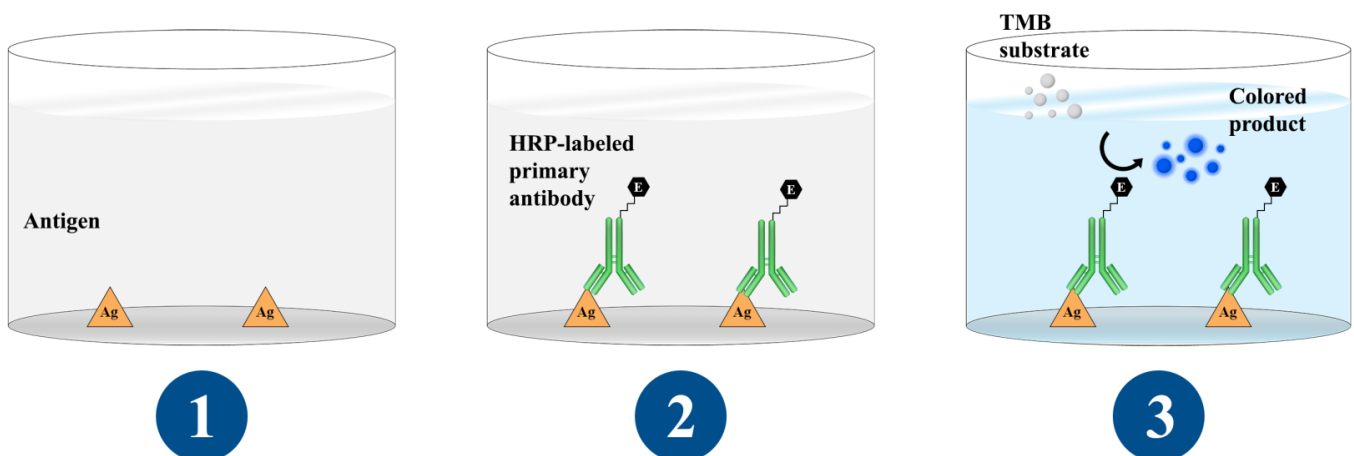


Méthode ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay)

- Présentation -

La méthode ELISA consiste à doser visuellement une molécule présente dans une solution : un **anticorps**. Pour faire simple : on choisit une molécule capable de se lier avec celle qu'on veut doser : l'**antigène**, qu'on dépose dans un bain / un puits. On ajoute ensuite dans ce même bain la solution contenant l'anticorps. Les antigènes et les anticorps vont alors se lier. On prend soin d'ailleurs de rincer le support entre chaque manipulation pour enlever l'excédent d'anticorps appliqué. Généralement, on intègre un deuxième anticorps capable de produire de la couleur ou de la lumière (grâce à une enzyme). Enfin, l'ajout d'un **substrat** permet de provoquer la réaction lumineuse avec l'enzyme. La concentration en couleur perçue (à l'œil, au microscope, au colorimètre ou au spectrophotomètre...) permet alors directement de :

- conclure sur la présence ou non de l'anticorps dans la solution testée
- obtenir une estimation (plus ou moins précise) de la concentration de cet anticorps (*peut demander de réaliser une gamme étalon au préalable*)



Méthode ELISA Direct ci-dessus (source en cliquant sur l'image)

Définitions :

1. **Antigènes** : toute substance reconnue comme étrangère par notre système immunitaire
2. **Anticorps** : protéine capable de réagir avec un antigène
3. **Substrat** : le plus souvent une substance solide support d'un réactif
4. **Epitope** : Partie d'une molécule capable de stimuler la production d'un anticorps

Matériel :

- Plaques de microtitration 96 puits à fond plat

- Les différentes versions -

Il existe 4 versions différentes de la méthode ELISA en fonction de la précision recherchée et du contexte du test (approche quantitative ou qualitative).

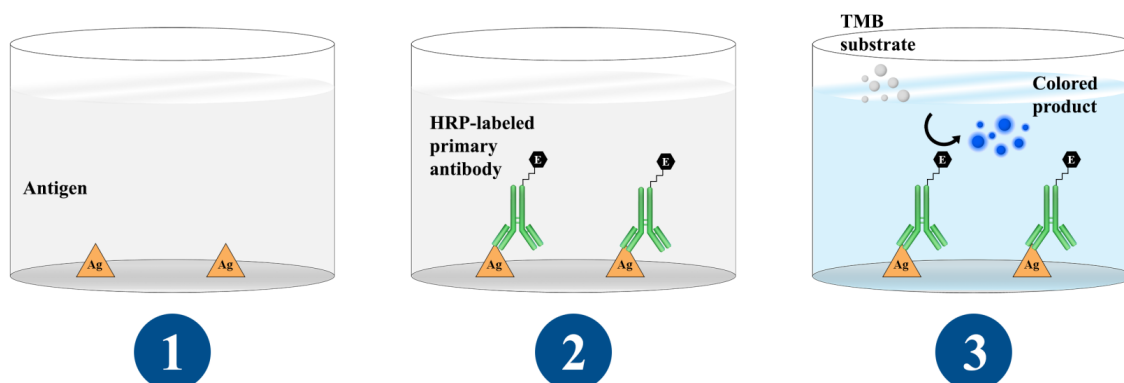
• ELISA Directe

Fonctionnement :

La méthode Direct n'utilise pas d'intermédiaire entre l'antigène et l'anticorps porteur de l'enzyme. On applique l'un sur l'autre puis on ajoute un "substrat chromogène", c'est à dire un révélateur qui permet de savoir si des antigènes ont été retenus.

Procédure :

1. **Fixer les antigènes** (ou les anticorps selon le test souhaité). L'expérience s'effectue la plupart du temps sur des plaques de microtitration. Le fond des puits est recouvert d'un matériau capable d'absorber les antigènes déposés à sa surface, et donc de les fixer. On dit que les antigènes **s'adsorbent**.
2. **Laisser incuber** la plaque permet de fixer durablement les antigènes dans le fond du puits.
3. **Rincer le puits** afin de retirer l'excédent d'antigènes non fixés.
4. **Ajouter l'anticorps** lié à l'enzyme capable de réagir avec le substrat. C'est à ce moment que des couples antigène-anticorps vont se former.
5. **Rincer le puits** afin de retirer l'excédent d'anticorps non fixés à des antigènes.
6. **Ajouter le substrat chromogène** permettant de déclencher la réaction lumineuse avec l'enzyme.
7. **Mesurer la concentration de l'anticorps** en utilisant l'absorption de la solution.



• ELISA Indirecte

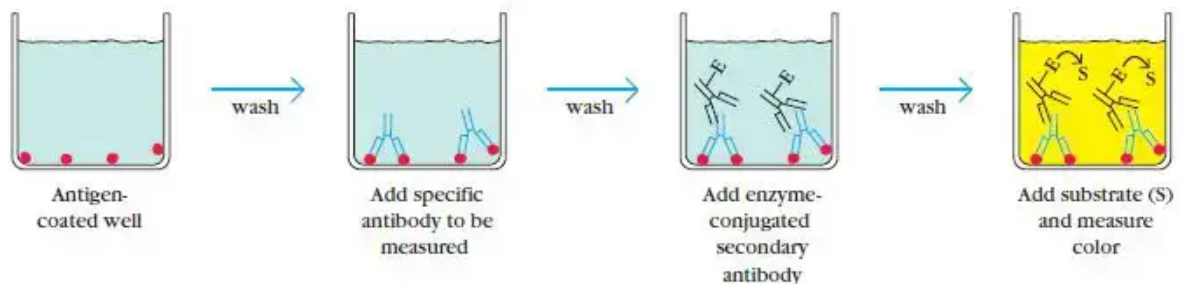
Fonctionnement :

La méthode Indirecte utilise un intermédiaire en plus de l'antigène et de l'anticorps à doser. Un anticorps secondaire portant l'enzyme se fixe sur l'anticorps primaire fixé à l'antigène. Plusieurs anticorps secondaires peuvent se fixer à un anticorps primaire, augmentant ainsi la précision du dosage.

Procédure :

1. **Fixer les antigènes** (ou les anticorps selon le test souhaité). L'expérience s'effectue la plupart du temps sur des plaques de microtitration. Le fond des puits est recouvert d'un matériau capable d'absorber les antigènes déposés à sa surface, et donc de les fixer. On dit que les antigènes **s'adsorbent**.
2. **Laisser incuber** la plaque permet de fixer durablement les antigènes dans le fond du puits.
3. **Rincer le puits** afin de retirer l'excédent d'antigènes non fixés.
4. **Ajouter l'anticorps primaire**. C'est à ce moment que des couples antigène-anticorps vont se former.
5. **Laisser incuber** la plaque permet de s'assurer qu'un maximum de liaisons antigènes-anticorps primaires se forment.
6. **Rincer le puits** afin de retirer l'excédent d'antigènes primaires (et autres) non fixés.
7. **Ajouter l'anticorps secondaire** lié à l'enzyme capable de réagir avec le substrat.
8. **Laisser incuber** pour permettre la formation de complexes antigène-anticorps-enzyme.
9. **Rincer le puits** afin de retirer l'excédent d'anticorps secondaires non fixés à des antigènes.
10. **Ajouter le substrat chromogène** permettant de déclencher la réaction lumineuse avec l'enzyme.
11. **Mesurer la concentration de l'anticorps primaire** en utilisant l'absorption de la solution.

(a) Indirect ELISA



• ELISA Sandwich

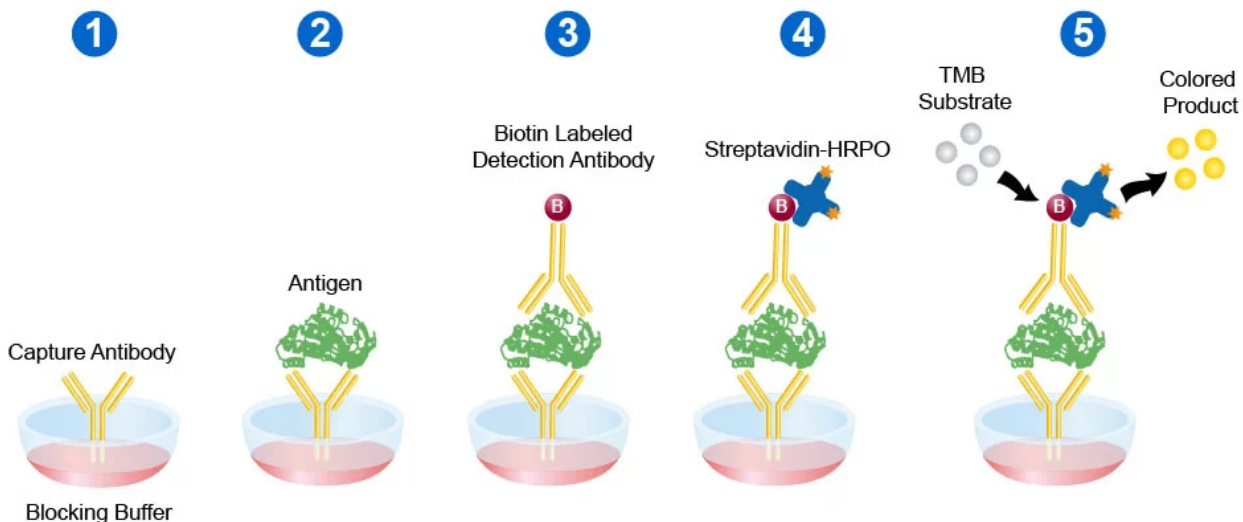
Fonctionnement :

La méthode Sandwich implique l'utilisation de deux anticorps spécifiques. Le premier anticorps (capture) est fixé au fond du puits et capture l'antigène cible. Ensuite, un deuxième anticorps (détection) est ajouté, se liant à un autre épitope de l'antigène, formant ainsi un "sandwich" antigène-anticorps. L'anticorps de détection est généralement couplé à une enzyme qui, lorsqu'elle réagit avec un substrat, génère un signal détectable.

Procédure :

1. **Revêtir le fond des puits** avec l'anticorps de capture spécifique à l'antigène cible.
2. **Incuber** pour permettre la fixation de l'anticorps de capture.
3. **Rincer** pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé.
4. **Ajouter l'échantillon** contenant l'antigène cible.
5. **Incuber** pour permettre la formation du complexe antigène-anticorps.
6. **Rincer** pour éliminer l'excès d'antigène non lié.
7. **Ajouter l'anticorps** de détection spécifique à un autre épitope de l'antigène cible.
8. **Incuber** pour permettre la formation du "sandwich" antigène-anticorps.
9. **Rincer** pour éliminer l'excès d'anticorps de détection non lié.
10. **Ajouter le substrat** chromogène pour déclencher la réaction enzymatique.
11. **Mesurer la réaction** enzymatique pour estimer la concentration de l'antigène cible.

Sandwich ELISA



• ELISA Competition

Fonctionnement :

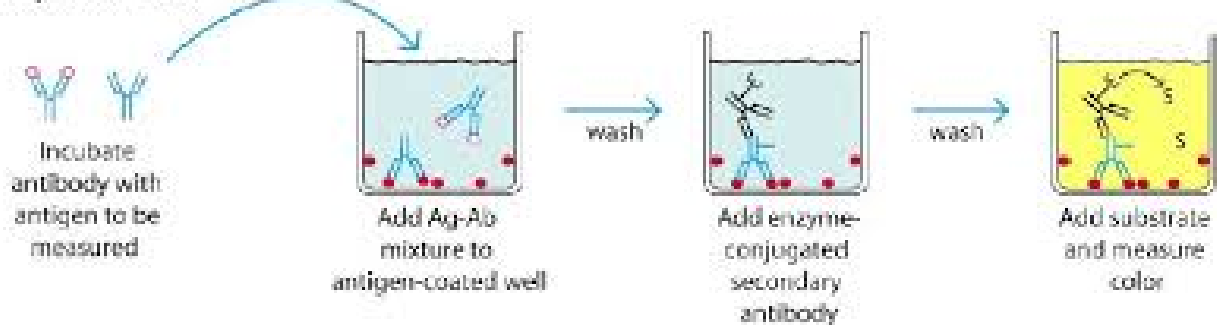
La méthode de Compétition repose sur la compétition entre un antigène marqué et un antigène

non marqué pour la liaison à un anticorps fixé au fond du puits. L'antigène de l'échantillon et l'antigène marqué (conjugué à une enzyme) entre en compétition pour se lier à l'anticorps spécifique fixé au fond du puits. La quantité d'antigène de l'échantillon est inversement proportionnelle au signal mesuré.

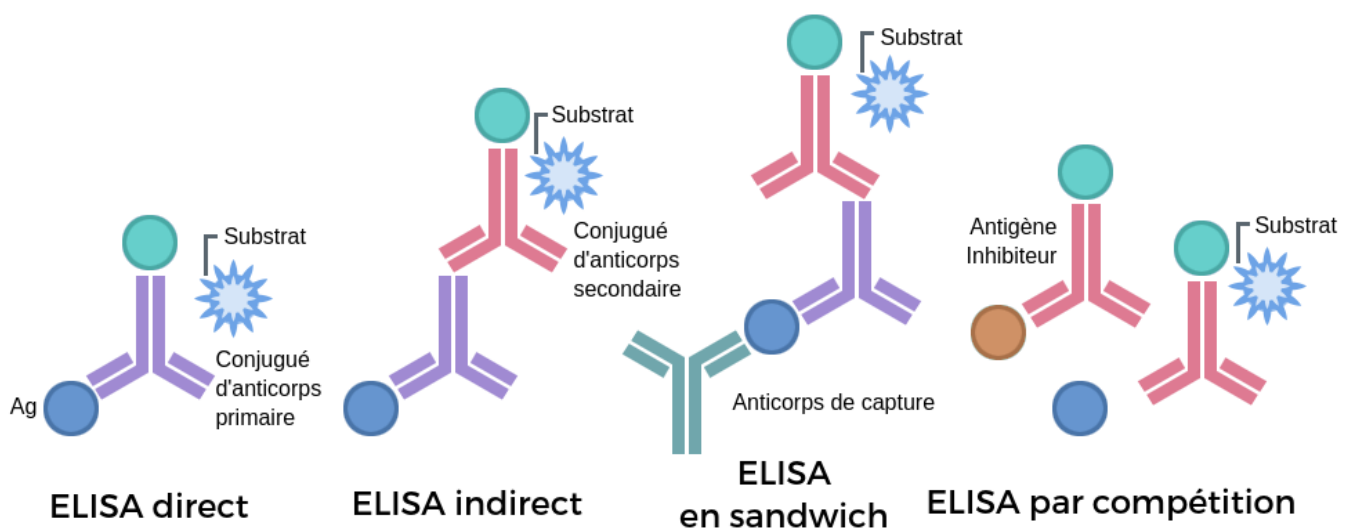
Procédure :

1. **Revêtir le fond** des puits avec l'anticorps spécifique.
2. **Incuber** pour permettre la fixation de l'anticorps.
3. **Rincer** pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé.
4. **Ajouter l'échantillon** contenant l'antigène cible et l'antigène marqué (conjugué à une enzyme).
5. **Incuber** pour permettre la compétition entre l'antigène de l'échantillon et l'antigène marqué pour se lier à l'anticorps.
6. **Rincer** pour éliminer l'excès d'antigène et d'antigène marqué non lié.
7. **Ajouter** le substrat chromogène pour déclencher la réaction enzymatique.
8. **Mesurer la réaction** enzymatique pour estimer la concentration de l'antigène cible.

Competitive ELISA



- Conclusion-



La méthode ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) offre une approche polyvalente pour détecter la présence d'anticorps dans une solution et est largement utilisée dans divers domaines, notamment

la recherche médicale, le diagnostic clinique et la surveillance des maladies infectieuses. Avec ses différentes versions, telles que ELISA Directe, ELISA Indirecte, ELISA Sandwich et ELISA Competition, elle permet une analyse précise et sensible, adaptée à une gamme étendue d'applications. En combinant des principes immuno-chimiques avec des réactions enzymatiques, l'ELISA fournit des résultats fiables et reproductibles, facilitant ainsi la prise de décision clinique et la recherche scientifique.

Sources :

Wikipédia[Passeport Santé](#)

Microbiology[note](#)

Fiche Technique de l'ELISA

Définition

L'ELISA est une méthode biochimique permettant de détecter et de quantifier des substances telles que des peptides, des protéines, des anticorps et des hormones.

Principe

L'ELISA repose sur l'utilisation d'anticorps liés à une enzyme pour détecter la présence d'une substance cible (antigène) dans un échantillon. La réaction enzymatique produit un signal (souvent une couleur) qui est mesuré pour déterminer la quantité de cible présente.

Types d'ELISA

- **ELISA Direct**: L'antigène est immobilisé sur une surface et détecté directement par un anticorps conjugué à une enzyme.
- **ELISA Indirect**: L'antigène est immobilisé, puis détecté par un anticorps primaire non conjugué et un anticorps secondaire conjugué à une enzyme.
- **ELISA Sandwich**: Utilise deux anticorps spécifiques à l'antigène, un pour la capture et un pour la détection.
- **ELISA Compétitif**: L'échantillon et un antigène marqué avec une enzyme concourent pour la liaison à un anticorps spécifique.

Composants

- **Antigène**: Molécule cible à détecter.
- **Anticorps**: Protéines qui se lient spécifiquement à l'antigène.

- **Enzyme:** Conjuguée à l'anticorps pour produire un signal détectable.
- **Substrat:** Réagit avec l'enzyme pour produire un signal (souvent colorimétrique).
- **Plaques ELISA:** Plaques à 96 puits généralement utilisées pour l'immobilisation des anticorps ou antigènes.

Étapes de l'ELISA

1. **Coating:** Immobilisation de l'antigène ou de l'anticorps sur la plaque.
2. **Blocage:** Saturation des sites non spécifiques avec une protéine bloquante pour éviter les liaisons non spécifiques.
3. **Incubation avec l'échantillon:** Ajout de l'échantillon contenant l'antigène ou l'anticorps cible.
4. **Incubation avec l'anticorps conjugué à l'enzyme:** Ajout de l'anticorps détecteur lié à une enzyme.
5. **Lavage:** Élimination des composants non liés.
6. **Révélation:** Ajout du substrat pour l'enzyme, entraînant une réaction colorimétrique.
7. **Lecture:** Mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre.

Applications

- **Diagnostic médical:** Détection de maladies infectieuses, de marqueurs tumoraux, de niveaux d'hormones.
- **Recherche:** Quantification des protéines, des anticorps, des cytokines.
- **Industrie alimentaire:** Détection de contaminants ou d'allergènes.
- **Vétérinaire:** Diagnostic des maladies animales.

Schéma de l'ELISA

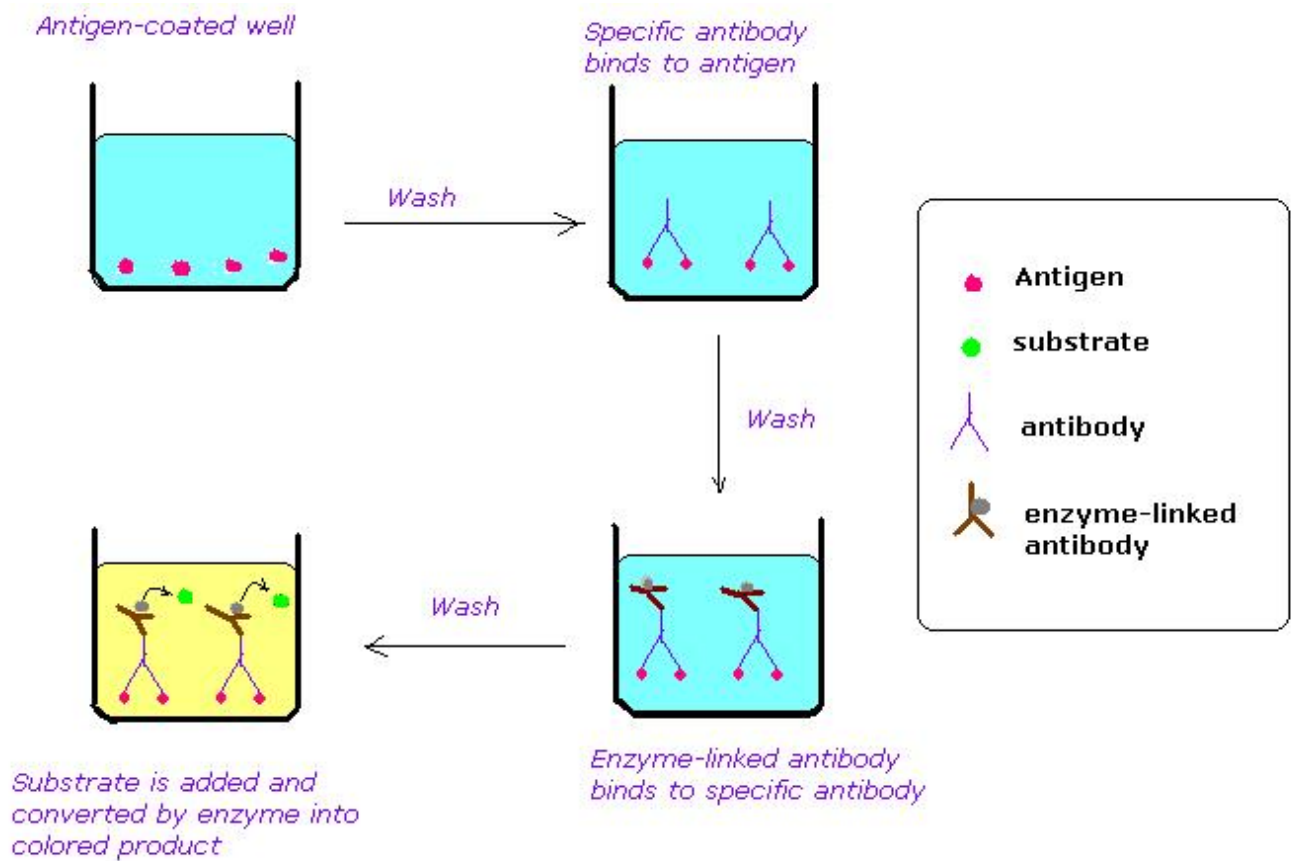


Figure 1: Indirect ELISA

Tableau Résumé des Étapes de l'ELISA

Étape	Description
Coating	Immobilisation de l'antigène ou de l'anticorps sur la plaque
Blocage	Saturation des sites non spécifiques
Incubation avec l'échantillon	Ajout de l'échantillon contenant l'antigène ou l'anticorps cible
Incubation avec l'anticorps conjugué à l'enzyme	Ajout de l'anticorps détecteur lié à une enzyme
Lavage	Élimination des composants non liés
Révélation	Ajout du substrat pour l'enzyme
Lecture	Mesure de l'absorbance avec un spectrophotomètre

Optimisation de l'ELISA

- **Concentration des anticorps:** Ajustement pour éviter la saturation ou une liaison insuffisante.
- **Conditions d'incubation:** Optimisation du temps et de la température d'incubation.
- **Tampons de lavage:** Utilisation de tampons appropriés pour minimiser les liaisons non spécifiques.
- **Contrôle négatif et positif:** Inclusion pour valider les résultats.

Variantes de l'ELISA

- **ELISA Direct:** Simplicité et rapidité, mais risque de bruit de fond élevé.

- **ELISA Indirect:** Sensibilité accrue grâce à l'amplification du signal.
- **ELISA Sandwich:** Très spécifique et sensible, idéal pour des échantillons complexes.
- **ELISA Compétitif:** Utile pour les petits antigènes ou lorsque la quantification directe est difficile.

Liens et Articles Scientifiques

1. Article de base sur l'ELISA: [Engvall et Perlmann, 1971](#)
2. Optimisation des conditions de l'ELISA: [Crowther, 2000](#)
3. Utilisation de l'ELISA en diagnostic: [Schüpbach et al., 1984](#)
4. ELISA pour la détection des anticorps: [Van Weemen et Schuurs, 1971](#)
5. Avancées récentes dans l'ELISA: [Lequin, 2005](#)

Revision #19

Created 28 February 2024 13:34:45 by Spirckel Paul

Updated 25 July 2024 07:52:33 by Kernanec Alan