

Chapitre 9 : ELISA

1. Définition

L'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) est une technique utilisée pour évaluer la quantification des niveaux de peptides, de protéines, d'anticorps, d'antigène, d'hormones, ou une autre biomolécule dans un échantillon biologique. Elle est généralement réalisée dans des plaques à 96 puits (figure 1), ce qui permet de mesurer plusieurs échantillons en une seule expérience. Dans la technique ELISA, l'antigène sera immobilisé sur une surface solide, puis lié à des anticorps pour former un complexe de liaison antigène-anticorps, où le complexe antigène-anticorps est lié à l'enzyme. Le signal de détection sous la forme d'un changement de couleur sera formé en raison de la réaction entre l'enzyme et le substrat (figure 2).

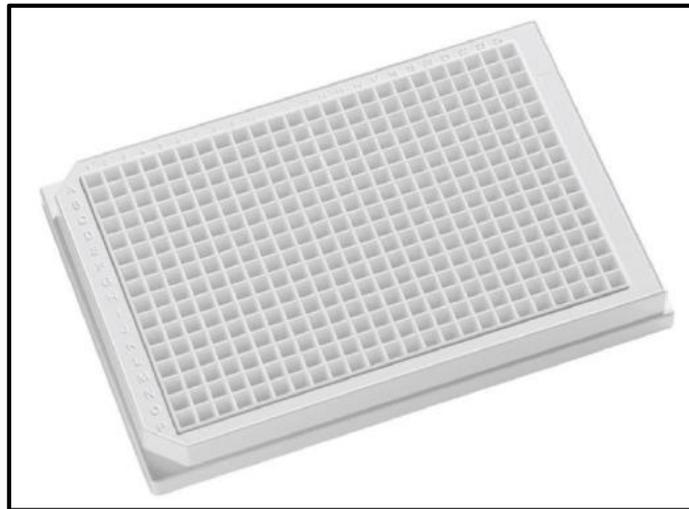


Figure 1 : Plaque ELISA.

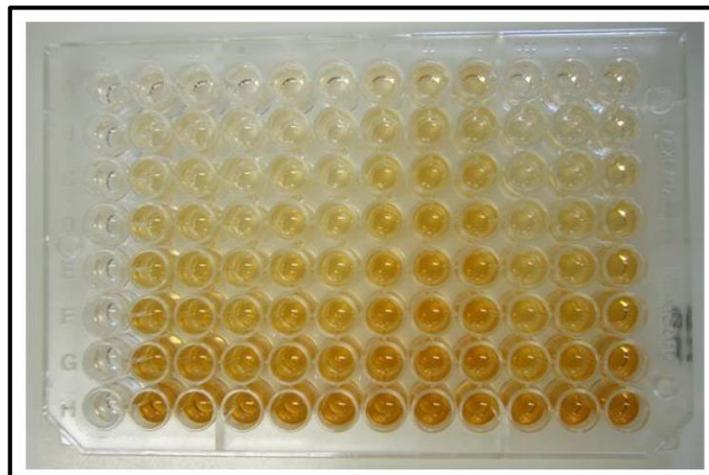


Figure 2 : Changements d'intensité de couleur sur la plaque ELISA.

2. Principe de l'ELISA

Il s'agit d'un type d'immunodosage sensible qui utilise une enzyme liée à un anticorps ou à un antigène comme marqueur pour la détection d'une protéine spécifique, en particulier un

antigène ou un anticorps. Il fonctionne en couplant l'anticorps ou l'antigène à l'enzyme d'analyse. Le test combine la spécificité de l'anticorps et la sensibilité des enzymes d'analyse pour détecter principalement les antigènes par l'intermédiaire d'anticorps d'analyse ou les anticorps par l'intermédiaire d'antigènes d'analyse. Il implique la détection d'un « analyte » dans un échantillon liquide à l'aide d'un réactif liquide ou de bandelettes sèches. Dans l'analyse sèche, la bandelette peut être lue par réflectométrie. La lecture quantitative repose généralement sur la détection de l'intensité de la lumière transmise par spectrophotométrie à une longueur d'onde spécifique. La sensibilité de détection dépend de l'amplification du signal pendant la réaction analytique, qui peut être améliorée en recouvrant la plaque d'anticorps à haute affinité. Il existe deux principales variantes de la méthode ELISA, qui sont :

- Une variante de l'ELISA qui peut être utilisée pour détecter la présence d'antigènes reconnus par un anticorps.
- Une autre variante de l'ELISA qui peut être utilisée pour tester les anticorps qui reconnaissent un antigène.

Deux types d'anticorps peuvent être utilisés dans un test ELISA : monoclonal et polyclonal. Si le corps étranger envahissant est une grosse molécule, comme une protéine ou un micro-organisme, il peut y avoir de nombreux sites antigéniques différents et des anticorps polyclonaux sont produits lors de la réponse immunitaire de l'hôte. Les anticorps monoclonaux sont produits à l'aide de techniques de culture tissulaire, obtenus à partir d'un seul site antigénique, à partir d'un seul globule blanc.

3. Types d'ELISA

Selon l'objectif de l'ELISA, il existe deux types de tests : ELISA qualitatif : ce type de méthode ELISA vise à connaître la qualité du test et le résultat est représenté par des résultats positifs ou négatifs.

ELISA quantitatif : ce type de méthode ELISA vise à mesurer la quantité d'antigènes ou d'anticorps dans l'échantillon. Le résultat est basé sur la densité optique ou les unités fluorescentes de l'échantillon interpolées dans une courbe standard, qui est généralement une dilution en série de la cible.

Selon les méthodes, l'ELISA peut être divisé en quatre types : ELISA direct, ELISA indirect, ELISA sandwich et ELISA compétitif ou ELISPOT.

3.1. ELISA direct

L'ELISA direct est adaptée à la détection d'antigènes protéiques et peut nécessiter une pré-purification de l'échantillon. Cette technique permet de recouvrir directement les puits d'une plaque de microtitration d'antigènes, puis d'ajouter un anticorps primaire marqué par une

enzyme qui détecte l'antigène complémentaire. Cette technique est beaucoup plus rapide que d'autres techniques ELISA en raison du nombre limité d'étapes suivies et ne requiert pas d'anticorps secondaire à réaction croisée. Mais cette technique présente quelques inconvénients en ce qui concerne sa spécificité. La spécificité de l'immobilisation de l'antigène étant faible, il se produit un bruit de fond plus élevé que dans d'autres techniques ELISA. Cela est dû à l'interaction non spécifique des protéines de l'échantillon avec la protéine cible dans une plaque de microtitration.

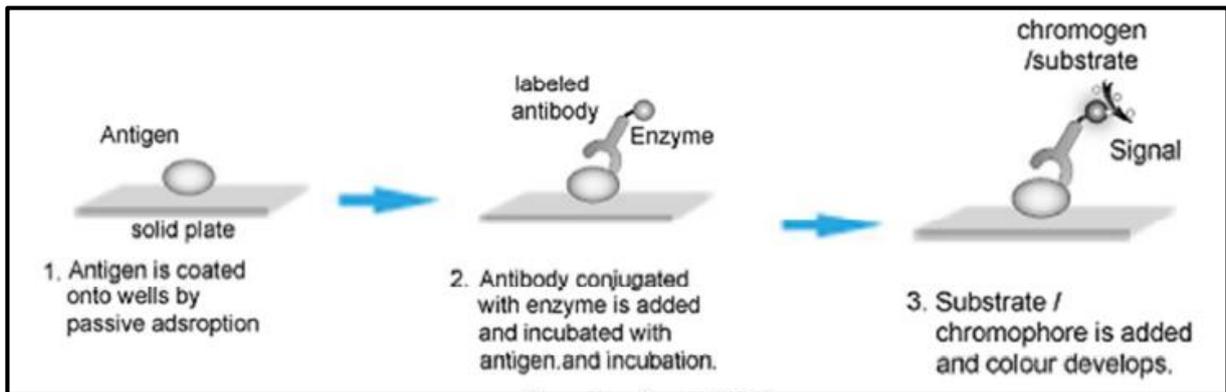


Figure 3 : Etapes de l'ELISA direct.

3.2. ELISA indirect

Un ELISA indirect est un test dans lequel l'anticorps spécifique de l'antigène primaire est reconnu par un anticorps conjugué secondaire. L'antigène est fixé passivement aux puits par incubation. Après lavage, les anticorps spécifiques de l'antigène sont incubés avec l'antigène. Les puits sont lavés et tous les anticorps liés sont détectés par l'ajout d'anticorps anti-espèces ciblant l'isotype tel que l'IgG1 de souris, l'IgM de chèvre, l'IgG1 de lapin, l'IgY de poulet, etc., qui est lié de manière covalente à une enzyme. Ces anticorps sont spécifiques de l'espèce dans laquelle le premier anticorps ajouté a été produit. Après incubation et lavage, le test est développé et peut être lu sous spectrophotomètre à la longueur d'onde correspondant à la réaction.

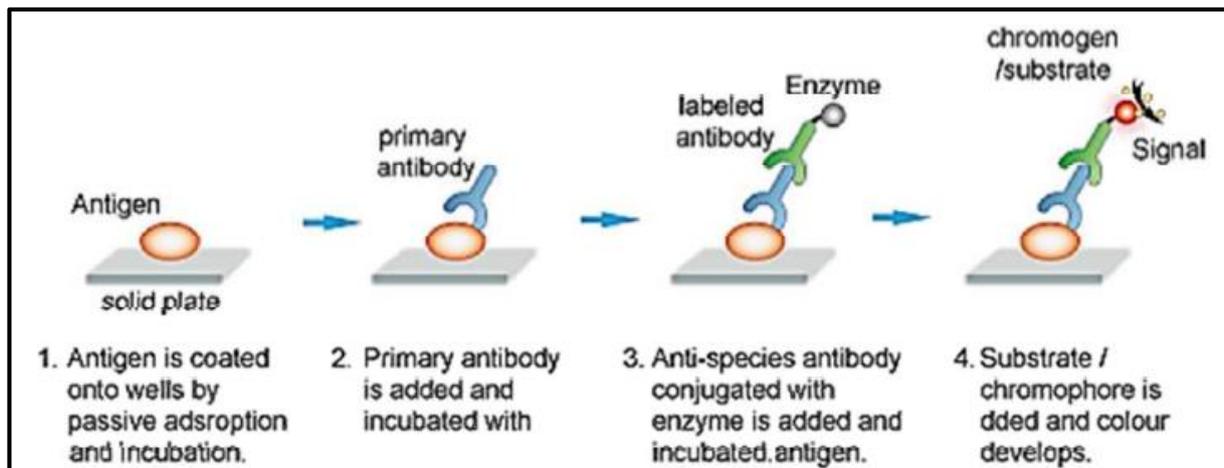


Figure 4 : Etapes de l'ELISA indirect.

3.3. ELISA sandwich

Dans cette méthode ELISA, l'antigène est mesuré entre les deux couches d'anticorps, c'est-à-dire l'anticorps de capture et l'anticorps de détection. Tout d'abord, l'anticorps est appliqué sur le puits de microtitration. Un échantillon contenant l'antigène est ajouté au puits et laissé réagir avec l'anticorps attaché au puits, formant un complexe antigène-anticorps. Une fois le puits lavé, un deuxième anticorps lié à une enzyme spécifique d'un épitope différent sur l'antigène est ajouté et laissé réagir avec l'antigène lié. Ensuite, l'anticorps secondaire non lié est éliminé par lavage avec du PBS. Enfin, le substrat est ajouté à la plaque qui est hydrolysé par une enzyme pour former des produits colorés. Il existe deux types de tests : ELISA sandwich direct et ELISA sandwich indirect.

-Sandwich direct : dans cette méthode de test sandwich, l'anticorps de capture est fixé sur la phase solide. Après avoir éliminé l'excès d'anticorps non lié, l'antigène est ajouté et est spécifiquement capturé. L'antigène est ensuite détecté par un second anticorps marqué par une enzyme directement contre l'antigène. Ce type de test est utile lorsqu'un antiserum d'espèce unique est disponible et lorsque l'antigène ne se fixe pas bien aux plaques.

-Sandwich indirect : dans cette méthode de test sandwich, l'antigène est détecté avec un second anticorps non marqué. Cet anticorps est à son tour détecté à l'aide d'un conjugué marqué par une enzyme anti-espèce. Il est essentiel que le conjugué anti-espèce ne se lie pas à l'anticorps de capture ; par conséquent, l'espèce dans laquelle l'anticorps de capture est produit doit être différente. Les mêmes considérations concernant la nécessité d'avoir au moins deux sites antigéniques permettant le « sandwich » sont pertinentes. L'avantage de ce système est qu'un seul conjugué anti-espèce peut être utilisé pour évaluer la liaison des anticorps à partir de n'importe quel nombre d'échantillons.

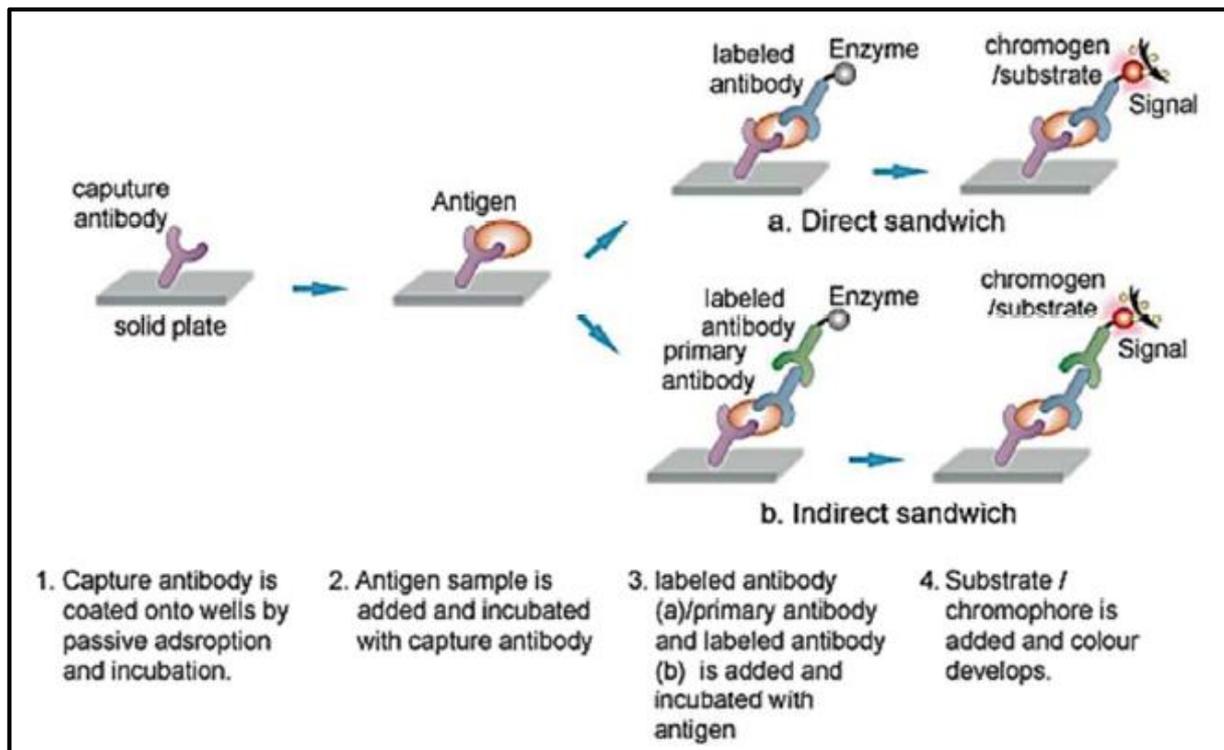


Figure 5 : Etapes de l'ELISA sandwich.

3.4. ELISA compétitif

L'ELISA compétitif est une méthode d'examen ELISA dans laquelle il y a une réaction compétitive entre l'antigène de l'échantillon et la liaison antigène qui est attachée au fond du puits de la plaque avec l'anticorps primaire. Dans cette méthode, l'antigène non échantillonné est attaché au fond de la plaque. Ensuite, l'antigène de l'échantillon et l'anticorps primaire sont insérés dans le puits. Ensuite, placez les anticorps secondaires qui sont liés à l'enzyme dans les puits de la plaque.

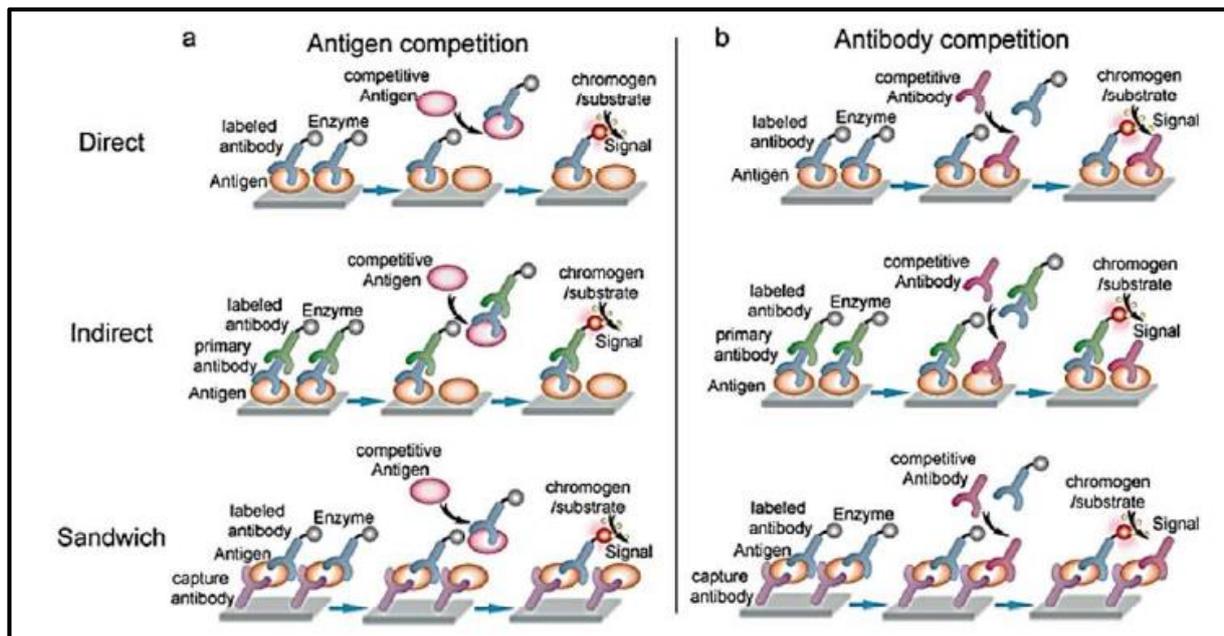


Figure 6 : Etapes de l'ELISA compétitif.