

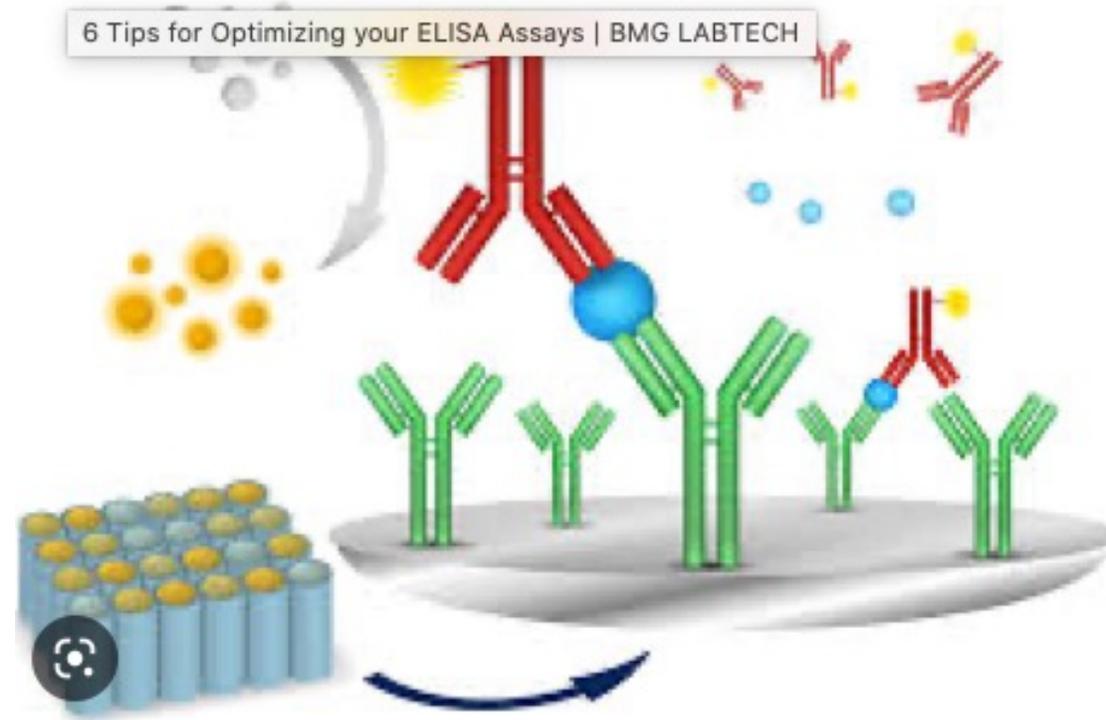
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira
Béjaïa



وزارة التعليم العالي
و البحث العلمي
جامعة عبد الرحمن ميرة
بجاية

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie



L3 BPC -TAM : Chapitre III.2 : ELISA

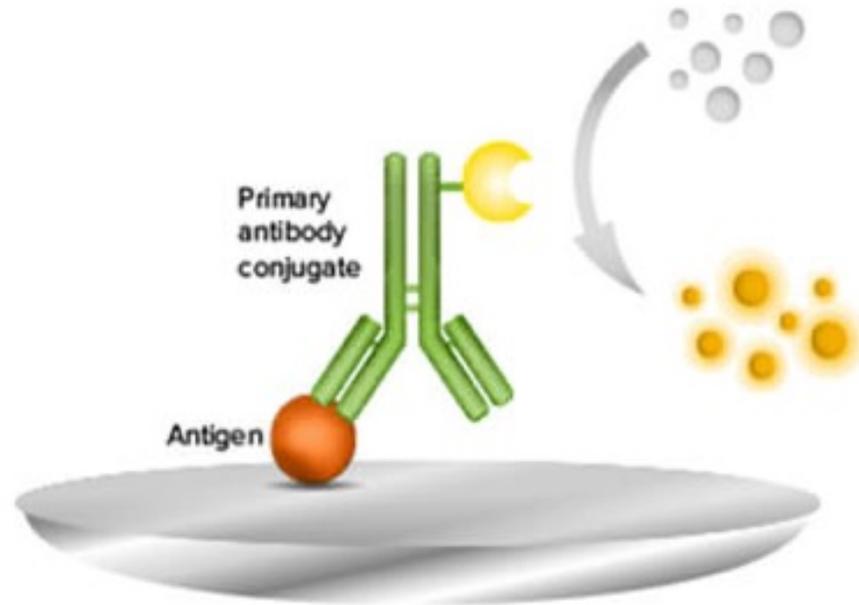
Introduction

L'utilisation du test immuno-enzymatique (ELISA de l'anglais enzyme-linked immunosorbent assay) pour la détection de protéines (antigènes ou anticorps) est l'un des outils les plus facilement disponibles dans le monde. Ce test est couramment utilisé pour la surveillance et le suivi des maladies, ainsi que comme outil de diagnostic. Il est essentiel de comprendre comment il fonctionne, ce qu'il détecte et ses avantages ou inconvénients lors de l'interprétation des résultats.

Les tests ELISA sont conçus pour la détection d'antigènes ou d'anticorps pour des bactéries ou des virus. Les antigènes sont des protéines étrangères à l'organisme qui stimulent la production d'anticorps (antigène signifie générateur d'anticorps en anglais - antigen generator). Lorsque l'on pense aux anticorps, il faut garder à l'esprit qu'ils sont toujours dirigés contre des protéines. Lors de la conception du test, le fabricant, ou le laboratoire, décide de la ou des protéines spécifiques qui seront ciblées. Si le test ELISA cible directement une protéine de la bactérie ou du virus, il s'agit d'un test ELISA antigène, tandis que si la cible est la réponse en anticorps de l'animal à la bactérie ou au virus, il s'agit d'un test ELISA anticorps. Bien qu'il existe des tests ELISA conçus pour cibler une ou deux protéines seulement (anticorps ou antigènes), de nombreux tests ELISA ciblent un grand nombre de protéines. Les tests peuvent également être conçus pour détecter un type spécifique de réponse anticorps (IgG, IgM ou IgA) ou une combinaison de ceux-ci. Chacun de ces types d'anticorps a des fonctions spécifiques qui dépassent le cadre de cet article.

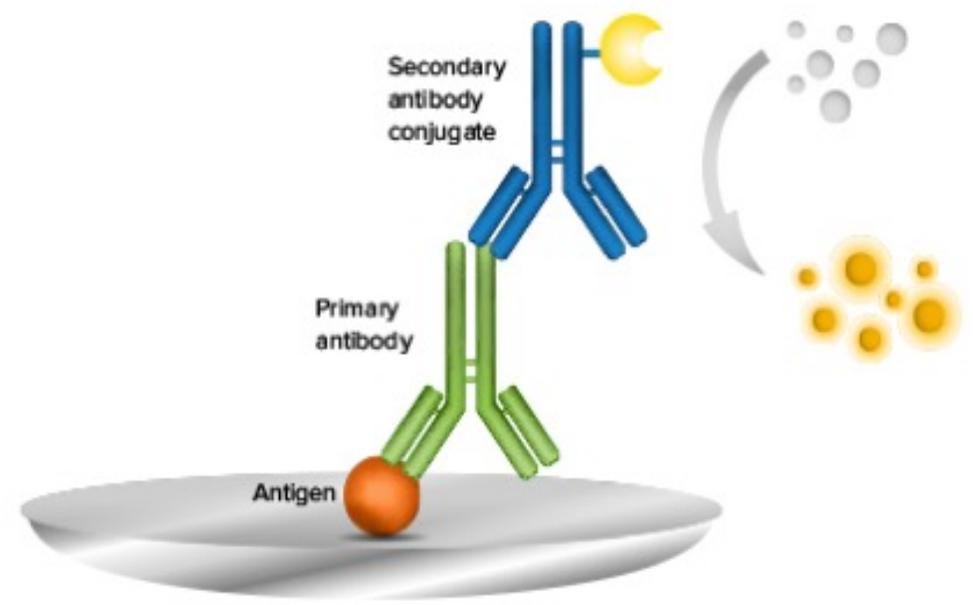
Le concept et le processus de détection des anticorps ou des antigènes par ELISA sont exactement les mêmes. Cela commence par l'obtention de la protéine cible (antigène ou anticorps). Pour les protéines individuelles, un processus distinct est nécessaire pour obtenir une concentration purifiée de cette protéine particulière. Identifier la ou les protéines à cibler est un processus complexe et scientifique. Idéalement, le test cible une seule protéine qui est unique à l'agent pathogène d'intérêt (ne réagit pas de manière croisée avec d'autres agents pathogènes), hautement immunogène (pour la détection d'anticorps) ou présente en fortes concentrations (pour la détection d'antigènes) ; il cible une protéine dont on sait qu'elle est fortement corrélée à la protection contre la maladie et qui sera toujours présente. Malheureusement, la plupart de ces critères sont inconnus et on utilise soit une seule protéine, qui peut être produite et facilement trouvée dans l'échantillon, soit un mélange de plusieurs protéines (virus ou bactéries entières). Bien que l'utilisation de virus ou de bactéries entières puisse être facile, ils sont plus susceptibles de réagir de manière croisée avec d'autres agents pathogènes.

Dosage ELISA direct



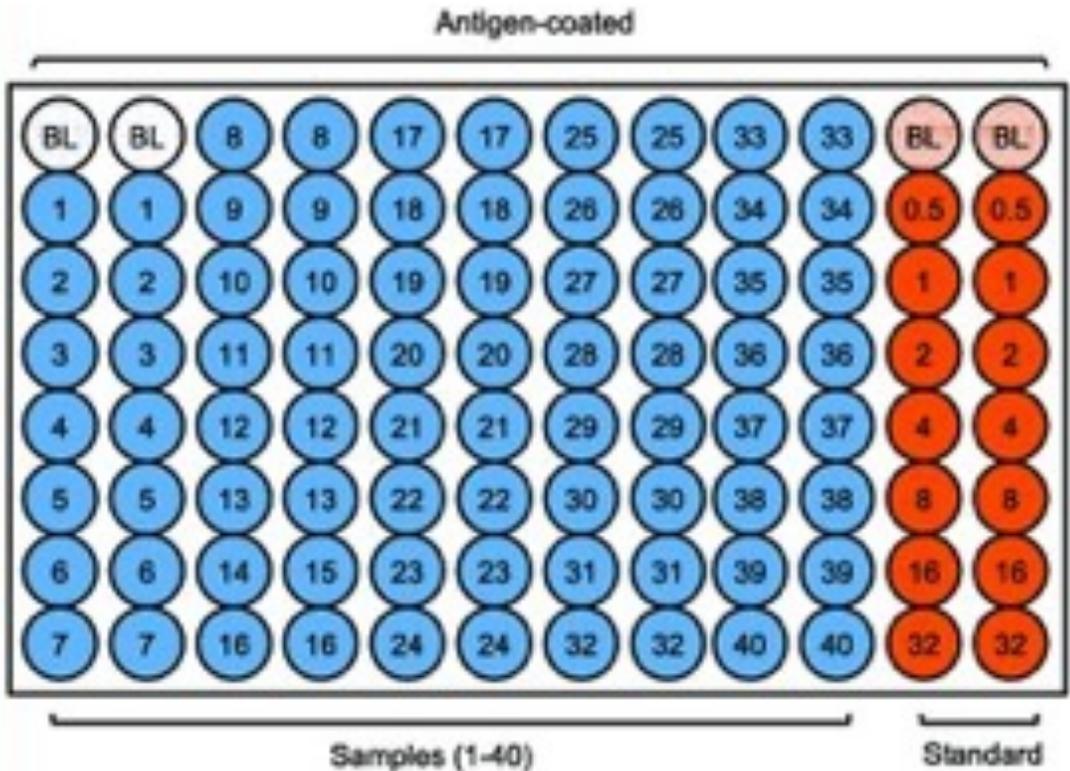
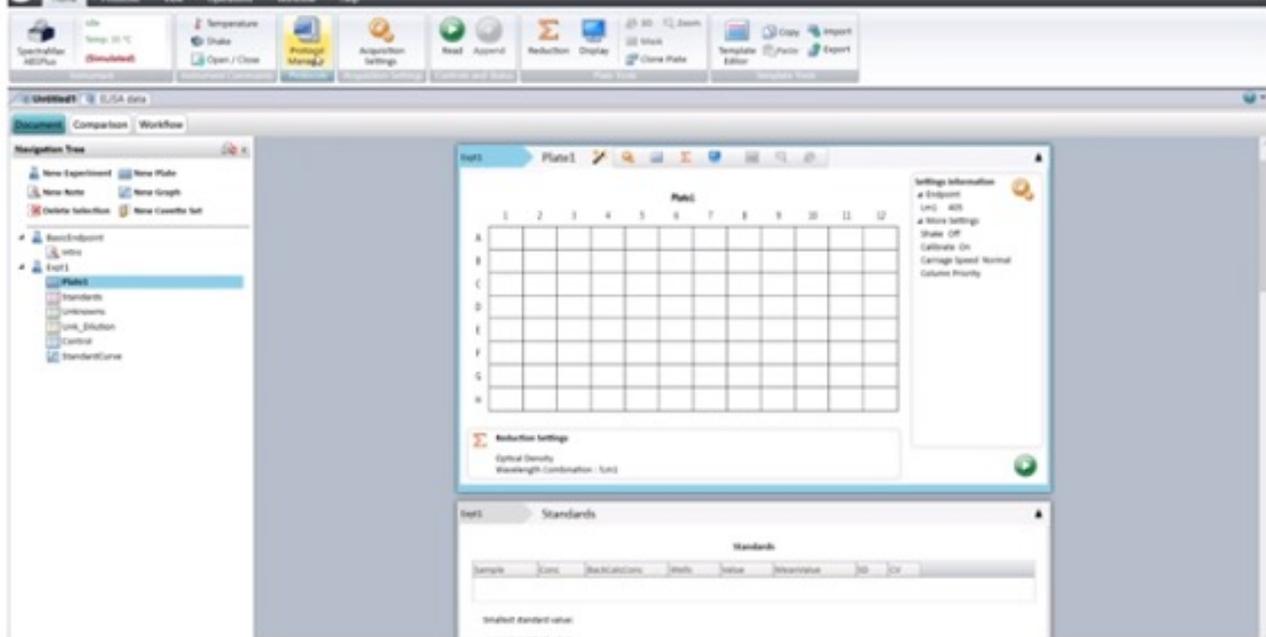
Dans un dosage ELISA direct, l'antigène est lié au fond du puits de la microplaque, puis il est lié par un anticorps qui lui est spécifique et également conjugué à une enzyme ou à une autre molécule qui permet la détection.

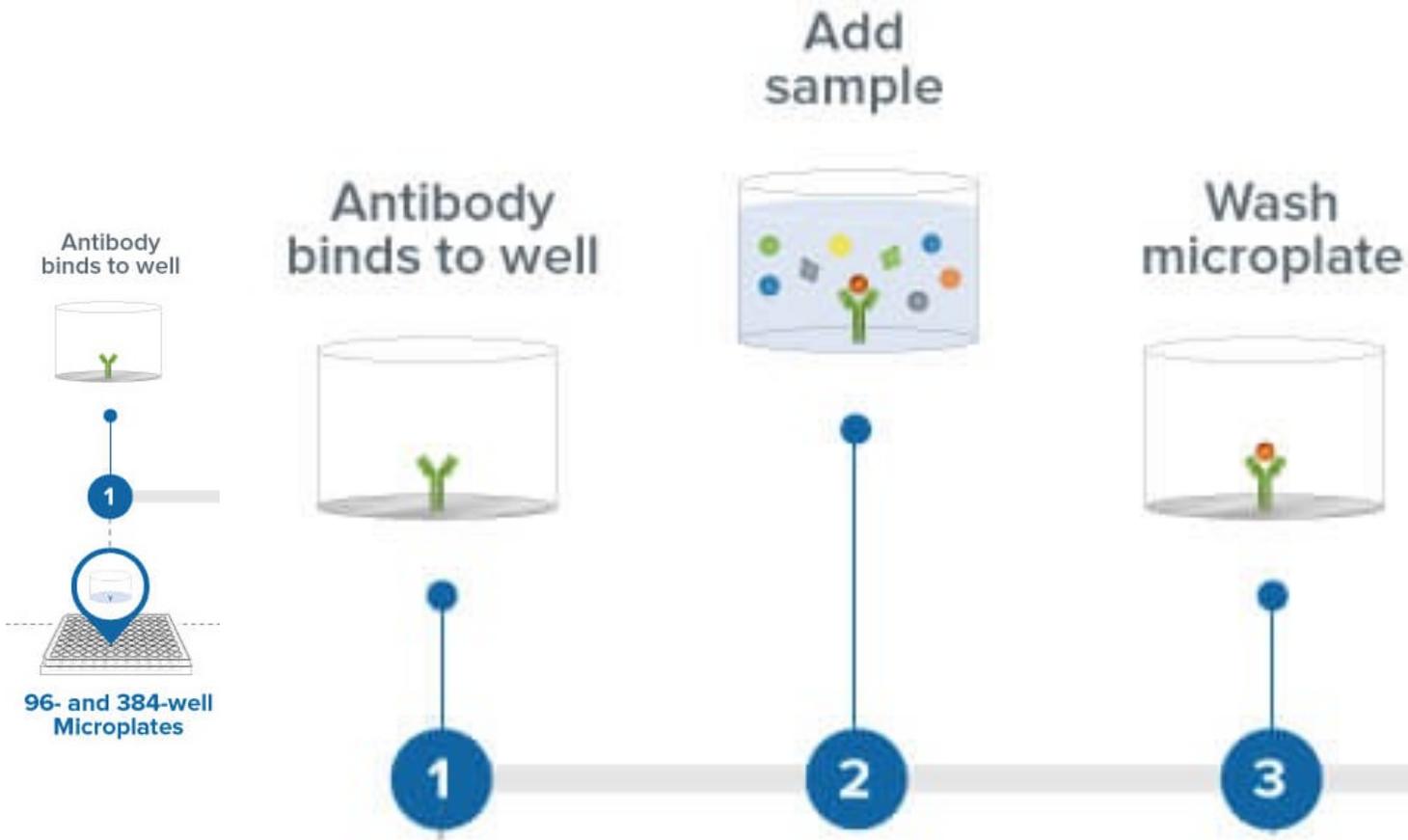
ELISA indirect



Dans un test ELISA indirect, l'antigène est lié au fond du puits de la microplaque, puis un anticorps spécifique à l'antigène est ajouté. Un anticorps secondaire, conjugué à une enzyme ou à une autre molécule de détection est ensuite lié au premier anticorps.

Configurer un protocole en point final ELISA

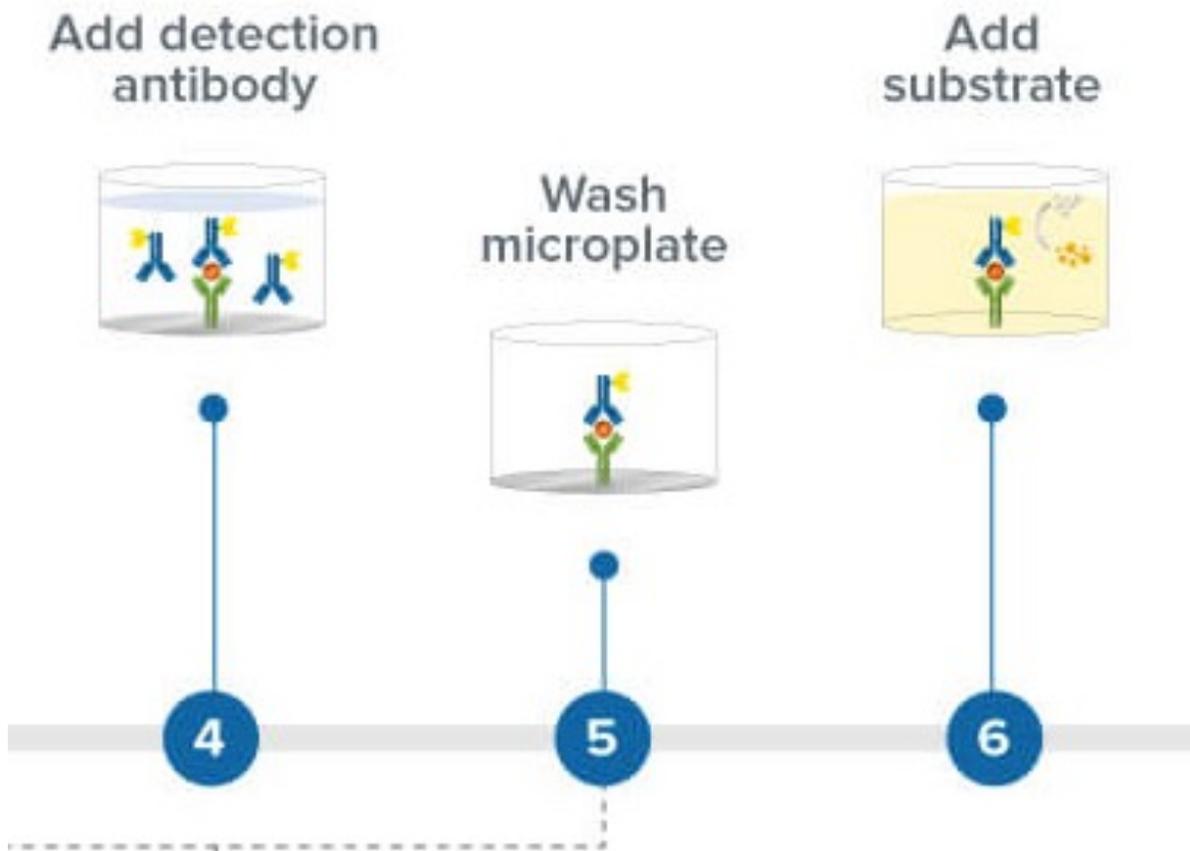




Étape 1 : Capturer l'anticorps fixé aux puits de la plaque ELISA.

Étape 2: Ajouter l'échantillon dans le puits : l'antigène présent dans l'échantillon se fixe à l'anticorps de capture.

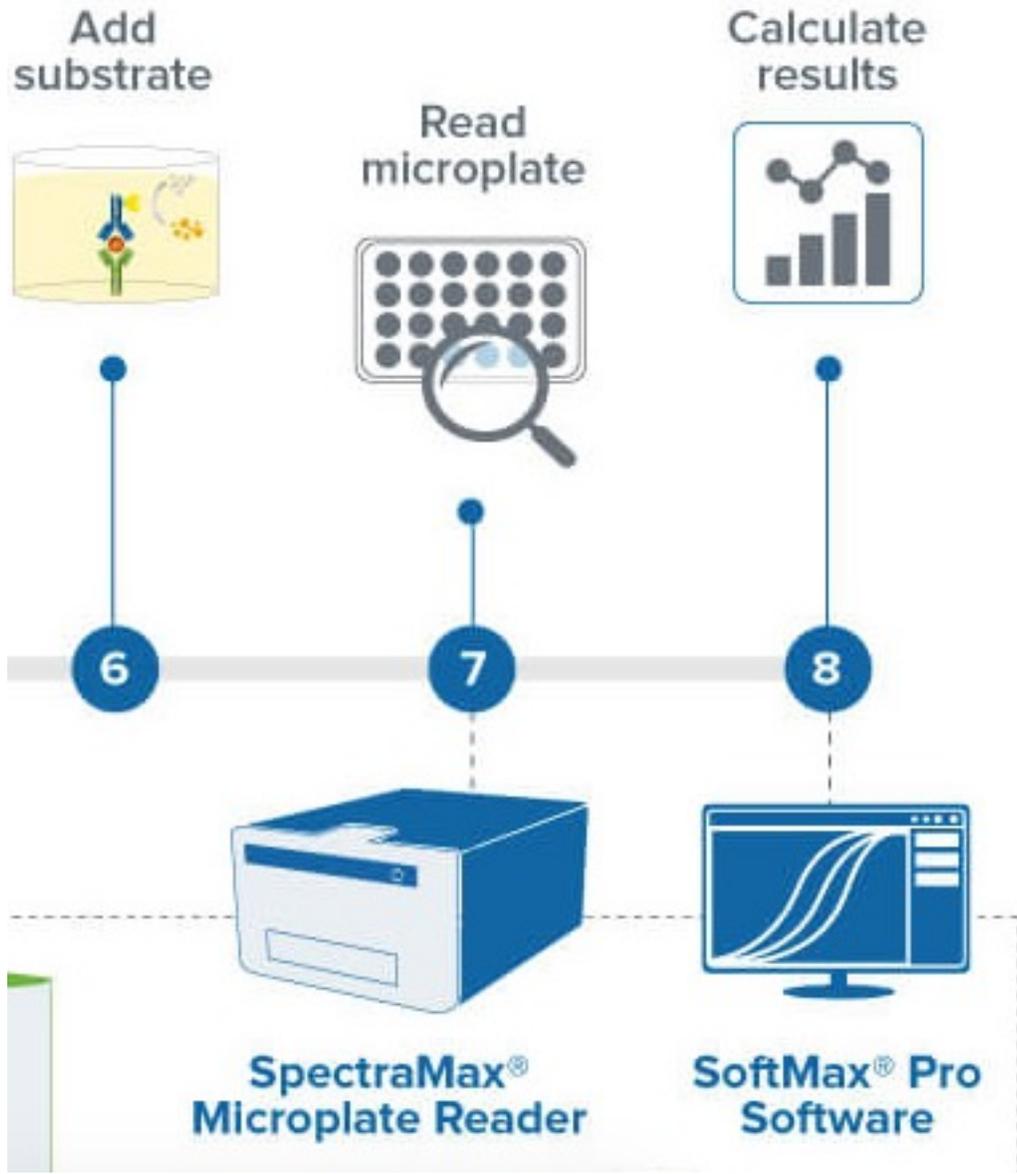
Étape 3: Laver la microplaque : le matériau non lié est éliminé, ne laissant que l'antigène d'intérêt.



Étape 4: Ajouter l'anticorps de détection : l'anticorps de détection conjugué à une enzyme se lie à un second site sur l'antigène d'intérêt.

Étape 5: Laver la microplaque : les anticorps non liés sont éliminés, ne laissant que les anticorps spécifiques à la cible d'intérêt.

Étape 6: Ajouter le substrat : le substrat est converti par l'enzyme sur l'anticorps de détection, entraînant un changement de couleur.



Étape 6: Ajouter le substrat : le substrat est converti par l'enzyme sur l'anticorps de détection, entraînant un changement de couleur.

Étape 7: Lire la plaque : le lecteur de microplaques détecte la réaction colorée et indique les valeurs de densité optique (DO).

Étape 8: Calculer les résultats : la quantité d'antigène est calculée et analysée dans chaque échantillon.

Test *ELISA* direct ou indirect ?

1- *ELISA* direct

Direct



1 L'échantillon est ajouté dans les puits.



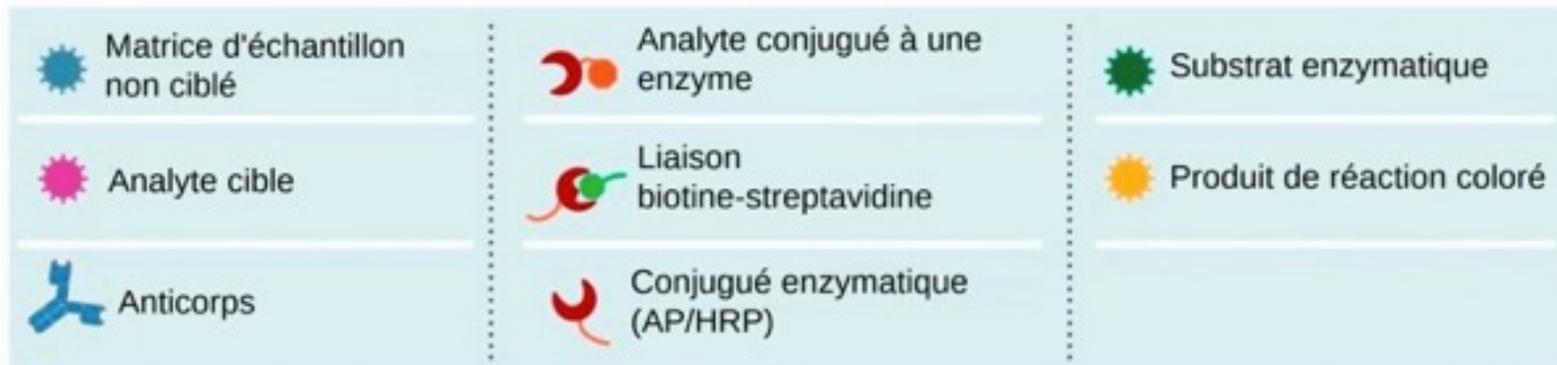
2 Union des protéines au plastique



3 L'anticorps de détection conjugué se lie à l'analyte immobilisé.



4 La réaction colorée enzymatique est proportionnelle aux anticorps liés.



2- ELISA indirect (Sandwich)

Sandwich



1 Les puits sont préalablement recouverts avec l'anticorps de capture



2 L'échantillon est ajouté et l'analyte se lie à l'anticorps de capture.



3 L'anticorps de détection conjugué se fixe à l'analyte immobilisé..



4 La détection indirecte et la réaction enzymatique sont proportionnelles à l'analyte.

| | | |
|---|---|--|
|  Matrice d'échantillon non ciblé |  Analyte conjugué à une enzyme |  Substrat enzymatique |
|  Analyte cible |  Liaison biotine-streptavidine |  Produit de réaction coloré |
|  Anticorps |  Conjugué enzymatique (AP/HRP) | |

Paramétrer un test ELISA et réaliser une analyse de base

The screenshot displays the iQ3 software interface. The main window shows a data table for 'Plate1' with 8 rows (A-H) and 12 columns (1-12). The table contains numerical values representing absorbance readings. To the left is a 'Navigation Tree' with options like 'New Experiment', 'New Plate', 'New Note', 'New Graph', 'Delete Selection', and 'New Counter Set'. Below the tree is a 'Reduction Settings' panel with 'Optical Density', 'Plate Blank Used', and 'Wavelength Combination' options. To the right is a 'Settings Information' panel with 'Endpoint' (Absorbance), 'Lm1' (450), 'Lm2' (540), and 'More Settings' (Shake Off, Calibrate On, Carriage Speed Normal, Column Priority). A 'Read Information' panel at the bottom right shows 'Printed Data: 31/03/2020 04:09' and a 'Go to PC settings to activate W' button.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| A | 2.263 -0.025 | 2.260 -0.025 | 2.261 -0.015 | 2.278 -0.015 | 2.280 -0.008 | 2.098 -0.007 | 2.072 0.008 | 2.094 -0.007 | 2.328 -0.006 | 0.153 -0.004 | 0.072 -0.004 | -0.001 -0.012 |
| B | 2.972 -0.011 | 2.958 -0.024 | 2.906 -0.004 | 2.794 -0.007 | 2.279 -0.005 | 1.796 -0.005 | 1.107 0.003 | 0.410 -0.005 | 0.332 -0.009 | 0.164 -0.008 | 0.077 -0.002 | -0.000 -0.004 |
| C | 2.964 -0.029 | 2.964 -0.012 | 2.820 -0.002 | 2.790 -0.006 | 2.324 -0.005 | 1.717 0.005 | 1.118 -0.005 | 0.475 -0.007 | 0.312 -0.008 | 0.179 -0.007 | 0.088 0.005 | 0.002 0.005 |
| D | 2.966 -0.005 | 2.958 -0.007 | 2.906 0.000 | 2.794 -0.002 | 2.279 0.011 | 1.796 -0.005 | 1.107 -0.006 | 0.410 0.005 | 0.332 -0.008 | 0.164 -0.005 | 0.077 0.004 | -0.000 0.012 |
| E | 2.967 -0.005 | 2.975 -0.000 | 2.908 -0.001 | 2.753 -0.003 | 2.324 -0.009 | 1.772 -0.005 | 1.115 -0.014 | 0.455 -0.017 | 0.366 -0.006 | 0.185 0.005 | 0.086 -0.004 | 0.001 0.000 |
| F | 2.963 -0.002 | 2.958 -0.002 | 2.898 -0.002 | 2.794 -0.002 | 2.279 -0.002 | 1.796 -0.004 | 1.107 -0.015 | 0.410 -0.015 | 0.332 -0.005 | 0.164 0.005 | 0.077 -0.006 | -0.000 0.012 |
| G | 2.973 -0.009 | 2.975 -0.007 | 2.909 -0.006 | 2.754 -0.007 | 2.324 -0.010 | 1.772 -0.009 | 1.115 -0.009 | 0.455 -0.007 | 0.366 -0.005 | 0.185 -0.007 | 0.086 -0.007 | 0.001 0.018 |
| H | 2.969 -0.006 | 2.959 -0.006 | 2.926 -0.004 | 2.794 -0.000 | 2.279 -0.006 | 1.796 -0.008 | 1.107 -0.008 | 0.410 -0.010 | 0.332 -0.004 | 0.164 -0.007 | 0.077 0.001 | -0.000 -0.004 |

Il existe de légères variations dans ce processus selon qu'il s'agit d'un test *ELISA direct, indirect ou sandwich* ; chaque type a ses avantages et ses inconvénients mais, au final, tous donnent les mêmes résultats : *plus l'absorbance, ou le changement de couleur, est élevée, plus la concentration attendue de l'antigène ou de l'anticorps cible dans l'échantillon testé est importante.*

Le test ELISA peut être présenté sous différents formats en fonction des différences d'immobilisation des antigènes et de marquage des anticorps. Dans le test ELISA direct, les antigènes du virus liés à une phase solide en plastique sont détectés par l'ajout d'un anticorps conjugué. Dans le test ELISA sandwich, l'anticorps de capture se lie à la phase solide en plastique. Les antigènes de l'échantillon se lient à l'anticorps de capture et sont ensuite détectés par un second anticorps marqué par une enzyme. Dans le test ELISA compétition, l'antigène viral de l'échantillon est pré-incubé avec l'anticorps primaire, puis ajouté à un puits recouvert d'un anticorps secondaire avec un antigène conjugué à une enzyme qui entre en compétition avec l'antigène de l'échantillon pour se lier à l'anticorps primaire. Plus l'antigène viral est présent dans l'échantillon, moins l'antigène conjugué se fixera et plus le signal sera faible. Source : Adapté de Ghaffari et al. 2020.

