

TP n° 19 :

La détection des anticorps sériques

Objectif de connaissance : comprendre comment on peut détecter des anticorps sériques.

Le test Elisa (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est le principal test de dépistage du Sida : recherche des anticorps anti-VIH.

Ce test est utilisé pour la détection d'antigène ou d'anticorps dans le sang (sérum) d'un patient.

Pour détecter un anticorps, on fixe au fond des puits l'antigène correspondant. On dépose ensuite les sérums à tester. On rince : si les anticorps sont présents, ils restent fixés aux antigènes au fond des puits. On les met alors en évidence en utilisant une substance spécifique (anticorps de détection), couplée à une enzyme qui transforme un substrat incolore en un produit coloré, témoin de la présence de l'anticorps recherché.

Objectifs méthodologiques:

Réaliser une manipulation selon un protocole

Traduire des informations par un schéma

Communiquer

Supports :

Test ELISA

Doc.3 p 339 Bordas TS

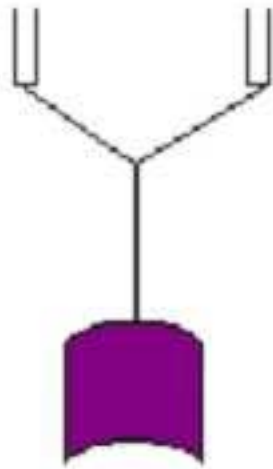
Soit quatre individus, Willy, Xavier, Yannis et Zoé que l'on vaccine (ou non) contre un antigène donné. On recherche ensuite (test Elisa) la présence d'anticorps spécifiquement dirigés contre cet antigène.

	Willy	Xavier	Yannis	Zoé
T ₀	Vaccination	Vaccination	Vaccination	Pas de vaccination
T ₁₅	Test Elisa : W15	Test Elisa : X15	Test Elisa : Y15	Test Elisa : Z15
T ₆₀	Vaccination de rappel	Pas de vaccination de rappel	Pas de vaccination de rappel	Toujours pas de vaccination
T ₉₀	Test Elisa : W90	Test Elisa : X90	Test Elisa : Y90	Test Elisa : Z90

Travail à réaliser : Attention, deux groupes travaillent en commun pour la partie manipulation (gamme étalon pour l'un, dosages W, X, Y, Z pour l'autre)

- 1) Effectuer le test ELISA en suivant scrupuleusement la fiche technique.
- 2) Présentez les résultats obtenus sous la forme de votre choix.
- 3) En s'aidant de la production des anticorps montrée sur le doc.3, expliquer les résultats attendus et les résultats obtenus chez les quatre individus.
 - Faire le lien entre résultats attendus et la courbe du manuel (il est judicieux de reproduire une courbe semblable en y reportant les résultats W15, W90,)
 - Idem en ce qui concerne les résultats obtenus
 - Expliquez sous forme de schémas, les associations moléculaires présentes dans les puits en fin de test.

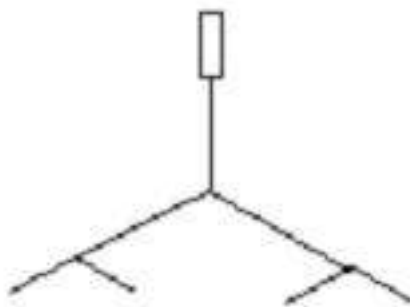
Schémas permettant la réalisation du schéma explicatif à l'échelle moléculaire



Ac secondaire



Substrat



Ac



Ag

Test ELISA : dosage d'un anticorps chez 4 individus : W, X, Y & Z

Cette série permet de doser la concentration d'anticorps par comparaison avec une gamme étalon (autre groupe de travail).

Avant de commencer : repérer les différentes solutions disponibles ainsi que la poubelle à cônes et apprendre le fonctionnement la micropipette.

Opérations	Puits								Remarques
	1	2	3	4	5	6	7	8	
COATING	Fixation et lavage déjà réalisés								FIXATION DE L'ANTIGÈNE (PAR EFFET ÉLECTROSTATIQUE) À L'INTÉRIEUR DES PUIITS.
OPÉRATION 1 : dépôt des anticorps sériques	W15 80 µL	X15 80 µL	Y15 80 µL	Z15 80	W90 80 µL	X90 80 µL	Y90 80 µL	Z90 80 µL	WILLY, XAVIER, YANNIS ET ZOÉ = 4 INDIVIDUS DIFFÉRENTS W15 = sérum prélevé au temps T _{15j} ; W90 = sérum prélevé au temps T _{90j} NB : ANTICORPS SÉRIQUES = ANTICORPS DU SÉRUM). ATTENTION : il faut changer le cône de la micropipette pour chaque nouvelle solution. Incuber 15 minutes à température ambiante (laisser sur la paillasse).
OPÉRATION 2 : lavage (Tampon PBS-Tween)	Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant. Remplir totalement les puits utilisés avec du tampon PBS-Tween . Recommencer 2 fois les opérations (vider, sécher, remplir de tampon PBS-Tween). Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant.								LE BUT EST D'ÉLIMINER TOUT ANTICORPS NON LIÉ À L'ANTIGÈNE QUI TAPISSE LES PUIITS. Utiliser la pipette en plastique.
Opération 3 : fixation de l'anticorps de détection	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	L'ANTICORPS DE DÉTECTION EST COUPLÉ À UNE ENZYME (ICI LA PEROXYDASE). IL SE FIXE SPÉCIFIQUEMENT AUX ANTICORPS SÉRIQUES DÉPOSÉS DANS L'OPÉRATION 1 (= ANTICORPS "ANTI-ANTICORPS SÉRIQUES"). Changer le cône qui pourra être utilisé pour tous les puits (solution identique) Incuber 15 minutes à température ambiante sur la paillasse.
OPÉRATION 4 : lavage (Tampon PBS-Tween)	Procéder de la même manière qu'à l'opération 2.								L'OPÉRATION A POUR BUT D'ÉLIMINER LES ANTICORPS DE DÉTECTION NON FIXÉS AUX ANTICORPS SÉRIQUES. Utiliser la pipette en plastique.
OPÉRATION 5 : révélation (substrat = TMB)	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	LE SUBSTRAT (TMB = TÉTRA-MÉTHYL-BENZIDINE) SE COLORE EN PRÉSENCE DE LA PEROXYDASE. L'INTENSITÉ DE LA COLORATION EST PROPORTIONNELLE À LA QUANTITÉ DE PEROXYDASE, DONC PROPORTIONNELLE À LA CONCENTRATION D'ANTICORPS SÉRIQUES. Changer le cône qui pourra ensuite être utilisé pour les puits (solution identique). Lecture immédiate à température ambiante. Prendre une photo.

Test ELISA : gamme étalon

Cette série permet de doser la concentration des anticorps dans les sérums à tester (autre groupe de travail).

Avant de commencer : repérer les différentes solutions disponibles ainsi que la poubelle à cônes et apprendre le fonctionnement la micropipette.

Opérations	Puits								Remarques
	1	2	3	4	5	6	7	8	
COATING	Fixation et lavage déjà réalisés								FIXATION DE L'ANTIGÈNE (PAR EFFET ÉLECTROSTATIQUE) À L'INTÉRIEUR DES PUIITS.
OPÉRATION 1 : dépôt des anticorps sériques	C 1 17 µg.mL ⁻¹ 80 µL	C 2 4,25 µg.mL ⁻¹ 80 µL	C 3 1,063 µg.mL ⁻¹ 80 µL	C 4 0,266 µg.mL ⁻¹ 80 µL	C 5 0,066µg. mL ⁻¹ 80 µL	C 6 0,0166 µg.mL ⁻¹ 80 µL	C 7 0,0041 µg.mL ⁻¹ 80 µL	C 8 0,0010 µg.mL ⁻¹ 80 µL	ON UTILISE ICI DES SÉRUMS QUI CONTIENNENT LES ANTICORPS À DES CONCENTRATIONS CONNUES (NB : ANTICORPS SÉRIQUES = ANTICORPS DU SÉRUM). ATTENTION : pour ne pas changer le cône de la micropipette à chaque nouvelle solution, il faut impérativement commencer par la solution C 8 (la plus diluée). Incuber 15 minutes à température ambiante (laisser sur la paillasse).
OPÉRATION 2 : lavage (Tampon PBS-Tween)	Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant. Remplir totalement les puits utilisés avec du tampon PBS-Tween . Recommencer 2 fois les opérations (vider, sécher, remplir de tampon PBS-Tween). Vider les puits en les retournant énergiquement dans l'évier. Sécher en tapotant la barrette renversée sur du papier absorbant.								LE BUT EST D'ÉLIMINER TOUT ANTICORPS NON LIÉ À L'ANTIGÈNE QUI TAPISSE LES PUIITS. Utiliser la pipette en plastique.
Opération 3 : fixation de l'anticorps de détection	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	L'ANTICORPS DE DÉTECTION EST COUPLÉ À UNE ENZYME (ICI LA PEROXYDASE). IL SE FIXE SPÉCIFIQUEMENT AUX ANTICORPS SÉRIQUES DÉPOSÉS DANS L'OPÉRATION 1 (= ANTICORPS "ANTI-ANTICORPS SÉRIQUES"). Changer le cône qui pourra être utilisé pour tous les puits (solution identique) Incuber 15 minutes à température ambiante sur la paillasse.
OPÉRATION 4 : lavage (Tampon PBS-Tween)	Procéder de la même manière qu'à l'opération 2.								L'OPÉRATION A POUR BUT D'ÉLIMINER LES ANTICORPS DE DÉTECTION NON FIXÉS AUX ANTICORPS SÉRIQUES. Utiliser la pipette en plastique.
OPÉRATION 5 : révélation (substrat = TMB)	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	80 µL	LE SUBSTRAT (TMB = TÉTRA-MÉTHYL-BENZIDINE) SE COLORE EN PRÉSENCE DE LA PEROXYDASE. L'INTENSITÉ DE LA COLORATION EST PROPORTIONNELLE À LA QUANTITÉ DE PEROXYDASE, DONC PROPORTIONNELLE À LA CONCENTRATION D'ANTICORPS SÉRIQUES. Changer le cône qui pourra ensuite être utilisé pour les puits (solution identique). Lecture immédiate à température ambiante. Prendre une photo.

Capacités testées	Critères d'évaluation	Barème			
		A	B	C	D
Réaliser une manipulation selon un protocole	respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse				
Traduire des informations par un schéma	Associations moléculaires correctes pour chaque puits				
Communiquer	Présentation claire des résultats Résultats obtenus et attendus positionnés sur la courbe				
Adopter une démarche explicative	Résultats obtenus expliqués Résultats attendus expliqués				
		Total			

Capacités testées	Critères d'évaluation	Barème			
		A	B	C	D
Réaliser une manipulation selon un protocole	respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse				
Traduire des informations par un schéma	Associations moléculaires correctes pour chaque puits				
Communiquer	Présentation claire des résultats Résultats obtenus et attendus positionnés sur la courbe				
Adopter une démarche explicative	Résultats obtenus expliqués Résultats attendus expliqués				
		Total			

Capacités testées	Critères d'évaluation	Barème			
		A	B	C	D
Réaliser une manipulation selon un protocole	respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse				
Traduire des informations par un schéma	Associations moléculaires correctes pour chaque puits				
Communiquer	Présentation claire des résultats Résultats obtenus et attendus positionnés sur la courbe				
Adopter une démarche explicative	Résultats obtenus expliqués Résultats attendus expliqués				
		Total			

Capacités testées	Critères d'évaluation	Barème			
		A	B	C	D
Réaliser une manipulation selon un protocole	respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse				
Traduire des informations par un schéma	Associations moléculaires correctes pour chaque puits				
Communiquer	Présentation claire des résultats Résultats obtenus et attendus positionnés sur la courbe				
Adopter une démarche explicative	Résultats obtenus expliqués Résultats attendus expliqués				
		Total			