

Immunologie pour le praticien

Deux techniques phares pour la détection des anticorps circulants : Western Blot et ELISA



O. DEREURE
Service de Dermatologie,
Université de MONTPELLIER.

La recherche d'anticorps circulants fait partie des examens complémentaires les plus utilisés en dermatologie dans des indications très variées, notamment dans les maladies infectieuses et auto-immunes. Deux techniques sont notamment très utilisées : le Western blot et l'ELISA.

Western blot

Le nom de cette technique, encore appelée immunotransfert, ne fait pas référence comme on pourrait le penser au point cardinal mais à un jeu de mots. En effet, elle a été mise au point par analogie avec la technique dite du Southern blot qui, elle, s'intéresse à la détection par une sonde moléculaire de la présence de fragment(s) d'ADN grâce à une hybridation spécifique sonde/fragment cible recherché, technique mise au point par E. Southern il y a plus de 40 ans et qui a contribué au développement exponentiel des techniques de biologie moléculaire.

Une technique très similaire s'est ensuite intéressée à la détection des ARN messagers dans les mêmes conditions et a été nommée Northern blot par jeu de mots. Finalement, la même méthode a été appliquée à la recherche de certaines protéines particulières ou d'anticorps circulants dirigés contre des protéines spécifiques et a reçu tout naturellement le nom de Western blot ou WB (à noter que le dernier point cardinal, l'Est, n'a pas été utilisé, ce qui n'était pas surprenant dans le contexte de guerre froide de l'époque...).

1. Principe

Cette technique est basée sur deux éléments principaux :

- d'une part, la séparation selon leur taille de protéines préalablement dénaturées et saturées électriquement par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide ;
- d'autre part, le lien spécifique entre une protéine et l'anticorps dirigé contre cette protéine.

Les protéines d'un échantillon biologique (sang, tissu ou encore agent infectieux) sont extraites, soumises donc à migration sur le gel de polyacrylamide puis transférées depuis le gel sur une membrane (typiquement en nitrocellulose) mise en contact avec le gel (d'où l'autre nom de la technique, l'immunotransfert), où elles sont alors exposées à un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt ou à l'inverse à du sérum qui contient peut-être un ou plusieurs anticorps dirigé(s) contre une ou plusieurs des protéines présentes dans

l'échantillon biologique initial (**fig. 1**). Ce transfert est indispensable car la réaction antigène protéique/anticorps ne peut se produire dans le gel, qui s'oppose à la pénétration des anticorps, trop volumineux, et donc au contact entre protéine et anticorps.

Il donne également son nom anglophone à la technique (*blot* signifie "buvardage" par assimilation de la membrane à une sorte de buvard qui "absorbe" les protéines présentes dans le gel de migration). La membrane est ensuite soumise à un ou plusieurs lavage(s) qui emportent les anticorps non fixés et ne permettent que la persistance des complexes protéines/anticorps spécifiques plus "solides". La présence de ces complexes est ensuite révélée par une dernière réaction, en général colorimétrique, qui utilise souvent un complexe anticorps secondaire anti-anticorps primaire (donc essentiellement un anticorps anti-Ig humaines dans le cas de la recherche d'anticorps circulants)/enzyme/substrat colorimétrique. Dans ce cas, la présence du complexe protéine/anticorps apparaît finalement comme une petite bande colorée à l'endroit même où se trouvait la protéine cible initiale sur la bande, dans une position qui ne dépend finalement que de la taille (et donc du poids moléculaire) de cette protéine (**fig. 2**).

2. Applications

Les applications de cette méthode relativement simple (pour qui sait la maîtriser...) sont multiples et ont permis des progrès majeurs dans la compréhension

■ Immunologie pour le praticien

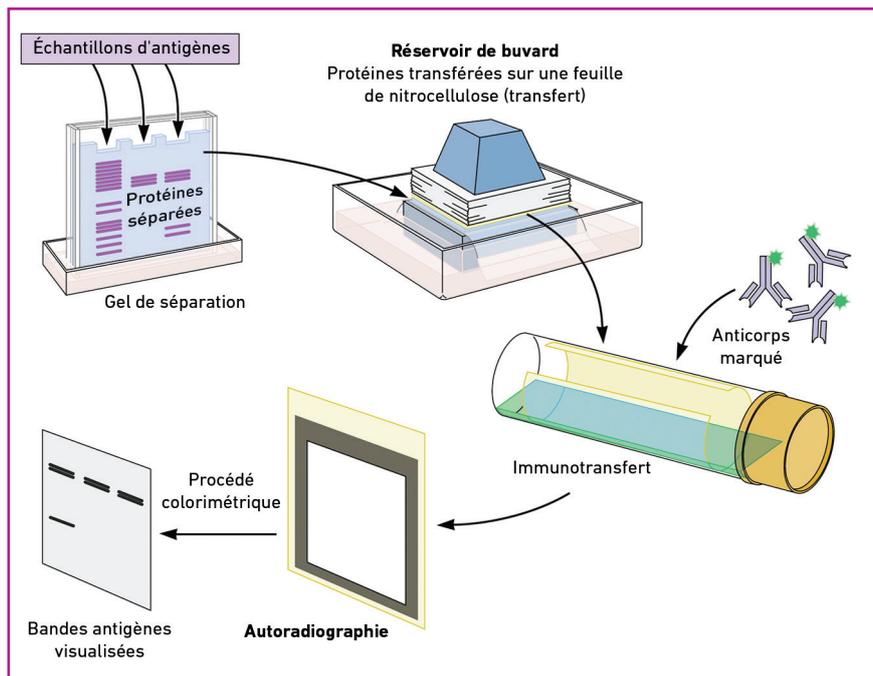


Fig. 1 : Principe du Western blot : séparation sur gel de polyacrylamide suivie de transfert sur membrane de cellulose, incubation avec le sérum à tester et révélation colorimétrique des complexes antigènes protéiques/ anticorps présents sur la membrane.

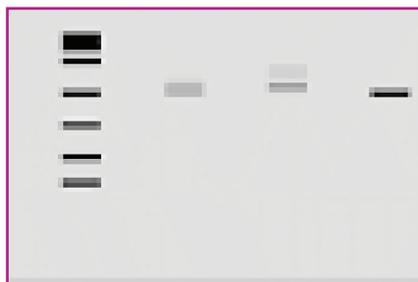


Fig. 2 : Résultat du Western blot : apparition de bandes colorées sur la membrane de cellulose, témoin de la présence dans le sérum à tester d'un anticorps dirigé contre une des protéines ayant migré. Sur le côté, échelle de poids moléculaire indiquant le poids (et donc la taille) de la protéine cible de l'anticorps repéré.

de certaines affections, notamment auto-immunes, mais également dans le diagnostic quotidien.

Deux types d'informations peuvent schématiquement être recueillis :

>>> Soit détecter la présence d'une protéine dans un tissu, évaluer sa taille par rapport à ce qui est attendu (ou détermination initiale de sa taille

s'il s'agit d'identifier une protéine non connue mais qui est la cible d'anticorps circulants identifiés en amont), sa concentration (par l'intensité de la bande colorée), les variations de cette concentration, etc. Cela peut être complémentaire avec d'autres techniques utilisant également des anticorps pour détecter les mêmes protéines mais cette fois au sein des cellules ou des tissus, après fixation (immunocytochimie et immunohistochimie) ; les applications sont surtout en recherche fondamentale ou translationnelle, par exemple déterminer de façon précise la taille des cibles des auto-anticorps des maladies auto-immunes (notamment bulleuses) ou des anticorps anti-agents infectieux, ou encore permettre l'étude des protéines cibles concernées dans diverses circonstances (par exemple, recherche d'isoformes et de leurs taux respectifs).

>>> Soit détecter la présence d'un anticorps circulant contre une cible protéique connue notamment par sa taille

et donc ses caractéristiques de migration et le tissu où elle est normalement présente (par exemple le derme ou l'épiderme), et qui fait partie des protéines mises à migrer dans le gel (par exemple, protéines extraites du derme, de l'épiderme ou des deux pour les maladies bulleuses auto-immunes, ou d'agents infectieux tels que le VIH, des bactéries comme *Borrelia*, etc). L'intérêt est alors souvent plutôt diagnostique ou de classification avec en particulier des taux de spécificité et de sensibilité souvent bien supérieurs à ceux d'une sérologie "basique" de première ligne pour les maladies infectieuses. Toutefois, la quantification du taux des anticorps circulants est difficile par cette méthode qui répond plutôt en absence/présence d'anticorps circulants.

■ ELISA

La technique ELISA pour *Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay* utilise également la détection de complexes spécifiques protéines cibles/anticorps anti-protéine pour détecter la présence d'anticorps circulants dirigés contre une protéine précise, là aussi dans les maladies auto-immunes et infectieuses essentiellement. Contrairement au WB qui ne nécessite pas forcément une connaissance très précise de la protéine cible de l'anticorps à rechercher (mais simplement de sa présence dans l'échantillon qui migre dans le gel initial), l'ELISA requiert une bonne connaissance et une purification de cette dernière, voire même un isolement de l'épitope cible surtout s'il y a des épitopes différents sur une même protéine selon l'affection sous-jacente (exemple des épitopes de la pemphigoïde bulleuse et de la pemphigoïde des muqueuses, qui sont situées sur deux zones différentes de la molécule BP180 ou collagène XVII).

Par ailleurs, l'ELISA permet une titration des anticorps circulants, ce que ne permet pas (ou très approximativement) le Western blot et donc un suivi des taux

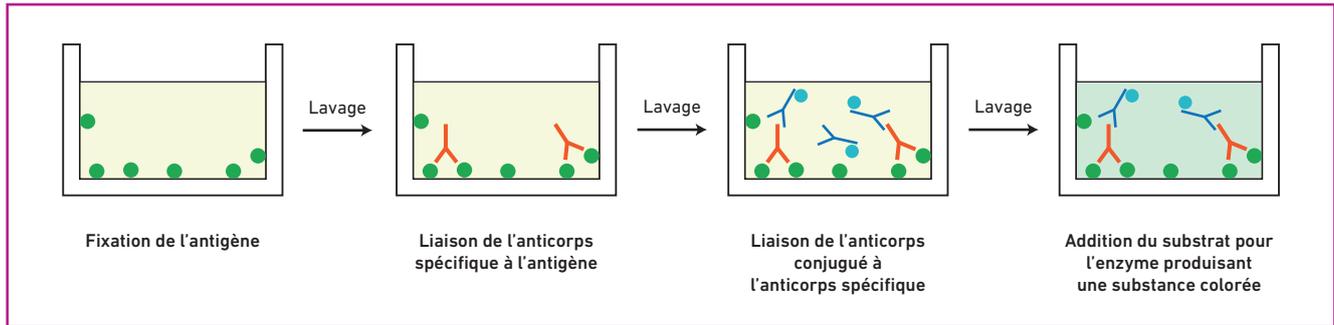


Fig. 3 : Principe de l'ELISA détectant la présence dans le sérum à tester de l'anticorps dirigé contre la protéine fixée sur les parois du puits ; titration possible de l'anticorps selon l'intensité de la réaction colorimétrique.

dans le temps, ce qui peut se révéler utile pour le monitoring de l'affection sous-jacente.

1. Principe

Plusieurs techniques sont regroupées sous ce terme mais dans la plus fréquente la protéine cible (ou l'épitope spécifique) est tout d'abord purifié(e) puis fixé(e) sur les parois d'un petit "puits" au sein d'une plaque (souvent 96 puits par plaque). Le sérum à tester est déposé dans le puits, ce qui permet la fixation sur les parois des anticorps spécifiques de la protéine grâce à la formation de complexes protéines/anticorps spécifiques (**fig. 3**). Les puits sont lavés, ce qui emporte les anticorps non fixés ou de façon non spécifique et, comme pour le Western blot, une dernière étape de révélation utilise

un complexe anticorps secondaire anti-anticorps primaire/enzyme/substrat colorimétrique. L'intensité de la coloration générée par cette dernière réaction est proportionnelle à la concentration des anticorps présents dans le milieu à tester et le résultat est rendu sous la forme d'un résultat en nombre d'unités/L calqué sur cette intensité.

2. Applications

Les applications sont à peu près les mêmes que pour le Western blot en termes de détection des auto-anticorps ou d'anticorps anti-agents infectieux circulants mais avec en plus une dimension quantitative qui permet un suivi des taux dans le temps. L'ELISA permet par ailleurs de distinguer différentes maladies auto-immunes partageant la

même protéine cible mais pas le même épitope. Les deux techniques sont en fait plutôt complémentaires avec souvent une sensibilité et une spécificité différentes en fonction de la question posée. Il est donc très fréquent de les associer, notamment au diagnostic, le suivi évolutif étant plutôt assuré par l'ELISA sauf quand le diagnostic initial est remis en cause, ce qui peut nécessiter de réitérer le Western blot. Il est alors souhaitable d'établir une sérothèque préthérapeutique afin de ne pas être gêné par un très faible taux d'anticorps circulants résiduels après le traitement, qui rend le Western blot très aléatoire.

L'auteur a déclaré ne pas avoir de conflits d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.