**TP 4 : la technique ELISA.**

Le test ELISA (acronyme d’Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique.

Dans le test présenté ici, on recherche dans un sérum de lapin un anticorps dirigé contre la sérum-albumine bovine (BSA). La BSA permet la capture spécifique des anticorps anti-BSA éventuellement présents dans les sérums testés. Les anticorps anti-BSA sont ensuite révélés par un anticorps traceur anti-immunoglobuline de lapin conjugué à la peroxydase. La réaction de l'enzyme avec la tétraméthylbenzidine donne un dérivé bleu dont la concentration est proportionnelle à celle des anticorps détectés.

La technique ELISA, plus simple et moins coûteuse a presque totalement remplacé. La révélation du test n’utilise pas, comme dans la RIA de radioéléments mais est liée au clivage par une enzyme, d’un substrat incolore en un produit coloré.

Le principe de l’ELISA indirect consiste à détecter la présence d’un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

• D’un antigène connu spécifique à l’anticorps recherché

• D’un échantillon à analyser

• D’un anticorps secondaire anti Ig couplé à une peroxydase

• Du substrat spécifique à l’enzyme.

Le test comporte quatre étapes principales :

• Fixation de l’antigène : L’antigène connu, spécifique à l’anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L’antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.

• Fixation de l’anticorps à doser : On incube notre échantillon à doser (sérum contenant l’anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d’anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.

• Fixation de l’anticorps de détection : On incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C’est un anticorps anti Ig qui va donc reconnaître l’anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.

• Révélation : On incube un substrat spécifique à l’enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l’anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration. L’intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d’enzyme présente et donc à la concentration d’anticorps recherchés.



Rappel :

Il existe 4 techniques ELISA :

Dosage d’un antigène par méthode ELISA type direct

Dosage d’un antigène par méthode ELISA de type sandwich

Dosage d’un antigène par méthode ELISA de type compétitif

Dosage d’un antigène par méthode ELISA de type indirect

