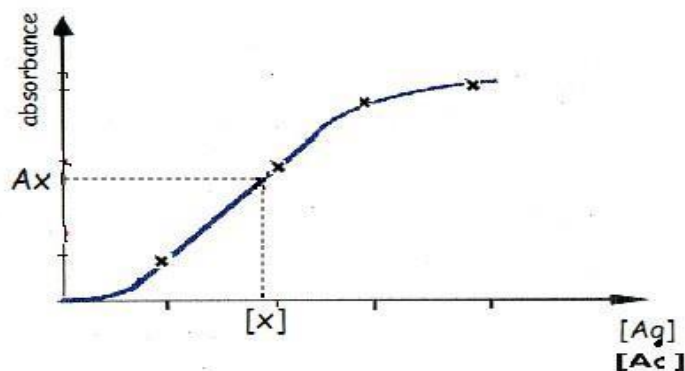


TD 04 : Techniques d'immunomarquage : ELISA et RIA

I- Immuno-dosage avec marqueur enzymatique : Le test E.L.I.S.A.

I-1 Définition et principe

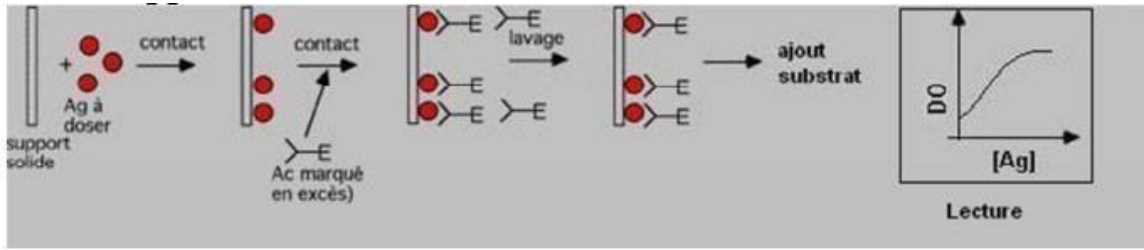
ELISA est l'abréviation anglaise pour Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Ce terme regroupe les tests utilisant un marqueur enzymatique lié de façon covalente à un anticorps ou à un antigène. A partir d'un substrat chromogène, incolore, spécifique de l'enzyme couplée, celle-ci est capable de catalyser une réaction générant un produit coloré détectable par spectroscopie visible. La densité optique (DO) obtenue est proportionnelle à la quantité de substrat ayant réagi. Par référence à une courbe étalon obtenue avec des concentrations d'Ag ou d'AC connue, il est possible de déterminer la concentration dans le liquide biologique.



I-2 Différentes méthodes d'ELISA

I-2-1 ELISA direct

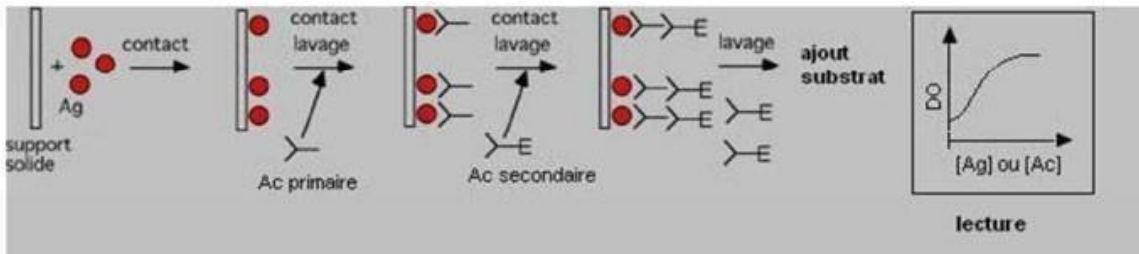
- Dans un premier temps, l'antigène à doser est déposé sur un support solide (généralement une plaque de microtitration).
- L'antigène est reconnu par un anticorps marqué par une enzyme.
- Les anticorps en excès, non liés à l'antigène, sont éliminés lors de l'étape de rinçage (Figure 1).
- L'ajout du substrat permet la réaction colorée dont la DO mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur le support solide.



(Figure 1).

I-2-2 *ELISA indirect*

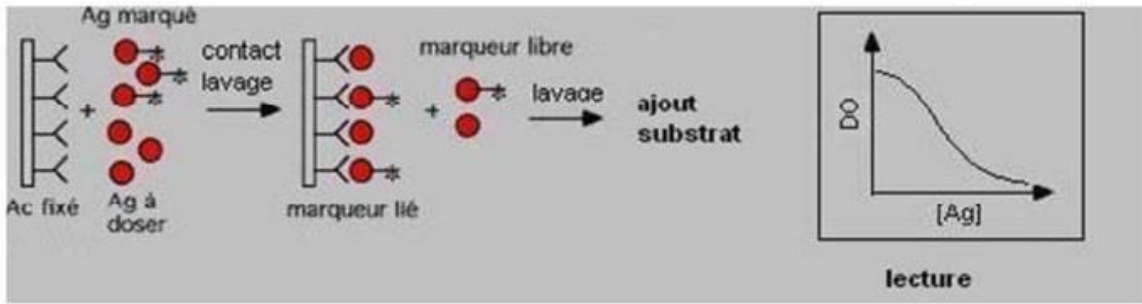
- L'antigène à doser est déposé sur le support solide. Un anticorps, dit primaire, se lie à l'antigène.
- L'excès d'anticorps est éliminé par rinçage.
- un anticorps spécifique de l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire (Ac Anti-Ac marqué par une enzyme), est ajouté au milieu.
- L'ajout du substrat permet la réaction colorée et la DO mesurée va être proportionnelle à la quantité d'anticorps primaires immobilisés sur le support et donc à la quantité d'antigène à doser (Figure 2).
- Cette technique peut aussi être utilisée pour le dosage d'anticorps spécifiques présents dans un sérum.



(Figure 2).

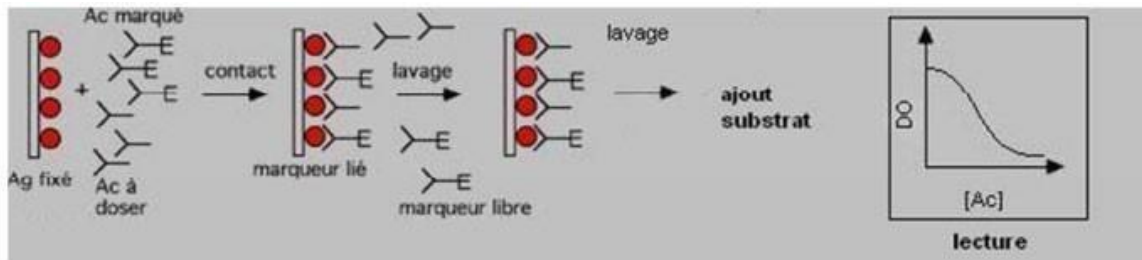
I-2-3 *ELISA compétitif*

Les anticorps sont fixés sur le support solide. L'antigène à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'antigène marqué. Plus la quantité d'antigène à doser sera forte, plus l'activité enzymatique sera faible et la DO mesurée sera faible. Elle sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'antigène à doser (Figure 3).



(Figure 3).

Le test ELISA permet aussi de mesurer une concentration inconnue d'anticorps (Figure 4). Pour cela, l'antigène est immobilisé sur le support. L'anticorps à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'anticorps marqués. L'anticorps marqué se fixera d'autant plus que l'anticorps à doser sera présent en petite quantité. La DO mesurée sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps à doser.



(Figure 4).

I-2-4 ELISA en Sandwich

Cette technique fortement spécifique, consiste à isoler une protéine que l'on cherche à doser entre deux anticorps dirigés contre elle mais reconnaissant des épitopes différents.

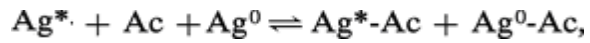
Concrètement, le premier anticorps est fixé sur un support, suivi d'une incubation de la protéine à doser. Enfin, le deuxième anticorps vient reconnaître le complexe protéine/premier anticorps, on dit alors que la protéine est prise en sandwich entre les deux anticorps, d'où le nom de cette méthode.

Une coloration de plus en plus forte indique une concentration d'antigènes croissante.

II- RIA (RadioImmuno Assay)

Le dosage radioimmunologique (RIA, pour RadioImmunoAssay) est une des techniques les plus sensibles pour la détection d'un anticorps ou d'un antigène (de très faibles concentrations) ($0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$).

Le principe de la technique radio-immunologique repose sur la compétition entre un antigène non marqué Ag_0 (que l'on veut doser) et un antigène marqué Ag^* (choisi identique) pour les anticorps spécifiques Ac :



où Ag^* et Ac sont apportés en quantité constante. Ag^* se fixe à l'anticorps en fonction de la quantité de Ag^0 .

Le dosage s'effectue en rapportant les valeurs trouvées (coups/minute) sur une courbe standard établie préalablement à partir de dilutions connues du produit à doser.

Il en résulte que, lorsque Ag^0 est présent en grande quantité, la concentration du complexe Ag^0-Ac augmente, tandis qu'une quantité moindre de Ag^* se fixe à l'anticorps.

