

TD N° 6 : Test ELISA : détection de l'Albumine de sérum bovin (BSA)

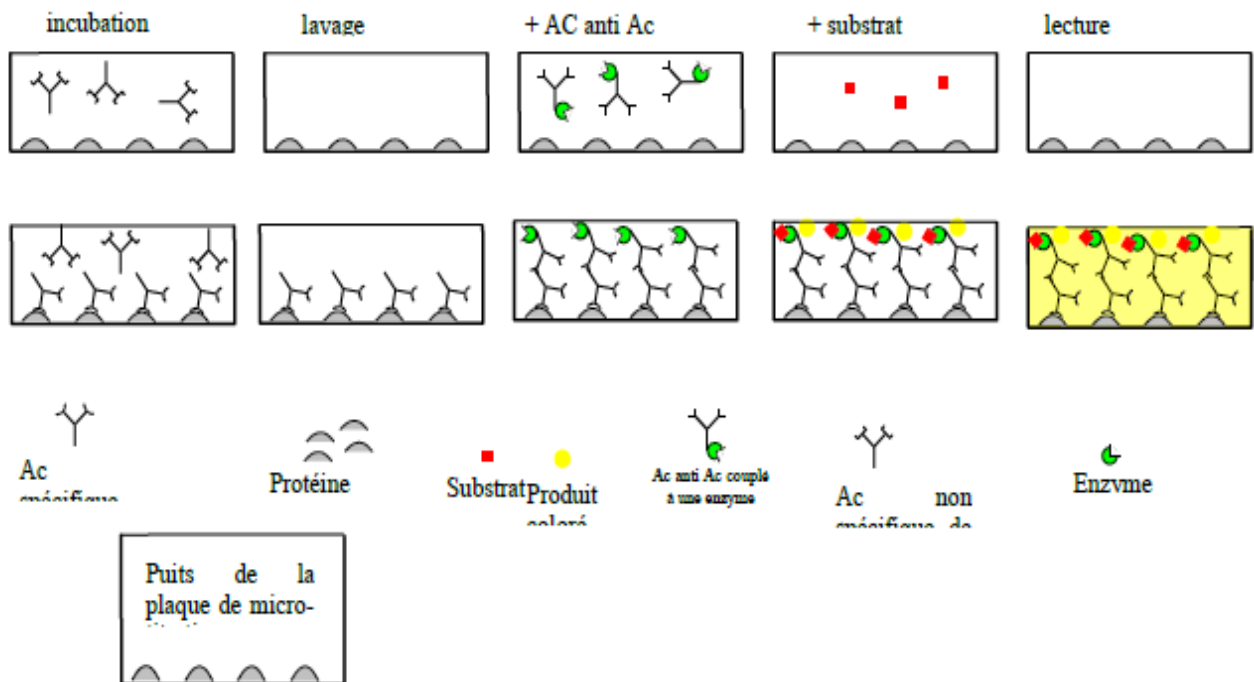
1. Introduction :

Le test ELISA (acronyme de : **Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay**) c'est une technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée. Cette méthode est principalement utilisée en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence de protéines, d'anticorps ou d'antigènes, **dans un liquide biologique**. Ce test est notamment utilisé pour le dépistage de la séropositivité au virus VIH c'est à dire pour mettre en évidence la présence d'anticorps anti-VIH dans le sérum.

2. Principe :

Dans le test présenté ici, est la technique de dosage dite "en **Sandwich**", les puits d'une microplaque sont tapissés avec un **anticorps de capture** capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée « coating », l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par interaction électrostatique. L'anticorps de capture assure la spécificité du test. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'**antigène recherché** est présent il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps, l'**anticorps traceur**, capable de se lier à l'antigène capturé est alors ajouté dans les puits et les anticorps traceurs non fixés sont éliminés par rinçage. L'anticorps traceur est couplé à une **enzyme** catalysant la formation d'un **produit coloré**. La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps traceur fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées par l'anticorps de capture.

Haut= témoin ; bas= séropositif



3. But :

Cette manipulation a pour but de détecter la présence d'un antigène spécifique (BSA) dans le **matériel à analyser (par exemple du sérum)**, ensuite la **quantité de l'antigène contenue dans l'échantillon analysé est déterminée par un dosage colorimétrique**.

4- Matériel et produits

- Des tubes à hémolyse (5 mL) + un portoir
- Une plaque de microtitration
- Une solution mère d'antigène (Ag)
- Sérum à tester de concentration inconnue (Ag X)
- Une solution d'anticorps anti-BSA secondaire
- Une solution de substrat de l'enzyme (Chrom)
- Une solution de tampon PBS
- Micropipette P.100 (10-100µL)
- Eau distillée
- Un bécher

5- Protocol expérimental

On suppose que toute la plaque de microtitration a été «coatée» avec l'anticorps anti-BSA primaire.

- Déposer dans le premier puits de la première ligne 30 µL de la solution mère d'antigène (Ag) de concentration initiale 17 µg/mL
- Déposer dans le deuxième puits 30 µL d'Ag plus 30 µL de tampon PBS, mélanger par aspiration reflux avec la micropipette (3 ou 4 fois).
- Effectuer une dilution au ½ sur les 7 puits suivants (n'utiliser qu'un cône et ne pas oublier de jeter 25 µL de la dernière dilution)
- Ajouter 30 µL de la solution d'anticorps anti BSA (anticorps de détection conjugué à une enzyme) dans chaque puits.
- Déposer 30 µL d'Ag X sur la première ligne plus 30 µL d'Acs anti-BSA
- Ajouter ensuite 30 µL de chromogène dans chaque puits (substrat de l'enzyme) ainsi que dans le puits contenant l'Ag X.
- On observe lors de l'ajout du chromogène une couleur rose se développer, cette réaction permet d'estimer la quantité d'antigène présent dans le tube noté (Ag X)

6- Résultats:

La quantification des résultats de tests ELISA est réalisée habituellement avec un lecteur de microplaques. Sinon avec un colorimètre après avoir versé le contenu des puits à analyser dans des microcuvettes de spectrophotomètre. Pour déterminer précisément la concentration en antigènes dans un sérum inconnu, il est nécessaire de construire une courbe d'étalonnage à partir des résultats obtenus avec la gamme de dilution de la solution mère d'antigène (Ag) présentée ci-dessus.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Volume d'antigène à prélever (µL)	30 µL	30 µL	30 µL de C ₂	30 µL de C ₃	30 µL de C ₄	30 µL de C ₅
Volume de PBS à ajouter (µL)	0 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL
Concentration (µg/mL)	64	32	16	8	4	2
DO	1,996	1,174	0,702	0,458	0,328	0,265

1. Quelle est la concentration (en $\mu\text{g/mL}$) en BSA dans le sérum à tester présentant une DO égale à 0,530 ?

Ce protocole vise à dépister un Ag cherché dans un sérum (l'utilisation du chromogène permet l'obtention d'une coloration spécifique indique « « la présence » » de cet Ag) ; faire le dosage (chercher la quantité par exemple d'Ag à concentration inconnue au niveau sérique (sérum) chez un patient ou bien chez un animal infecté).

a. Une courbe d'étalonnage sera réalisée en utilisant des concentrations connues de l'antigène à rechercher (BSA) provenant de la solution mère ($C1 = 64 \mu\text{g}/\mu\text{l}$: puits 1) jusqu'à la solution la plus diluée et la moins concentrée ($C6$: puits 6).

b. Comme déjà détaillé ci-dessus, une dilution ($\frac{1}{2}$: $30\mu\text{L}$ PBS ajouté à chaque puits) est indispensable pour obtenir la gamme d'étalonnage voulue (à concentrations connues décroissantes ; Voir la figure ci-dessous)

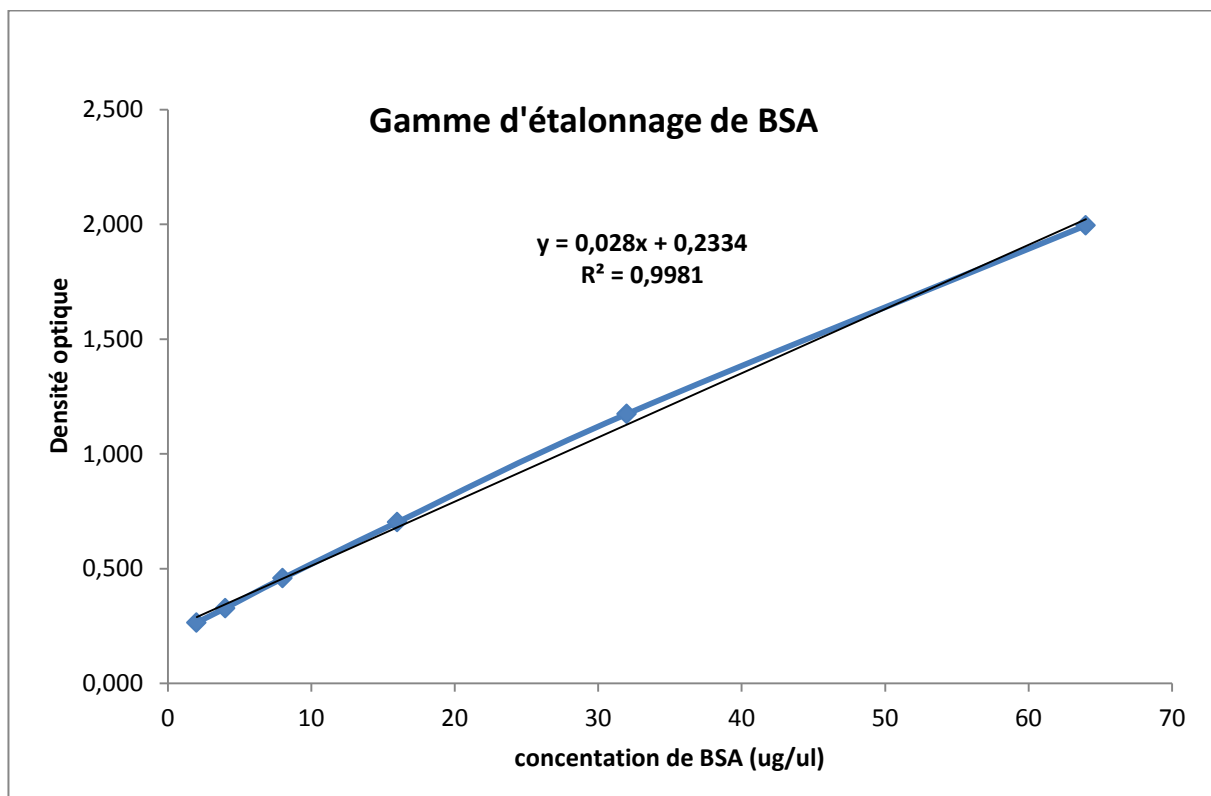
PBS : Phosphate Buffered Saline, une solution tampon, utilisée en biochimie à fin de maintenir un ph constant du milieu biologique et/ou chimique.

c. On peut aisément remplir le tableau en déduisant les concentrations en Ag dans chaque puits :

$C1$: $64 \mu\text{g/mL}$ dilution $\frac{1}{2}$ $C2$: $64/2=32 \mu\text{g/mL}$ $C3$: $32/2=16 \mu\text{g/mL}$

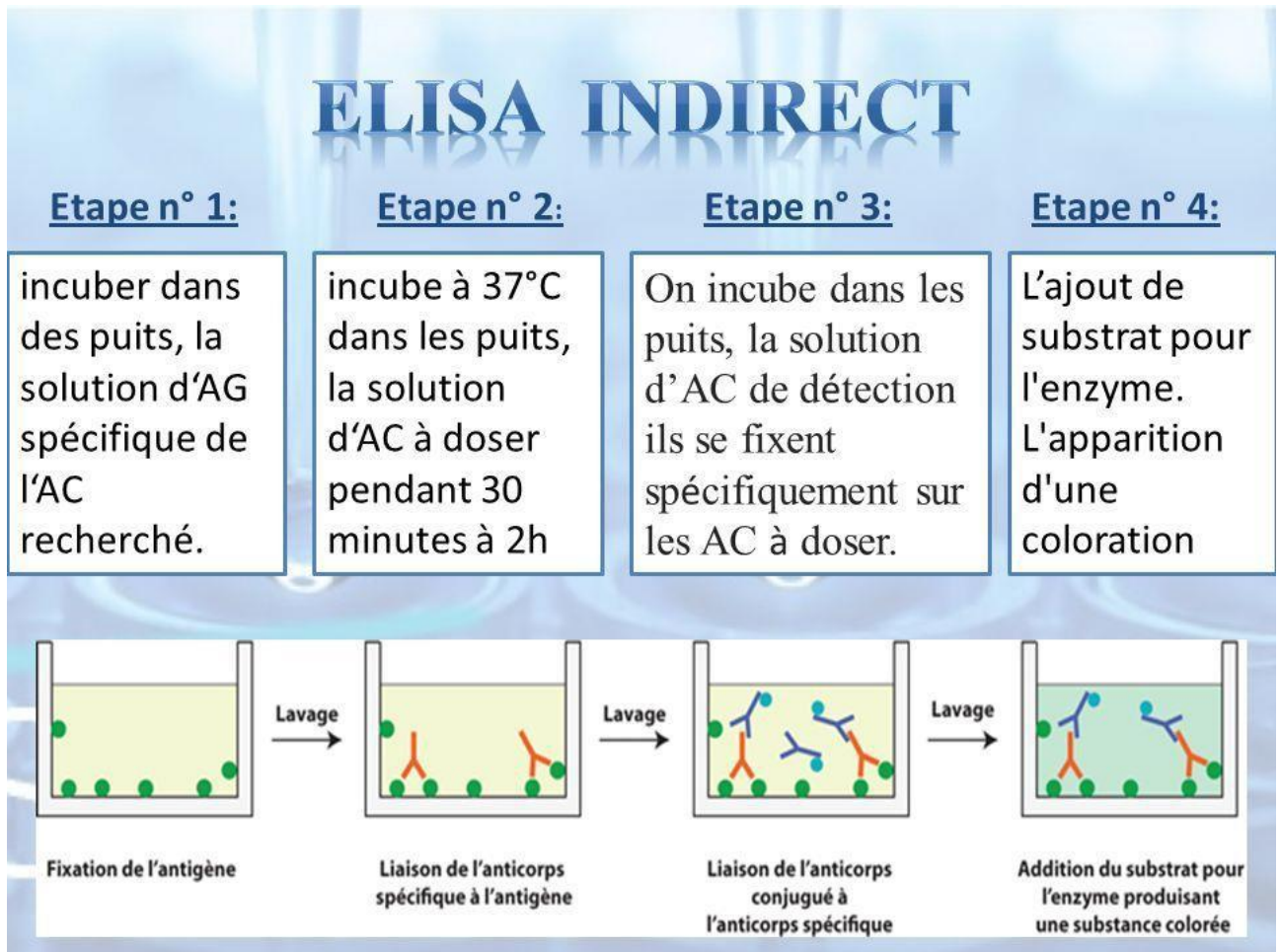
On termine de la même façon les autres concentrations.

d. Détermination de la concentration inconnue en BSA dans le sérum à tester lorsque la valeur de densité optique obtenue est égale à 0,530 en utilisant l'équation $Y=0,028x+0,2334$ de la courbe d'étalonnage $DO = f(C)$



Courbe d'étalonnage de BSA

2. Sous forme d'un schéma, expliquer le principe de la technique ELISA indirect?



3. Dans le test ELISA en sandwich, quelle est l'intérêt d'utiliser les anticorps secondaires et expliquer la relation entre l'intensité de la coloration et la quantité de protéine à doser ?

L'anticorps traceur est couplé ou conjuguée à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré lorsqu'on ajoute son substrat.

La réaction enzymatique peut être quantifiée alors par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène (une révélation de complexes immuns AC I de capture-Ag recherché et une quantification de celui-ci). De ce fait, le nombre de molécules d'anticorps traceur (couplé à une enzyme) fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes recherchés immobilisées par l'anticorps de capture et **l'intensité de la coloration est proportionnelle alors à la concentration de l'antigène recherché.**

4. Parmi les propositions sur la méthode ELISA. Répondre par Vrai ou Faux et corriger les phrases fausses

- Le test ELISA est une méthode immuno-radioactif **F (immunoabsorption liée une enzyme)**
- Le test ELISA est utilisé dans le cadre du dépistage de la séronégativité pour le VIH **V**
- Le test ELISA de type sandwich permet de détecter et quantifier les anticorps dans les milieux biologiques **F (de détecter et quantifier l'Antigène)**
- Dans le test ELISA indirecte, l'anticorps traceur (couplé à une enzyme) capable de se lier à l'antigène capturé **F (il se lie à l'anticorps recherché)**
- Dans le test ELISA en sandwich, le développement de la couleur signifie que le sérum à tester contient l'antigène recherché. **V**