

Université Mohamed Khider /Biskra

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de vie

Département des sciences biologiques

Module : Immunologie générale

Etudiants cibles : 2^{ème} année LMD tronc commun

TD N°6 : Test ELISA

Année universitaire: 2019/2020

1/ Définition

- La technique d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) aussi appelée EIA (*Enzyme Immuno Assay*).
- Elle repose sur :
 - une réaction immunologique,
 - se déroulant sur un support solide et,
 - révélée par une réaction enzymatique en phase liquide.
- La mesure de la réaction colorée finale se fait à l'aide d'un spectrophotomètre.

- L'ELISA peut être réalisé à visée:
 - ✓ **qualitative ou quantitative;**
 - ✓ **selon que l'on utilise ou non une courbe d'étalonnage (ou gamme étalon);**
- **Le seuil de détection des ELISA quantitatifs est de l'ordre du pmol/L ou du ng/mL.**
- **Les antigènes d'intérêt ou les anticorps spécifiques** sont immobilisés sur le support solide.

Types d'ELISA

dépend

dépend

La nature de la molécule à doser

La technique de révélation

Elisa direct

Elisa indirect

Elisa sandwich

Elisa compétitif

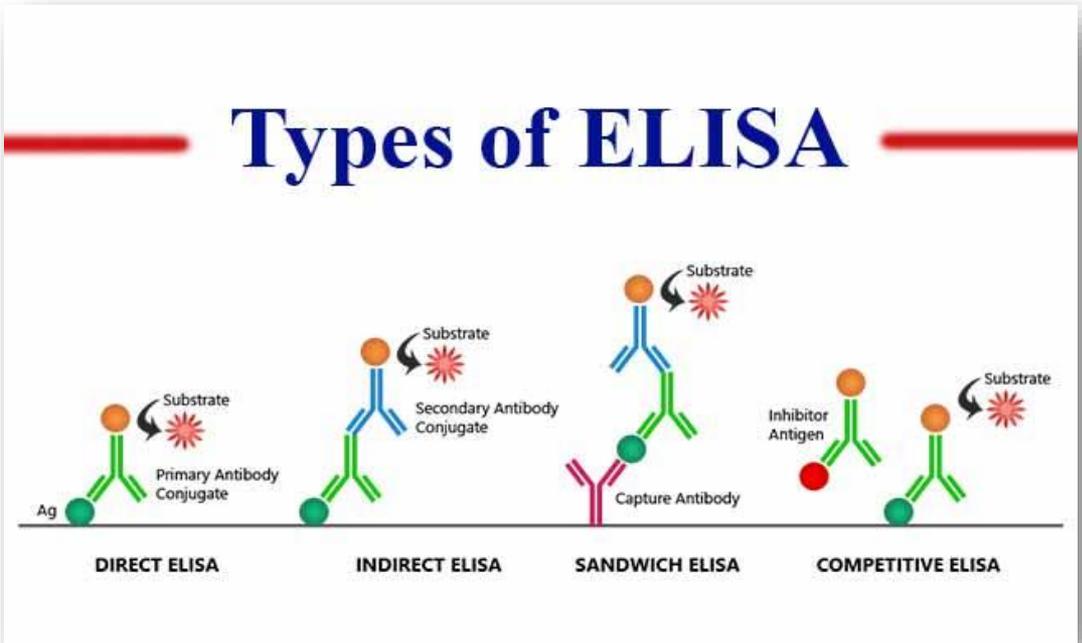


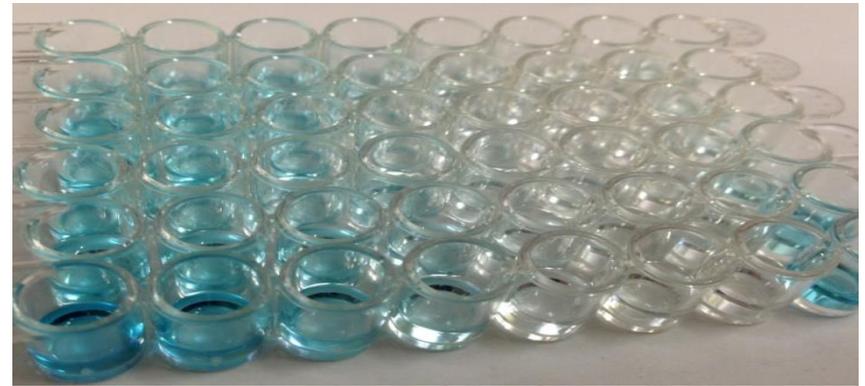
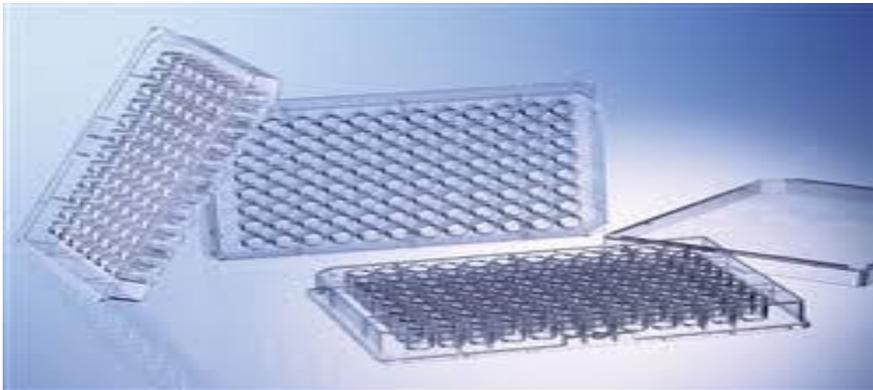
Tableau 1. Différence entre ELISA indirect et ELISA sandwich
l'analyte recherché : antigène ou anticorps

| Analyte recherché | Type de technique Elisa | Analyte adsorbé | Premier réactif soluble | Deuxième réactif soluble | Réactif soluble de révélation |
|-------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Anticorps | Indirect | Antigène | Anticorps primaire | Anticorps secondaire marqué | Substrat/ chromogène |
| Antigène | Sandwich | Anticorps de capture | Antigène | Anticorps de détection marqué | Substrat/ chromogène |

2/ Méthodologie

a. Adsorption des molécules:

- l'immobilisation de la molécule à adsorber sur un support solide,
- le plus généralement des microplaques (de 96 ou 384 puits) de polystyrène.



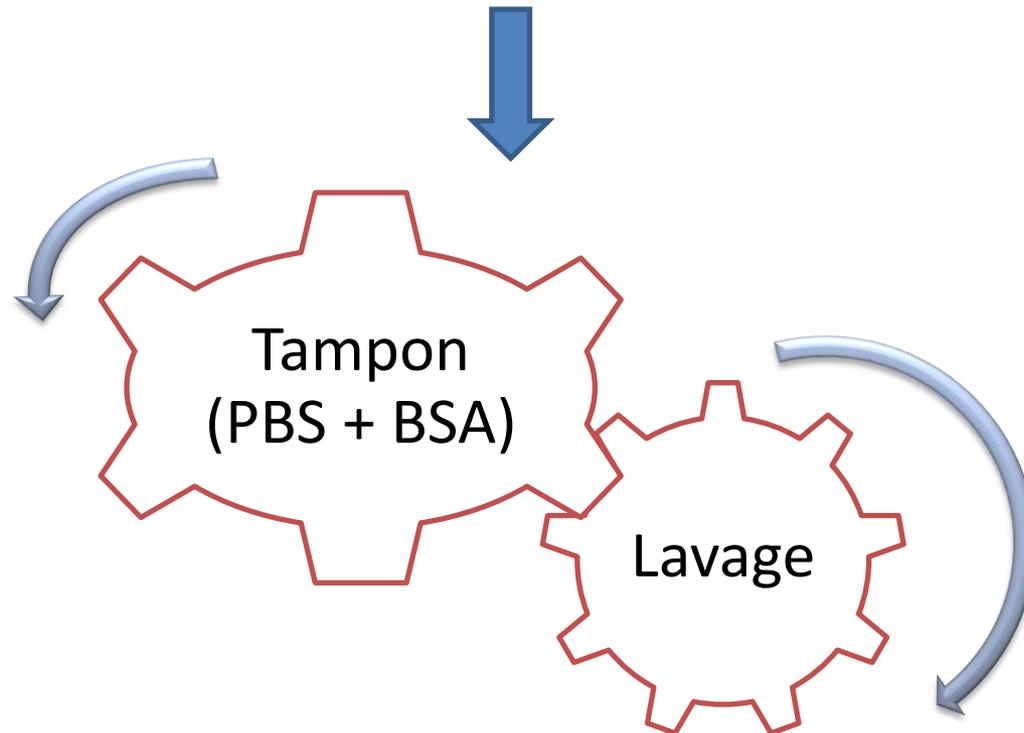


Lecteur de microplaques à absorbance

b. Saturation du support adsorbant

Elle permet :

- ❖ d'éviter toute adsorption ultérieure de matériel présent dans l'échantillon à doser ;



c. Première réaction antigène–anticorps

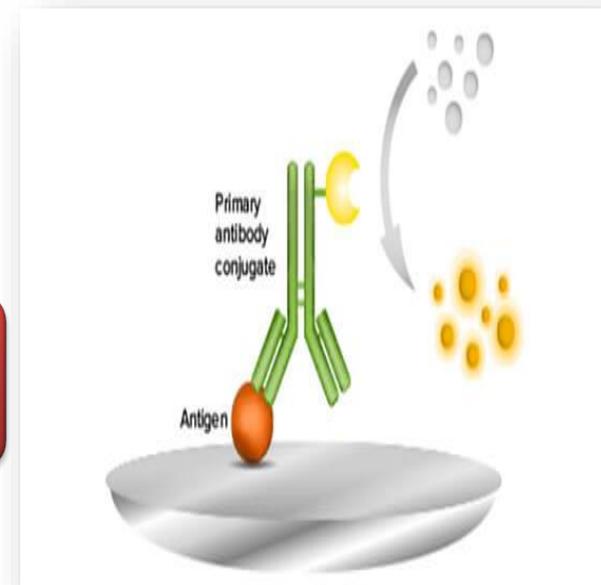
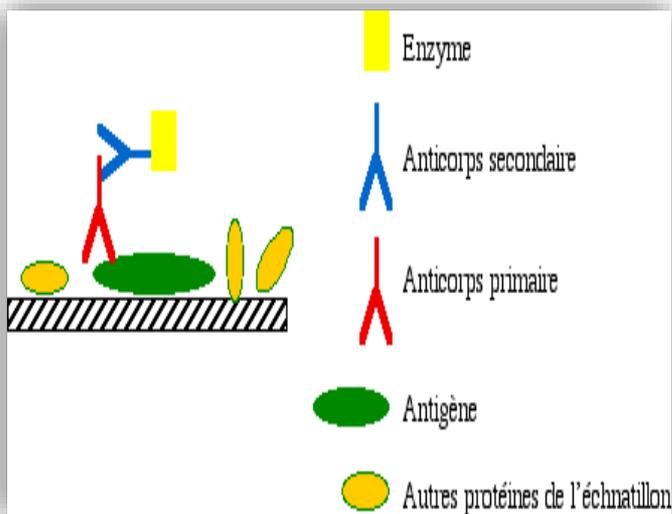
Saturation de la plaque

Lavages

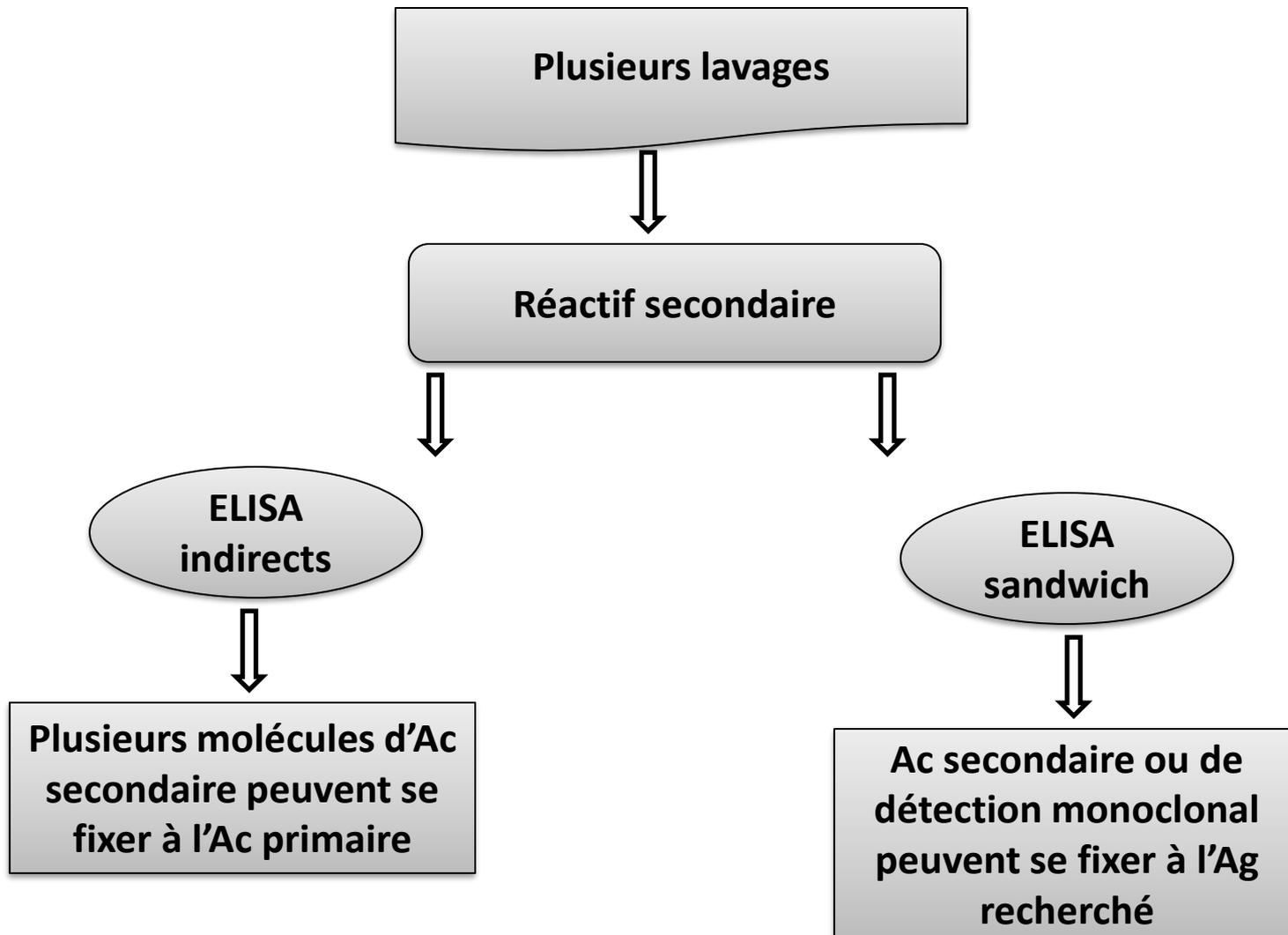
Dépôt du premier réactif soluble

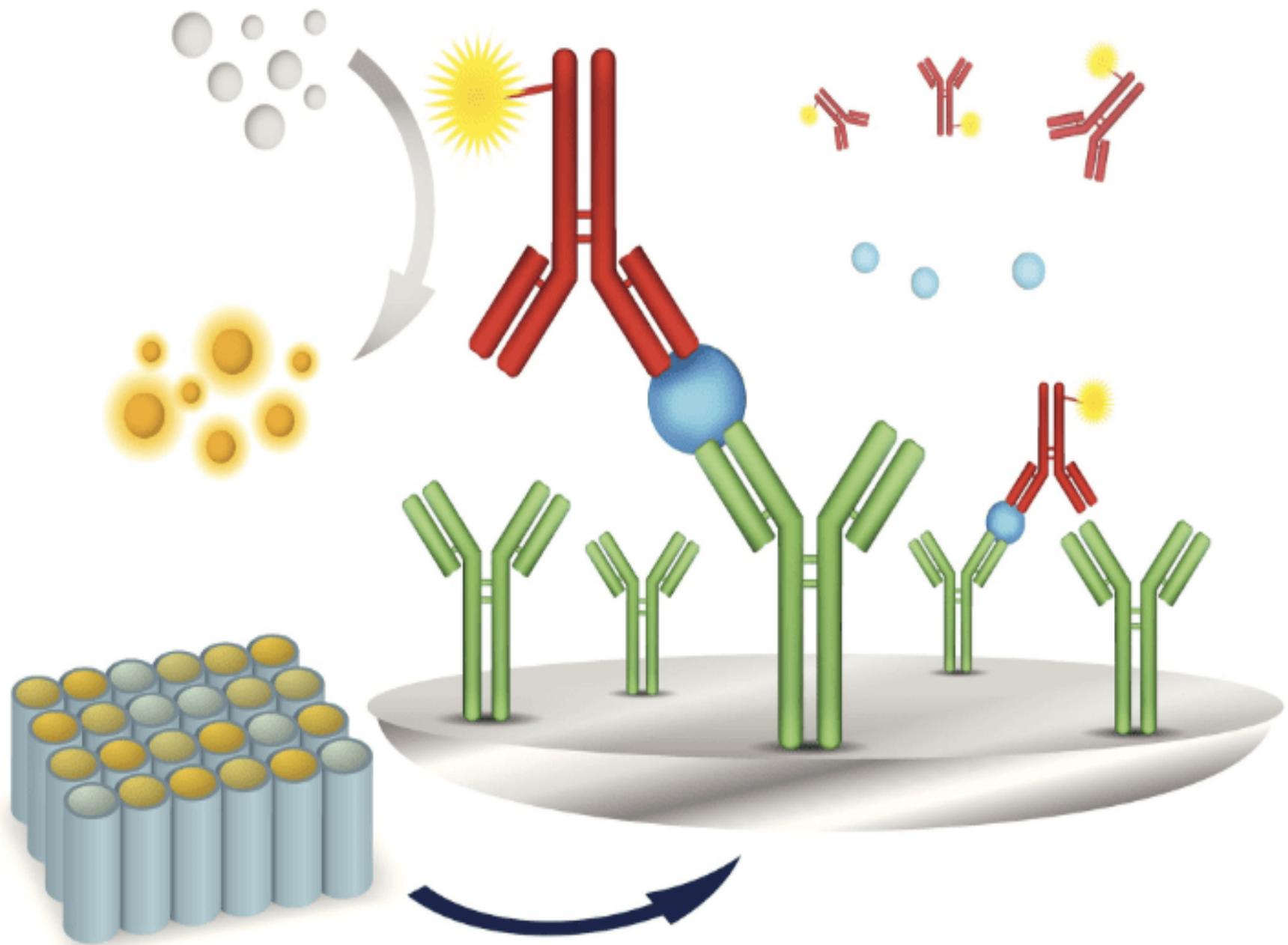
Incubation

Liaison des Ag ou Ac en solution à la molécule adsorbée



d. Deuxième réaction antigène–anticorps





e. Révélation

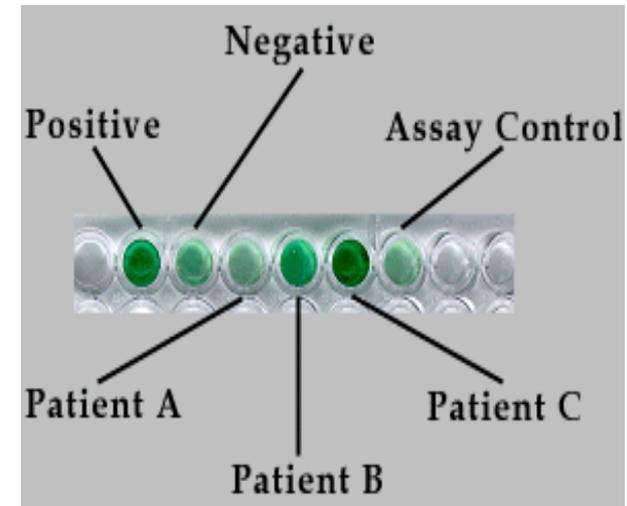
- Après lavages, l'étape ultime de l'ELISA est la révélation consistant en l'ajout **du substrat et du chromogène spécifiques de l'enzyme.**



- Mesure de la densité optique

F. Expression des résultats

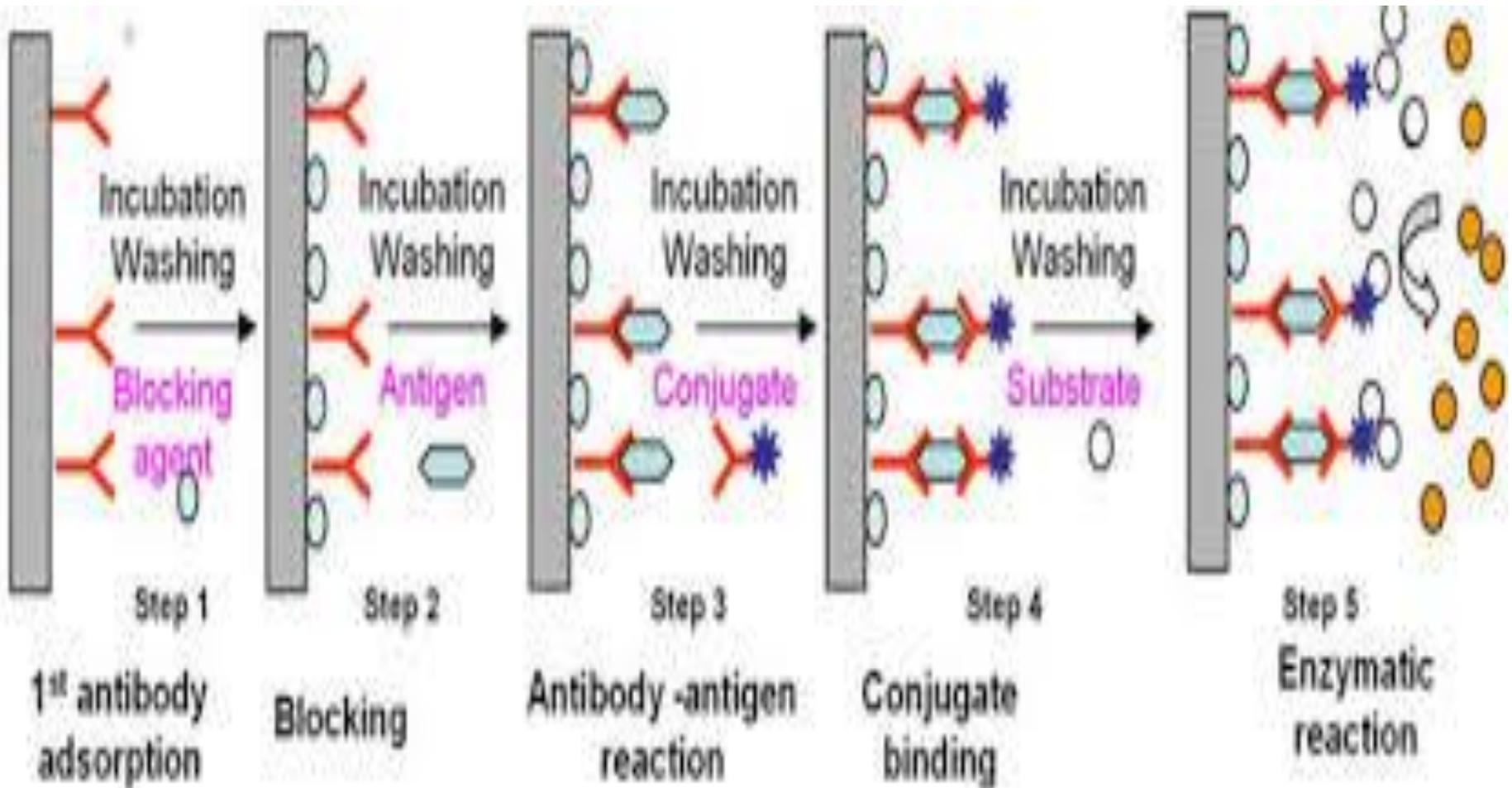
- Différentes courbes de titration peuvent être obtenues.



Exemples

ELISA SANDWICH

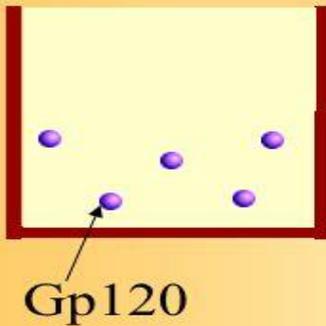
Détection de l'Ag



ELISA INDIRECTE

Détection
de
l'Anticorps

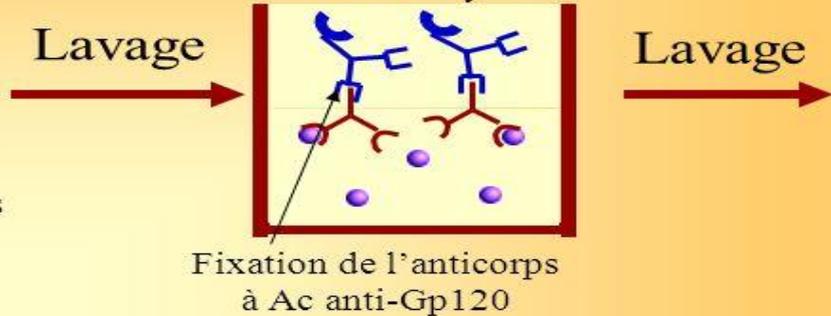
Etape n° 1:
On prépare un puits dans lequel est adsorbé l'antigène.



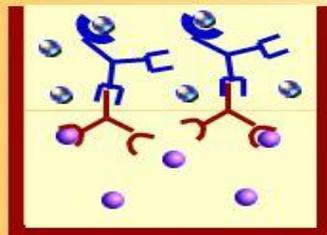
Etape n° 2:
On introduit le sérum à tester.



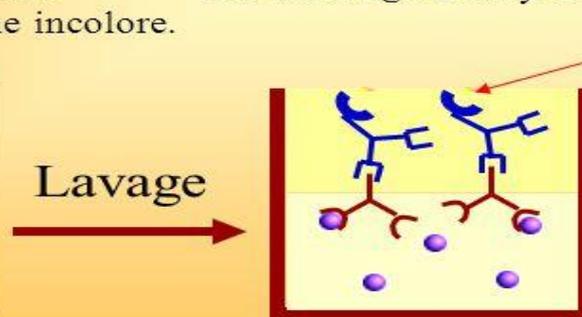
Etape n° 3:
On introduit un anticorps spécifique de la partie constante de l'anticorps anti-Gp120 conjugué à une enzyme.



Etape n° 4:
On introduit le substrat de l'enzyme: le chromogène incolore.



Etape n° 5:
On laisse agir l'enzyme.



Apparition d'une coloration dont l'intensité sera mesurée au spectrophotomètre.

Le test est positif
Il y a séropositivité

Exemples d'applications

L'ELISA est une technique très couramment développée dans :

- ❖ le domaine du diagnostic biologique;
- ❖ ou en recherche fondamentale;
- ❖ le dosage de protéines d'intérêt dans un surnageant ou lysats cellulaires est réalisé fréquemment en ELISA.

Applications industrielles et vétérinaires :

- ❖ dans le contrôle qualité des produits finis ou en cours de production,
- ❖ ainsi qu'en épidémiologie et,
- ❖ contrôle vétérinaire.

En clinique :

- ❖ le sérodiagnostic des maladies infectieuses ;
- ❖ pour le diagnostic et le suivi de maladies auto-immunes.