bactériens, viraux, parasitaires, fongiques
 - Dosages hormones
 - Dosage médicaments
 - ...
- Ac
 - Autoimmunité
 - Sérologie bactériennes, virales, parasitaires
 - IgE spécifiques

III. EVOLUTIONS

A. Automatisation

L'automatisation des analyses s'impose de plus en plus. De nombreux appareils sont disponibles pour automatiser les techniques ELISA, modules séparés (diluteurs/distributeurs, laveurs, lecteurs) ou chaînes complètes ELISA allant de la distribution à la lecture.



Des technologies automatisées analysant simultanément un grand nombre de molécules différentes dans un même échantillon se développent : la technologie luminex® et les puces à protéines.

B. La technologie Luminex®

Dans les années 90, la firme Luminex® Corp a développé une technologie originale dérivée de la cytométrie en flux, et permettant d'analyser un grand nombre de molécules différentes dans un même échantillon. Actuellement, plusieurs appareils sont proposés pour la recherche d'autoAc : BioPlex™ de Bio-rad, Fidis™ de BMD, QuantaPlex™ d'Inova Athena Multi-lyte™ de Zeus.

1. Technologie

Trois éléments principaux dans ce système : un support solide de microbilles, des marqueurs fluorescents, un fluorimètre de flux.

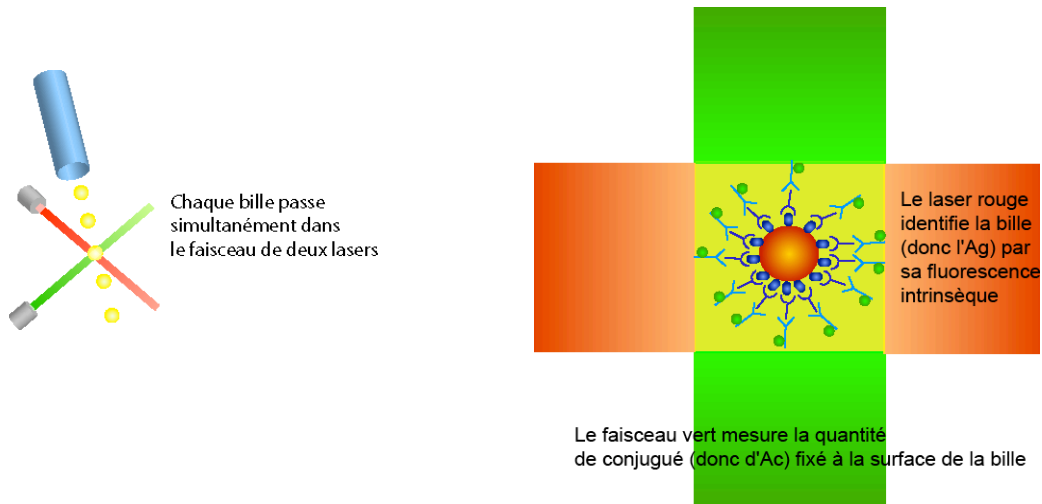
- **Le support analytique et les marqueurs fluorescents**

Il s'agit de microbilles en polystyrènes sur lesquelles sont greffées de façon covalente différents types de molécules, Ag, Ac, acides nucléiques, autres récepteurs et ligands. Deux marqueurs fluorescents, rouge et orange, sont incorporés dans les billes. La combinaison de 10 niveaux de concentration d'un fluorochrome orange et d'un fluorochrome rouge en quantités différentes permet en théorie d'obtenir 100 types de billes de niveau de fluorescence différents chacune. Chaque type de bille est recouverte d'un Ag particulier dont on recherche par exemple l'existence dans le sérum d'autoAc correspondant.

- **Les billes de spécificités diverses** sont incubées dans le même puits avec l'échantillon de sérum puis avec le conjugué

- **Le système de mesure**

C'est un fluorimètre en flux, et non pas un cytomètre, puisque cet appareil n'analyse pas de cellule. Chaque bille passe simultanément dans les faisceaux de 2 lasers. Le premier laser (rouge) excite les colorants internes à la bille, rouges et oranges, qui permet d'identifier la bille et donc l'Ag recouvrant la bille par sa fluorescence intrinsèque. On analyse par le deuxième laser (vert) existant le fluorochrome du conjugué qui s'est fixé à la surface de la bille au cours de la réaction, reflet de la quantité d'Ac fixé sur l'Ag à la surface de la bille.



2. Intérêts et limites

- **Possibilité de réaliser plusieurs analyses simultanément** avec un même sérum (Un même sérum incubé avec un mélange dans un même puits de 100 billes portant des Ag différents).
- **Automatisation poussée**
- **Application à une multitude de système** ligands-récepteurs (développés actuellement : autoAg, hormones, typage HLA dosage de cytokines, génotypage)
- **Mais, la matrice liquide dans laquelle se déroule la réaction est critique**, contenant des couples récepteurs-ligands très différents. Les conditions de capture de l'Ac peuvent être hétérogène d'un Ag à l'autre. Le fluorimètre doit par ailleurs différencier des billes qui ne diffèrent que par un niveau de concentration de l'un des deux fluorochromes internes. Cette technologie ne permet pas de détecter séparément des Ac d'isotypes différents dans le même mélange réactionnel, par exemple des IgA et IgG anti-gliadine. Cependant, des fluorimètres à trois lasers sont en développement. Enfin, la réalisation systématique de grands panels d'analyses peut être source de difficultés en terme de remboursement.

C. Les puces à protéines

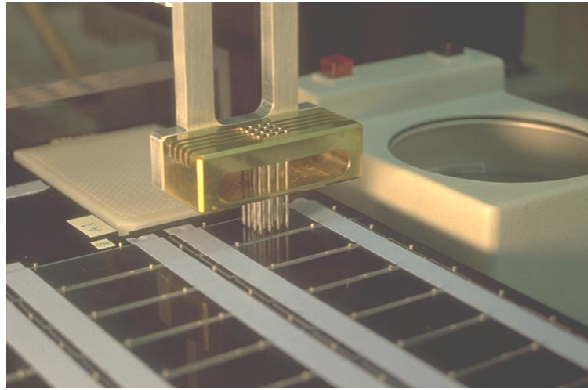
La technologie des biopuces (microarrays ou micro-réseaux) dérivée des puces à ADN ou à ARN s'est élargie à l'étude des protéines, pour l'étude des interactions protéines-protéines: enzymes-substrat, médicaments, Ag-Ac. L'étude des auto-Ac par la technique des biopuces fait partie des méthodes de caractérisation en "multiplex" des autoAc Les premiers travaux pour l'analyse des autoAc remontent à 2002.

1. Méthodologie

- **Préparation des biopuces**

Des Ag prédilués sont transférés par un robot dans des microplaques de plusieurs centaines de puits. Un robot micropipetteur est ensuite utilisé pour déposer dans un ordre précis les Ag sur un film très fin de nitrocellulose fixé sur une lame de microscope. Des

centaines de protéines peuvent ainsi être attachées à la surface de la lame qui peut être conservée à 4°C, et jusqu'à 5 000 dépôts en double sur la même surface.

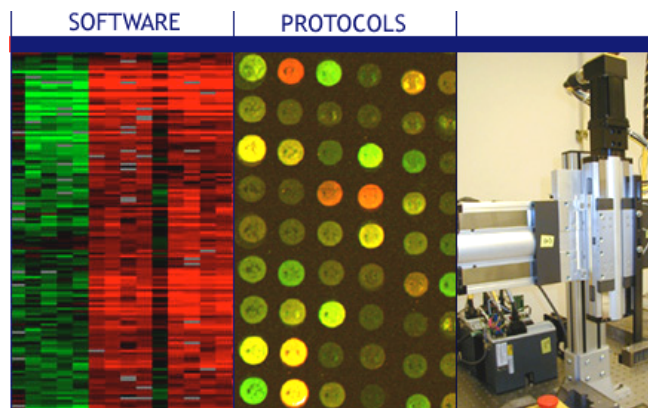


- **Marquage des puces**

Les lames sont incubées avec les sérums à étudier. Après lavages, elles sont incubées avec un conjugué fluorescent.

- **Lecture**

Les lames ainsi marquées par un fluorochrome sont analysées par un scanner numérique basée sur la fluorescence et un logiciel approprié



2. Avantages et inconvénients

a) Avantages

- Large profil d'Ac pour un seul sérum à tester
- Très faible quantité d'Ag et de sérums (2µl de sérums permettant de détecter >100 Ag)
- La technique serait 4 à 8 fois plus sensible que l'ELISA

- Pourrait différencier les isotypes voir les sous classes d'Ac par utilisation de scanners permettant d'examiner simultanément plusieurs couleurs de fluorescence.
- Faible quantité d'Ag

b) Limites et inconvénients

- Les autoAg ont des structures moléculaires différentes et n'ont pas toutes les mêmes propriétés de fixation sur un même support.
- Des conditions d'incubations (tampons, etc..) compatibles avec tous les types d'Ag doivent être trouvées
- Rendu des résultats en "profils d'Ac" dont la validation et l'interprétation ne seront peut-être pas aisées.

Que ce soit la technique Luminex® ou les biopuces à protéines, la place que prendront ces technologies dans le domaine de la biologie clinique et en particulier de la sérologie auto-immune dépend de leurs coûts, de la nature et de la qualité des Ag utilisés, ainsi que des profils d'Ac qui seront proposés. Leurs fiabilités et performances doivent être évaluées.