



# **Biotechnology Explorer™**

## **Kit ELISA Immuno Explorer™**

**Manuel d'instructions**

**Ref. catalogue 166-2400EDU**

**<http://explorer.bio-rad.fr>**

**Les éléments de ce kit sont expédiés dans des emballages séparés. Placez le sac contenant les réactifs au réfrigérateur dans la semaine suivant la réception.  
Remarque : ce kit ne contient aucune substance d'origine humaine ou pathogène.**

**La duplication de toute partie de ce document est autorisée uniquement pour une utilisation en salle de cours.**



---

Pour le service technique, composez le 01.47.95.69.64

## A l'attention de l'enseignant

L'immunologie est la science qui étudie le système immunitaire et sa mise en action contre des virus, micro-organismes, molécules ou cellules, que la propriété de faire réagir le système immunitaire conduit à désigner comme étant des antigènes. Le plus souvent, les antigènes sont susceptibles de provoquer des maladies et sont donc pathogènes.

Chez les mammifères, les plasmocytes issus de la différenciation des lymphocytes B produisent des molécules appelées anticorps qui reconnaissent les antigènes avec une très grande spécificité. Les anticorps se fixent sur les antigènes au niveau de sites moléculaires précis (appelés épitopes ou déterminants antigéniques) et conduisent à la formation de complexes immuns. La formation de ces complexes immuns permet, notamment grâce à l'intervention de cellules phagocytaires, la destruction de l'antigène.

Par ailleurs, les anticorps sont devenus des outils précieux en biotechnologie : ils sont utilisés en recherche ainsi que pour le diagnostic et le traitement de maladie.

Dans la partie consacrée à l'immunologie du programme de Terminale S, la réalisation d'un test de type Elisa figure parmi les activités envisageables pour construire la notion de séropositivité. Ce kit, très facile d'emploi, et particulièrement fiable, permet de faire réaliser aux élèves toutes les étapes d'un test Elisa depuis la fixation des antigènes dans les cupules jusqu'à la lecture des résultats, et ceci dans un délai tout à fait compatible avec la durée de la séance de TP.

### Qu'est-ce qu'ELISA ?

ELISA est l'acronyme de « enzyme-linked immunosorbent assay ». Ce puissant test, basé sur les anticorps, est utilisé pour diagnostiquer les maladies telles que le Sida et le SRAS et pour rechercher les agents pathogènes dans l'eau, les aliments et l'air, que ces derniers émergent naturellement ou par le biais d'actes d'agression. ELISA est également utilisé pour identifier les organismes génétiquement modifiés (OGM), pour tracer des allergènes alimentaires et des marqueurs moléculaires de grossesse et de consommation de drogues.

Ce kit permet d'adopter trois approches d'ELISA (voir page 4). Le kit comporte des guides d'instructions pour chacune des approches. L'enseignant ou les élèves peuvent sélectionner le protocole de test le plus pertinent pour le travail qui les intéresse.

Vous pouvez télécharger la totalité de ce manuel d'instruction sur Internet. Visitez notre site [explorer.bio-rad.com](http://explorer.bio-rad.com) ou contactez-nous au numéro suivant 01.47.95.69.65.

Nous cherchons continuellement à améliorer nos programmes et nos produits. Vos commentaires, idées et suggestions seront les bienvenus !

Avec nos meilleurs sentiments,  
L'équipe Bio-Education  
Bio-Rad division Bio-Recherche  
3, bd Raymond Poincaré  
92430 Marnes-la-Coquette

## SOMMAIRE

|  | Page      |
|--|-----------|
| Liste de contrôle du contenu du Kit .....                                  | 3         |
| Fonctionnement de ce kit .....   | 4         |
| Description pas à pas d'ELISA.....   | 6         |
| Présentation générale de ce kit ELISA .....                                | 7         |
| Guerre biologique et ELISA.....  | 11        |
| <b>Protocole I : ELISA pour dépister les épidémies .....</b>               | <b>13</b> |
| Guide de l'enseignant.....   | 14        |
| Présentation générale du TP .....  | 15        |
| Préparation du TP.....   | 17        |
| Liste de contrôle des postes de travail .....                              | 19        |
| Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion ..... | 20        |
| Mode opératoire du TP.....   | 23        |
| <b>Protocole II : Détection des antigènes avec ELISA.....</b>              | <b>26</b> |
| Guide de l'enseignant .....  | 27        |
| Présentation générale du TP .....  | 28        |
| Préparation du TP .....  | 29        |
| Liste de contrôle des postes de travail .....                              | 31        |
| Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion ..... | 32        |
| Mode opératoire du TP.....   | 34        |
| <b>Protocole III : Test des anticorps avec ELISA .....</b>                 | <b>36</b> |
| Guide de l'enseignant .....  | 37        |
| Présentation générale du TP .....  | 38        |
| Préparation du TP .....  | 39        |
| Liste de contrôle des postes de travail .....                              | 41        |
| Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion ..... | 42        |
| Mode opératoire du TP.....   | 45        |

## Liste de contrôle du contenu du Kit

Cette rubrique répertorie les composants fournis dans le kit ELISA. Elle répertorie également les accessoires nécessaires et ceux en option. Chaque kit contient suffisamment de matériel pour équiper 12 postes de travail, avec jusqu'à quatre élèves par poste. Servez-vous de cette liste de contrôle pour répertorier les fournitures avant de commencer votre préparation.

| <b>Contenu du kit</b>  | <b>Nombre/Kit</b>                | <b>(√)</b>               |
|--|----------------------------------|--------------------------|
| Antigène (gamma-globuline de poulet), lyophilisé   | 1 flacon                         | <input type="checkbox"/> |
| Anticorps primaires (anticorps polyclonaux de lapin-anti-poulet), lyophilisés                                  | 1 flacon                         | <input type="checkbox"/> |
| Anticorps secondaires (anticorps de chèvre anti-lapin conjugués à la peroxydase de raifort (HRP)), lyophilisés | 1 flacon                         | <input type="checkbox"/> |
| Substrat enzyme HRP (TMB)  | 1 bouteille                      | <input type="checkbox"/> |
| Soluté physiologique tamponné par les phosphates 10x (PBS)   | 1 bouteille                      | <input type="checkbox"/> |
| Tween 20 10%   | 1 bouteille                      | <input type="checkbox"/> |
| Pipettes de transfert en plastique jetables  | 80                               | <input type="checkbox"/> |
| Bouteilles et bouchons, 30 ml  | 3                                | <input type="checkbox"/> |
| Microplaque avec bande de 12 puits   | 3 plaques de 8 bandes x 12 puits | <input type="checkbox"/> |
| Tubes jaunes, 2 ml   | 1 sachet                         | <input type="checkbox"/> |
| Tubes colorés, 2 ml (15 verts, bleus, orange, violets et bruns)  | 1 sachet                         | <input type="checkbox"/> |
| <b>Accessoires requis</b>  | <b>Nombre/Kit</b>                | <b>(√)</b>               |
| Micropipettes à volume fixe 50 µl (N°166-0515EDU)<br>ou micropipettes réglables 20 à 200 µl (N°166-0507EDU)    | 12                               | <input type="checkbox"/> |
| Cônes (N°223-9035EDU)  | 150                              | <input type="checkbox"/> |
| Serviettes en papier   | 4 rouleaux ou paquets            | <input type="checkbox"/> |
| Béchers 100 à 200 ml   | 12                               | <input type="checkbox"/> |
| Marqueurs noirs  | 12                               | <input type="checkbox"/> |
| Eprouvette graduée 100 ml  | 1                                | <input type="checkbox"/> |
| Eprouvette graduée 1 l   | 1                                | <input type="checkbox"/> |
| Eau distillée  | 1 l                              | <input type="checkbox"/> |
| <b>Accessoires en option</b>   | <b>Quantité par Kit</b>          | <b>(√)</b>               |
| Lecteur de microplaques (N°168-1002EDU)  | 1                                | <input type="checkbox"/> |
| Racks de tubes   | 12                               | <input type="checkbox"/> |

### Les recharges sont disponibles séparément

Ensemble de recharge de réactifs du kit ELISA (comporte antigènes, anticorps primaires, anticorps secondaires, soluté physiologique tamponné par les phosphates 10x, Tween 20 10% et substrat enzyme HRP), Ref. catalogue 166-2401EDU.

Substrat enzyme HRP, Ref. catalogue 166-2402EDU

soluté physiologique 10x tamponné par les phosphates, 100 ml, Ref. catalogue 166-2403EDU

Tween 20 10%, 5 ml, Ref. catalogue 166-2404EDU

Microplaques avec bandes de 12 puits, 3 plaques de 8 bandes x 12 puits, Ref. catalogue 166-2405EDU

## Fonctionnement de ce kit

Ce kit vous apporte la souplesse permettant d'effectuer avec vos élèves trois différents types de protocoles basés sur ELISA.

|  | Type d'ELISA  | Application dans le monde réel   |
|--|---|--|
| <b>Protocole I</b><br><i>Pages 13 à 24</i>   | <b>ELISA pour dépister les épidémies</b><br><br>Étape 1 : échange en salle de classe de liquides organiques simulés<br><br>Étape 2 : TP ELISA<br><br>Étape 3 : dépistage de la transmission de la maladie | Virus VIH, SRAS et West Nile, rhume banal, choléra, variole, anthrax, grippe et MST  |
| <b>Protocole II</b><br><i>Pages 26 à 35</i>  | <b>ELISA pour détecter des antigènes</b><br><br>ELISA pour détecter les antigènes spécifiques dans un échantillon   | Grossesse, drogues, OGM et tests allergènes<br>Test de l'air, des aliments et de l'eau<br>VIH, variole, virus du West Nile et SRAS |
| <b>Protocole III</b><br><i>Pages 36 à 46</i> | <b>Test anticorps ELISA</b><br>ELISA pour diagnostiquer l'exposition à une maladie en testant la présence des anticorps des maladies dans un échantillon de sang simulé.                                  | VIH, maladie de Lyme, trichinose, virus West Nile et SRAS  |

### Protocole I : ELISA pour dépister les épidémies

Engagez totalement vos élèves avant d'effectuer la détection d'antigènes ELISA ou le test d'anticorps ELISA. Dans cette approche interactive, les élèves suivent la progression d'un agent pathogène simulé dans leur classe, ce qui leur permet d'avoir une vision réaliste de la propagation d'une maladie contagieuse au sein d'une population. Les élèves échangent des « liquides organiques » simulés (in vitro), un ou deux élèves y sont infectés au hasard. Ils effectuent ensuite un test ELISA sur les échantillons partagés résultants et utilisent leurs résultats pour dépister la progression de la maladie dans la classe. Cette activité est conçue pour générer une discussion supplémentaire sur les problèmes de santé et d'épidémiologie. Les maladies topiques qui fonctionnent bien avec le protocole de dépistage sont, notamment : le SRAS, le virus West Nile, le VIH/ le SIDA, les rhumes, la variole, l'anthrax, la grippe et les MST (maladies sexuellement transmissibles). En tant qu'enseignant, vous pouvez déterminer le contexte le plus approprié à votre leçon et à vos élèves.

### Protocole II : ELISA pour détecter des antigènes

Test de la présence d'un antigène avec un échantillon défini. Ce protocole peut être utilisé pour discuter de la manière dont ELISA peut détecter des agents pathogènes dans les échantillons tels que des liquides organiques (avant que le corps n'ait eu la possibilité de monter une réponse immunitaire détectable). La variole est l'un des grands exemples. Si elle est détectée et traitée avec le vaccin dans les 2 à 3 jours suivant l'exposition, les patients ne développent pas la variole. Alternativement, cette approche peut être utilisée pour discuter d'un ELISA non basé sur une maladie, comme les tests de grossesse, la détection de la présence de drogues, la contamination de l'air ou de l'eau ou la détection de la présence d'organismes pathogènes ou génétiquement modifiés (OGM) dans les aliments.

### **Protocole III : test anticorps ELISA**

Le protocole proposé est celui qui correspond à la démarche du programme de Terminale S.

Il s'agit d'utiliser le test ELISA dans l'objectif du diagnostic d'une maladie.

Ce diagnostic s'applique à un certain nombre de maladies (VIH, maladie de Lyme, trichinose, virus West Nile et SRAS)

On teste la présence d'anticorps spécifiques d'antigènes de maladies dans un échantillon de sérum de patient (échantillon simulé). Ce protocole peut être utilisé pour détecter et diagnostiquer une infection lorsque l'antigène n'est pas détectable et, qu'à la suite d'une réponse immunitaire, les anticorps sont apparus dans le sérum sanguin. Le test du SIDA/VIH est un exemple classique. Récemment encore, les tests étaient limités à la détection ELISA des anticorps au virus plutôt qu'à la détection directe du virus lui-même. Le corps produit des anticorps à un niveau suffisamment élevé pour qu'ils soient détectés par ELISA, bien avant que le virus VIH ne se réplique à un niveau permettant sa détection.

### **Comment choisir ?**

Nous proposons un manuel séparé pour chaque protocole. L'enseignant ou les élèves peuvent sélectionner le test de diagnostic le plus pertinent pour le cours en question. Les trois activités reflètent une connaissance en profondeur croissante du sujet du Protocole I, qui propose une approche d'introduction large aux problèmes d'immunologie et de santé, au Protocole III, qui permet de creuser en profondeur les mécanismes biologiques du système immunitaire. Vous remarquerez que des manuels séparés pour chaque protocole étant fournis, certaines informations se répètent dans chacun d'eux.

Les trois protocoles sont des variations sur le même thème. Mais chaque approche place les applications d'ELISA, dans le monde réel, dans différents contextes.

Une fois que vous avez choisi, lisez les pages 6 à 11 puis passez au manuel pour le protocole que vous avez choisi :

|                 |                                   |         |
|-----------------|-----------------------------------|---------|
| Protocole I :   | ELISA pour dépister les épidémies | page 13 |
| Protocole II :  | ELISA pour détecter des antigènes | page 26 |
| Protocole III : | Test des anticorps ELISA          | page 36 |

### **Remarque importante pour la préparation des travaux pratiques en laboratoire par l'enseignant**

Avant de commencer la préparation de cette activité, sélectionnez le protocole à utiliser ainsi qu'un scénario. Veuillez vous assurer que vous suivez la bonne préparation pour le protocole que vous avez retenu. La préparation du TP varie de manière subtile pour chacun des trois protocoles.

## Description pas à pas d'ELISA

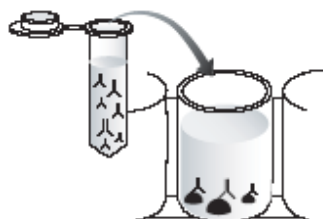
Les protocoles du kit s'appuient sur la capture indirecte des anticorps par ELISA. Les étapes de ce dosage sont les suivantes :

**Étape 1 : l'antigène** est ajouté aux puits de la bande de microplaques et on laisse incuber pour permettre la fixation au fond des puits des molécules d'antigène, après quoi les antigènes non liés sont évacués des puits par lavage avec du détergent. Le détergent sert également d'agent de blocage, il bloque en effet tous les sites de lien de protéines non utilisés dans les puits et empêchant ainsi un lien non spécifique de l'anticorps.



**Étape 2 : une solution d'anticorps primaires** est ajoutée aux puits et incubée pour permettre à l'anticorps spécifique de se lier à l'antigène. Ensuite, l'anticorps primaire non lié est évacué des puits par lavage.

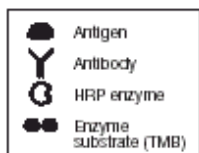
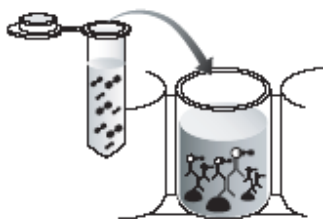
Remarque : si la solution ne contient pas d'anticorps spécifiques de l'antigène, aucun anticorps ne se fixe.



**Étape 3 : une solution d'anticorps secondaires liés à une enzyme** est ajoutée aux puits et incubée pour permettre à l'anticorps secondaire de se lier à l'anticorps primaire. Ensuite, l'anticorps secondaire non lié est évacué des puits par lavage.



**Étape 4 : un substrat d'enzyme chromogène (pouvant se transformer en un produit coloré)** est ajouté aux puits et incubé pour permettre à la couleur d'apparaître. On évalue les résultats du dosage. Les puits qui restent incolores sont négatifs et les puits qui virent au bleu sont positifs.



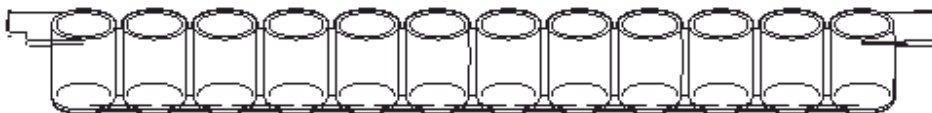
Antigen  
Antibody  
HRP enzyme  
Enzyme substrate (TMB)

Antigène  
Anticorps  
Enzyme HRP  
Substrat enzymatique (TMB)

## Présentation générale de ce kit ELISA

La rubrique suivante décrit brièvement les points techniques et conceptuels qui sont directement liés aux activités de laboratoire de ce programme. Il est extrêmement important pour le succès de l'expérience que l'élève comprenne bien ces points.

**Bandes de microplaques :** les microplaques sont réalisées en polystyrène qui absorbe les protéines (bloque) par interaction hydrophobe. Les plaques fournies dans ce kit ont 96 puits, elles sont organisées en 8 rangées individuelles de bandes de 12 puits. Chaque puits contient environ 250 microlitres ( $\mu$ l).



**Antigène :** dans ce kit, l'antigène est de la gammaglobuline de poulet (purifiée à partir de jaunes d'oeufs) qui sert de représentatif générique de tout antigène, protéine hypothétiques ou autres.

**Durées d'incubation :** la vitesse à laquelle intervient le blocage dépend de la température d'incubation et des concentrations des réactifs. Ce kit a été optimisé de sorte que chaque incubation puisse être effectuée en 5 minutes à température ambiante. Au-delà de ce délai ou de la température, on aura une augmentation d'intensité de couleur et éventuellement une certaine couleur de fond dans les contrôles négatifs.

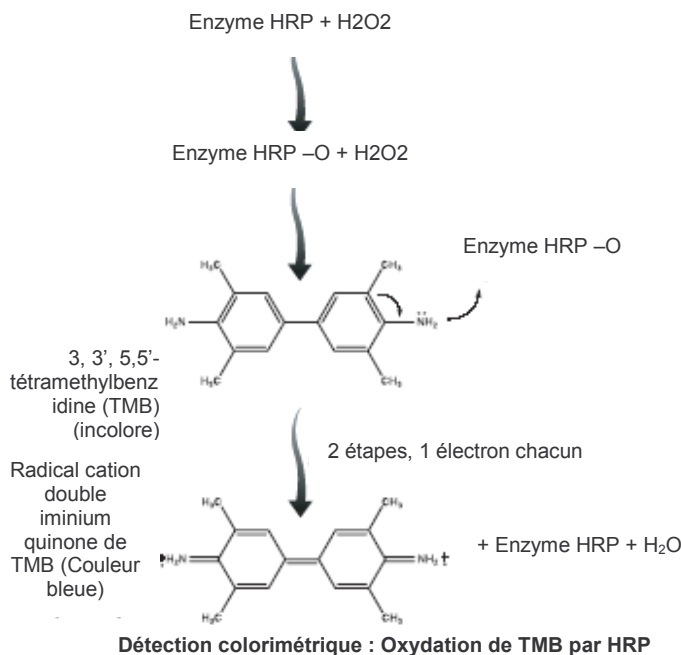
**Blocage :** des agents de blocage sont ajoutés après l'absorption des protéines (antigènes) pour éviter le blocage non spécifique des anticorps sur le plastique, ce qui produirait de faux résultats positifs. L'agent de blocage peut être une protéine ou un détergent (ou les deux). L'agent de blocage utilisé ici est un détergent non ionique :le Tween 20.

**Anticorps primaires (1°) :** les anticorps qui reconnaissent et bloquent l'antigène dans un immunoessai sont des anticorps primaires. Dans ce kit, l'anticorps primaire est un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre de la gamma globuline de poulet. Cet anticorps primaire simule les anticorps humains d'un échantillon de sérum humain.

**Anticorps secondaires (2°) :** les anticorps secondaires reconnaissent et bloquent les anticorps primaires. Ils sont produits par des animaux d'une espèce différente de celle utilisée pour réaliser l'anticorps primaire. Pour ce kit des chèvres ont été immunisées avec de l'IgG de lapin pour obtenir des anticorps secondaires.



**Détection colorimétrique :** les anticorps secondaires pour ELISA sont liés à des enzymes. La détection des anticorps secondaires qui sont liés aux anticorps primaires intervient par une réaction enzyme-substrat. Dans ce kit l'anticorps secondaire est lié à la peroxydase de raifort (HRP). En la présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'HRP catalyse l'oxydation du substrat chromogène 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB). Cette oxydation du TMB par le HRP forme un produit bleu. Remarque : le TMB est sensible à la lumière et les résultats du dosage doivent être déterminés 5 à 10 minutes après que le substrat ait été ajouté aux puits. Au-delà de cette durée, une couleur non-spécifique peut se développer. La couleur qui se développe après une incubation de 5 minutes ne doit pas être prise en compte dans les résultats du dosage. Après 20 à 30 minutes, la couleur bleue peut commencer à s'estomper au fur et à mesure que le TMB se précipite dans la solution.



**Témoins :** les témoins sont toujours effectués parallèlement aux échantillons réels pour s'assurer que la procédure fonctionne correctement. Les témoins peuvent permettre de résoudre des résultats ambigus dus à une erreur de l'expérimentateur ou à la contamination de réactifs ; tout ELISA valide doit inclure des témoins. Dans le témoin négatif, il n'y a pas d'anticorps primaire contrairement au témoin positif.

Un échantillon négatif qui donne un résultat de dosage positif est appelé un **faux positif**. Un échantillon positif qui donne un résultat de dosage négatif est appelé un **faux négatif**.

De nombreux dosages de diagnostic donnent un pourcentage de résultats faux positifs ou faux négatifs, de sorte qu'il est important de confirmer les diagnostics par un second type de dosage. Par exemple, des immunoessais pour les anticorps au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peut donner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs. Les faux positifs peuvent être le résultat de vaccinations antérieures et les faux négatifs peuvent résulter d'une immunosuppression (par ex., à partir de médicaments administrés après des transplants) ou sont dus au fait que le test a été administré trop tôt après l'infection par le VIH. (Il faut attendre plusieurs semaines pour que les anticorps contre le VIH apparaissent après une contamination par le VIH ; l'apparition d'anticorps spécifiques est appelée séroconversion). C'est pourquoi on confirme toujours des résultats ELISA HIV positifs en effectuant un autre test (de type western-blot).

Dans un ELISA comme ceux des Protocoles I et II (où la concentration d'antigènes est la variable expérimentale), des puits sans antigènes constitueraient un témoin négatif approprié. Tout produit de couleur dans ces puits serait le résultat soit d'un 1) blocage non-spécifique des anticorps secondaires ou 2) d'une erreur expérimentale. Un témoin positif approprié serait un échantillon dont on sait qu'il contient de l'antigène. Dans un test d'anticorps ELISA tel que celui du Protocole III (où la concentration d'anticorps est la variable expérimentale), des puits sans anticorps primaire constitueraient un bon témoin négatif. Tout produit de couleur dans ces puits serait le résultat de 1) un blocage non-spécifique des anticorps secondaires ou 2) d'une erreur expérimentale. Un témoin positif approprié serait un échantillon dont on sait qu'il contient de l'anticorps primaire. Pour de nombreux ELISA cliniques, des solutions témoin sont fournies avec les kits vendus dans le commerce.

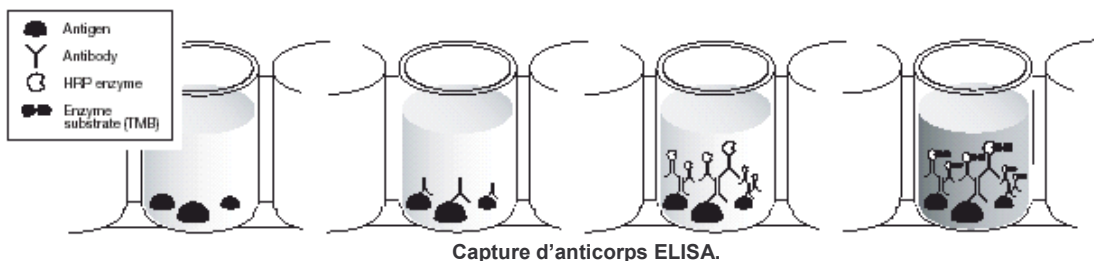
**Analyses des résultats :** un ELISA peut donner des informations qualitatives (oui ou non) ou quantitatives (combien ?). On peut déterminer les résultats qualitatifs visuellement sans utiliser d'instrumentation complexe. Les résultats quantitatifs peuvent être estimés visuellement et notés symboliquement, par ex. (++) pour un signal fort, (+) pour un signal faible, (+/-) pour un signal ambigu et (-) pour un signal non détectable. Pour une détermination précise des concentrations, il est nécessaire de disposer d'un lecteur de microplaques. Les lecteurs de microplaques quantifient l'absorption de lumière par le substrat coloré dans chaque puits de microplaques. Ils utilisent les puits témoins négatifs pour définir une ligne de base puis lisent l'absorption de chaque puits à une longueur d'onde spécifiée. Par exemple, l'absorbance de crête pour le TMB est à 655 nm. Les témoins ELISA quantitatifs incluent une série de dilutions de concentrations connues qui est utilisée pour créer une courbe standard. Cette courbe standard permet de quantifier la concentration d'antigènes dans un échantillon qui, à son tour, peut aider un chercheur, un clinicien ou un médecin à déterminer le niveau d'infection d'une maladie particulière.

Les tests ELISA sont effectués avec une telle fréquence dans les laboratoires de recherche et les laboratoires cliniques que les dosages de nombreux antigènes sont disponibles sous forme de kit. Le kit comporte normalement tous les composants et les témoins nécessaires pour un test donné, en dehors des échantillons expérimentaux. Par exemple, le groupe de Diagnostics cliniques de Bio-Rad produit plus de 100 kits qui sont utilisés pour détecter les maladies autoimmunes, les virus sanguins, les perturbations génétiques, les microorganismes, les toxines et l'encéphalopathie bovine spongiforme (BSE).



Un Kit ELISA en vente dans le commerce destiné à tester les anticorps du HIV-2, du Groupe de diagnostics cliniques de Bio-Rad.

Le kit Immuno Explorer ELISA de Bio-Rad démontre une méthode permettant de détecter la présence d'antigènes ou d'anticorps spécifiques dans une variété d'échantillons. Un certain nombre de procédés ELISA a été développé ; ils diffèrent essentiellement dans la séquence dans laquelle les antigènes et les anticorps sont ajoutés aux puits. Dans un dosage de **capture d'anticorps** (tel qu'utilisé dans ce kit), les antigènes sont bloqués dans les puits en plastique et l'anticorps primaire bloque (ou est capturé par) l'antigène immobilisé. L'anticorps secondaire est lié à l'enzyme, peroxydase de raifort (HRP), qui, en la présence de son substrat (TMB), fait virer la solution du dosage au bleu.



Capture d'anticorps ELISA.

Antigen  
Antibody  
HRP enzyme  
Enzyme substrate (TMB)

Antigène  
Anticorps  
Enzyme HRP  
Substrat enzymatique (TMB)

Dans un dosage de **capture d'antigène**, l'anticorps primaire est bloqué dans les puits en plastique, l'antigène est capturé par l'anticorps primaire immobilisé et l'antigène capturé est détecté par un anticorps secondaire, également lié à l'HRP, qui fait virer la solution du dosage au bleu.

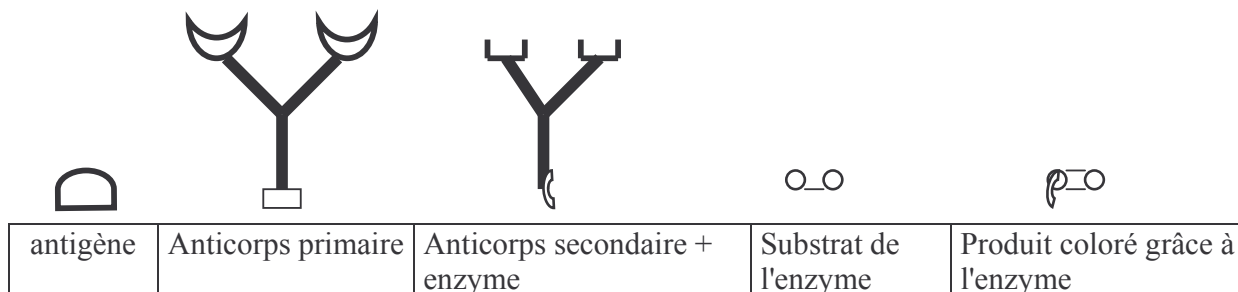


Capture d'antigène ELISA

### Pistes pour la construction d'un exercice

Dans l'exercice dans lequel s'intégrera la réalisation du protocole, on peut demander aux élèves

- de justifier l'utilisation de témoins positifs et négatifs
- de justifier les temps d'incubation
- de schématiser les résultats expérimentaux
- de représenter les interactions moléculaires dans chaque type de puits. Dans ce cas on peut proposer aux élèves une représentation schématique des différentes molécules mises en jeu (exemple de représentation)
- ...



## Applications d'ELISA dans le monde réel

Même si ELISA est un outil de diagnostic puissant dans le domaine de la médecine humaine, la technique est utilisée dans une grande variété d'autres domaines, notamment la médecine vétérinaire, les tests de produits alimentaires et l'agriculture. Vous trouverez ci-dessous quelques exemples :

| Domaines                         | Utilisations  |
|----------------------------------|---|
| Médecine humaine et vétérinaire  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Diagnostic d'une variété de maladies telles que le virus West Nile (chez l'Homme ou les animaux), le VIH, le SRAS, la maladie de Lyme, la trichinose, la tuberculose et de nombreuses autres en détectant les anticorps sériques.</li></ul>   |
| Vétérinaire                      | <ul style="list-style-type: none"><li>• Détecte les virus tel que le virus de la leucémie féline (FLV) et le virus de l'immunodéficience (FIV) chez les chats.</li><li>• Détecte les parasites tels que des dirofilaria immitis chez les chiens.</li><li>• Diagnostic de problèmes thyroïdiens chez les chiens et les chats en mesurant les concentrations de thyroxine sérique (t4).</li><li>• Diagnostic de l'encéphalite équine chez les chevaux en détectant les arbovirus.</li></ul>   |
| Agriculture : récoltes           | <ul style="list-style-type: none"><li>• Détecte des virus tels que le virus Y de la pomme de terre et le virus mosaïque du concombre dans les récoltes alimentaires.</li><li>• Détecte les mycotoxines dans les récoltes telles que l'aflatoxine dans les grains de céréales et les maïs.</li><li>• Détecte les virus dans les plantes décoratives, tels que le virus de la mosaïque jaune du haricot, dans les glaïeuls.</li><li>• Détecte la falsification de récoltes non modifiées génétiquement (non-OGM) avec des produits OGM, par ex., détection de la teneur en « Roundup Ready » et en Bt.</li></ul>  |
| Environnement                    | <ul style="list-style-type: none"><li>• Test de la qualité d'air intérieur, comme par ex, détection de toxines dues à la moisissure dans les bâtiments.</li></ul>   |
| Sécurité et qualité alimentaires | <ul style="list-style-type: none"><li>• Évite la transmission de l'encéphalite spongiforme bovine (maladie de la vache folle, BSE) en dépistant les tissus du système nerveux central dans la viande crue, dans les viandes traitées et cuisinées et sur les surfaces.</li><li>• Détermine si l'étiquetage alimentaire est correct, par exemple en vérifiant la présence de protéines de lait de vache dans les produits laitiers de chèvre ou la présence de blé non dur dans les produits à base de blé dur.</li><li>• Préviend les réactions allergiques en détectant les ingrédients qui ne figurent pas sur les étiquettes de contenu alimentaire par exemple, en détectant les arachides dans les produits dans lesquelles les arachides ne figurent pas comme ingrédients.</li></ul> |
| Autres :                         | <ul style="list-style-type: none"><li>• Détecte la consommation restreinte ou illégale de drogues, par ex., drogues améliorant les performances, marijuana, méthamphétamine, cocaïne, etc.</li><li>• Confirme la grossesse en détectant la gonadotropine (hCG) dans les urines humaines.</li></ul>  |

## Guerre biologique et ELISA

Nous estimons qu'il est important d'inclure un court traitement de la guerre biologique ; en effet, de nombreux enseignants estimeront qu'il est nécessaire de traiter ce sujet étant donné les préoccupations récentes relatives à ce phénomène.

La guerre biologique et le bioterrorisme ont souvent été à la une de l'actualité au cours des récentes années ; toutefois, l'utilisation d'agents biologiques pour nuire à un ennemi n'est pas un phénomène récent. Au sixième siècle avant Jésus Christ, les Assyriens empoisonnaient les puits de leurs ennemis avec de l'ergot de seigle et les Athéniens empoisonnaient l'eau de leurs ennemis avec du symplocarpe fétide (un purgatif). Au 18<sup>e</sup> siècle, il y eut plusieurs cas où l'on offrit aux Indiens des cadeaux volontairement contaminés avec la variole. Plus récemment, un déserteur bulgare fut tué à Londres avec de la ricine (une toxine du ricin) ; la toxine fut injectée dans sa jambe avec la pointe d'un parapluie alors qu'il attendait un bus. En 2001, aux États-Unis, des spores d'anthrax transformés en arme furent envoyés par courrier à des journaux et des services gouvernementaux.

Au cours d'une attaque biologique, la détection, le diagnostic et l'identification des agents biologiques et des maladies liées sont essentiels pour confiner la maladie. Les tests de diagnostic sont nécessaires pour identifier l'agent et pour déterminer qui a été infecté de sorte que ceux qui sont exposés puissent être soumis à un traitement et/ou mis en quarantaine. Par exemple, si une infection de variole est détectée dans les 2 à 3 jours, une vaccination post-exposition protège contre la maladie. Une vaccination dans les 4 à 5 jours suivant l'exposition peut empêcher une issue fatale. Toutefois le vaccin contre la variole en lui-même est associé à des risques et, par conséquent, la question se pose de savoir si seuls les individus contaminés doivent être traités.

Le CDC (Center for Disease Control) établit une priorité entre les agents biologiques en fonction de leur danger, principalement leur facilité de dissémination/transmission :

- Les agents ayant la plus haute priorité (Catégorie A) sont ceux qui sont facilement transmis, ont des taux de mortalité élevés et peuvent provoquer la panique publique. Des exemples d'agents à forte priorité comportent l'anthrax (*Bacillus anthracis*), le botulisme (toxine du *Clostridium botulinum*), la peste (*Yersinia pestis*), la variole (*Variola major*), la tularémie (*Francisella tularensis*), les fièvres hémorragiques virales [filovirus (par ex., Ebola et Marburg) et les arénavirus (par ex. Lassa et Machupo)].
- Les agents de seconde priorité (Catégorie B) sont ceux qui sont assez faciles à transmettre et ont un taux de mortalité moins élevé tels que la brucellose (*Brucella species*), la toxine epsilon du *Clostridium perfringens*, les menaces pour la sécurité alimentaire (par ex. *Salmonella species*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella*), la morve (*Burkholderia mallei*), la mélioidosis (*Burkholderia pseudomallei*), le psittacosis (*Chlamydia psittaci*), la fièvre Q (*Coxiella burnetii*), la toxine de ricin venant du ricin (*Ricinus communis*), l'entérotoxine staphylococcale B, la fièvre du typhus (*Rickettsia prowazekii*), l'encéphalite virale [alphavirus (par ex. encéphalite équine du Venezuela, encéphalite équine occidentale et encéphalite équine orientale)] et les menaces pour la sécurité de l'eau (par ex. *Vibrio cholerae* et *Cryptosporidium parvum*).
- Les agents à priorité inférieure (Catégorie C) sont des pathogènes émergents qui peuvent devenir une menace à l'avenir tel que le virus Nipah et le hantavirus.

Les diagnostics et l'identification des agents biologiques sont des éléments importants de la réponse à l'attaque biologique. La prévention de telles attaques ainsi que l'état d'alerte au cas où elles interviennent sont également importants, notamment l'utilisation de sources de renseignements pour prévenir les attaques de bioterrorisme, la formulation de plans d'urgence, l'établissement de méthodes de surveillance pour détecter les attaques, la formation de professionnels médicaux ou du personnel chargé de faire respecter la loi, la préparation des vaccins et de traitements, l'inoculation de populations si besoin, ainsi que l'éducation du public.



## Protocole I : ELISA pour dépister les épidémies

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Guide de l'enseignant .....</b>   | <b>14</b> |
| Présentation générale du TP .....  | 15        |
| Préparation du TP .....  | 17        |
| Liste de contrôle des postes de travail .....                              | 19        |
| Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion ..... | 20        |
| <b>Mode opératoire du TP destiné aux élèves.....</b>                       | <b>23</b> |

# Protocole I : ELISA pour dépister les épidémies

## Guide de l'enseignant

Cette activité interactive est conçue pour fournir un contexte pour la présentation d'une application topique du monde réel d'ELISA. Les élèves commencent par modéliser la propagation de la maladie dans une population en simulant le partage de « liquides organiques ». Chaque élève reçoit un échantillon à partager, dont un ou deux d'entre eux sont positifs pour l'agent pathogène. Une fois que les élèves ont partagé leur « liquide organique » simulé, ils effectuent un dosage des échantillons partagés en utilisant ELISA.

Les résultats ELISA des élèves révèlent qu'une partie importante de la classe donne désormais un résultat positif au test pour cette maladie ! Ceci entraîne une activité guidée, s'appuyant sur une enquête, pour déterminer comment la maladie s'est propagée au sein de la population. Les élèves étant directement impliqués dans les résultats, cette activité tend à captiver leur imagination et est particulièrement pertinente à la lumière de la maladie contagieuse qui est apparue il n'y a pas si longtemps, le SRAS.

De nombreuses autres maladies fonctionnent également avec ce protocole, y compris le virus West Nile, le VIH, les rhumes banaux, la grippe et les MST, pour n'en nommer que quelques uns. Une approche simple peut être de ne pas spécifier la maladie réelle pour une leçon générique.

**Remarque :** ce protocole a été établi pour démontrer comment la détection des antigènes avec ELISA peut être utilisée pour détecter une épidémie. Le protocole peut facilement être adapté pour simuler comment une maladie peut être dépistée en utilisant les tests d'anticorps ELISA pour détecter les anticorps d'une maladie particulière dans le sang.

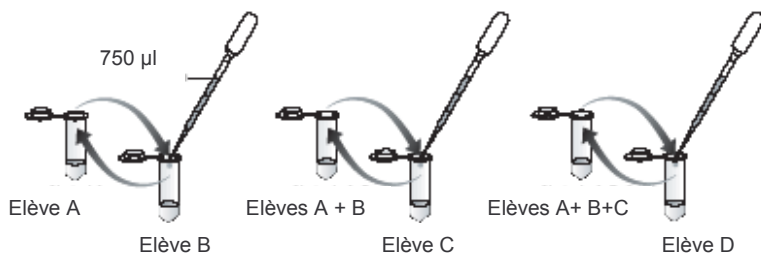
### Mise en œuvre - délai

|         |   |                       |
|---------|---|-----------------------|
| Leçon 1 | Préparation du TP                       | Cours et discussion   |
| Leçon 2 | Partage des liquides organiques simulés | TP ELISA              |
| Leçon 3 | Analyse des résultats ELISA             | Exercice de dépistage |



## Présentation générale du TP

**Étape 1 :** les élèves partagent leurs « liquides organiques » en mélangeant leur échantillon avec celui des autres élèves. Pour chaque paire d'élèves qui effectue le partage, chacun d'entre eux remporte la moitié de l'échantillon mélangé. Chaque élève répète le processus de partage avec un élève différent 1 ou 2 fois de plus (en fonction de la taille de la classe) et consigne les partenaires de partage. Remarque : pour s'assurer de la dissémination de la « maladie », le partage doit être effectué en deux ou trois rounds séparés.



**Étape 2 :** en utilisant une pipette, ajouter 50 µl de l'échantillon de chaque élève (inconnu) avec les témoins positifs et négatifs aux puits de la bande de microplaques et laisser incuber pendant 5 minutes, ce qui permet aux protéines de l'échantillon de se lier aux puits. Rincer les puits avec une solution tampon de lavage (PBST : soluté physiologique tamponné par les phosphates contenant 0,05% de Tween 20) qui bloque également les sites liant les protéines non occupés dans les puits.



**Étape 3 :** ajouter l'anticorps primaire (50 µl) à chaque puits et laisser incuber pendant 5 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire est un anticorps qui reconnaît et se lie à l'agent/antigène de la maladie. Rincer les puits avec le soluté physiologique pour retirer l'anticorps non lié.

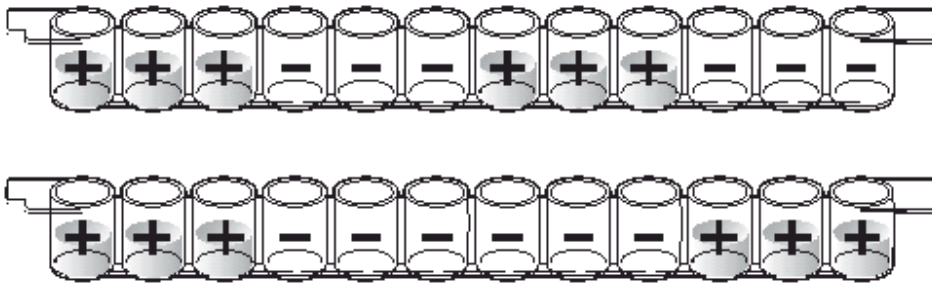


**Étape 4 :** ajouter de la peroxydase de raifort (HRP)-marquée anticorps secondaire (50 µl) à chaque puits et laisser incuber pendant 5 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire est un anticorps qui reconnaît et se lie à l'anticorps primaire. L'HRP est une enzyme qui oxydara un substrat produisant de la couleur. Rincer les puits avec la solution tampon de lavage pour retirer l'anticorps secondaire non lié.



**Étape 5 :** ajouter le substrat enzymatique (50 µl) à chaque puits ; les élèves surveillent l'évolution de la couleur. Si de l'HRP est présent (ce qui signifie que l'antigène était présent dans l'échantillon), la solution dans les puits vire au bleu dans les 5 minutes. En l'absence d'antigène dans l'échantillon, les puits restent incolores.





Résultats ELISA typiques.

### Utilisation des résultats ELISA des élèves pour dépister la maladie

Le nombre d'essais positifs dans les résultats de la classe dépend de la quantité d'échantillons positifs que vous avez libérés au début. Vous pouvez désormais dépister le progrès de la maladie dans votre classe.

Peut-être voulez-vous que les élèves élaborent une méthode pour remonter eux-mêmes à la source de la maladie. Demander à chaque élève d'écrire s'il a obtenu un résultat positif ou non au test, puis d'apposer un plus (+) à côté du nom des élèves avec qui il a partagé son échantillon si son ELISA a donné un résultat positif, ou un moins (-) à côté du nom des élèves avec qui il a partagé son échantillon si le résultat de son test a été négatif.

Par exemple, si Kiko a donné un résultat positif et a partagé avec Abraham, Florence et Mustafa, nous devons inscrire un « + » à côté du nom d'Abraham, de Florence et de Mustafa.

Les élèves qui ont des plus en regard de leur nom seront révélés en tant que sources précoces de l'infection.

Question : pourquoi est-ce que la classe ne pourra pas faire remonter l'infection à un seul étudiant ?

Réponse : lorsqu'un seul élève qui est la source primaire de l'infection partage en premier son échantillon avec un second élève, le second élève aura également des plus partout. Ceci est représentatif du type de problèmes auxquels sont confrontés les épidémiologistes dans le monde réel. Vous pouvez tourner ceci à votre avantage en demandant pourquoi les épidémiologistes examinent de nombreux facteurs lorsqu'ils dépistent des maladies, notamment la situation géographique des patients, leur historique et leurs comportements en plus du test de l'infection. Vous pouvez également faire effectuer par vos élèves une analyse plus détaillée impliquant le suivi de l'ordre dans lequel les échantillons ont été partagés et en déduisant si certains des élèves peuvent être éliminés du groupe d'élèves soupçonnés d'être la source de départ.

Les épidémiologistes disposent rarement des échantillons de patients avant le déclenchement de l'infection et ils peuvent rarement faire remonter une épidémie à une source unique. Toutefois vous avez l'avantage de tenir des archives des élèves qui ont reçu les échantillons infectés, ce qui pour l'exercice peut s'avérer utile. Alternativement, pour une approche plus anonyme, vous pouvez numéroter séquentiellement tous les échantillons des élèves et consigner les numéros des tubes qui sont « infectés ». La source peut être révélée à la fin de l'activité pour voir si elle coïncide avec l'analyse des données de vos élèves.

## Préparation du TP

Cette section est conçue pour vous aider à préparer efficacement cet exercice pratique. Nous vous recommandons de réhydrater et diluer l'antigène et l'anticorps primaire au maximum 3 jours avant le cours et l'anticorps secondaire moins de 24 heures avant le cours. Nous suggérons également d'utiliser de l'eau distillée stérile pour préparer la solution tampon PBS afin d'éviter de contaminer des agents réhydratés. Ces réactifs doivent être conservés dans de la glace ou dans le réfrigérateur s'ils ont été préparés plus de 4 heures avant le cours.

La chose la plus importante pour les élèves est de mettre les bons composants dans les puits de dosage, dans le bon ordre ; par conséquent, il est crucial pour la réussite du résultat, que les tubes soient clairement étiquetés et correctement codés par couleur.

### Objectifs

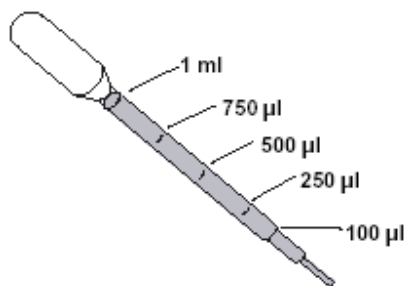
- Étape 1. Préparer des solutions tampon
- Étape 2. Réhydrater l'antigène lyophilisé, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire
- Étape 3. Diluer les réactifs
- Étape 4. Distribuer les réactifs aux postes de travail
- Étape 5. Préparer les postes de travail

**Temps nécessaire** 1 à 3 heures

**Remarque :** si vous envisagez d'utiliser ce kit pour plusieurs sessions de TP, sur une période de 1 ou 2 semaines, nous vous recommandons fortement d'utiliser de l'eau stérilisée pour préparer la solution tampon PBS afin d'éviter de contaminer les réactifs. (L'eau peut être stérilisée en la portant à ébullition dans un four à micro-ondes plus de 5 minutes dans une bouteille bouchée, sans trop serrer ; après avoir retiré la bouteille du four à micro-ondes, la laisser refroidir puis resserrer le bouchon). Diluer uniquement la quantité d'anticorps et d'antigènes nécessaire pour chaque séance de laboratoire. Les anticorps réhydratés sont des concentrats à 50x. Stocker les antigènes et anticorps concentrés restant dans le réfrigérateur à 4°C. Nous ne recommandons pas de stocker l'anticorps et l'antigène concentrés pendant plus de 2 semaines même à 4°C. Ne pas congeler les solutions.

### Mesures des volumes

Ce kit contient des pipettes de transferts en plastique jetables graduées à utiliser pour préparer certains réactifs lorsque des volumes entre 250 microlitres ( $\mu\text{l}$ ) et 5 millilitres (ml) sont nécessaires. Par ailleurs, des micro-pipettes à volume ajustable ou fixe sont nécessaires pour assurer des volumes de 50  $\mu\text{l}$ . L'illustration montre les graduations correspondant aux volumes à mesurer. Des volumes supérieurs à 1 ml exigeront des ajouts multiples. Pour chaque étape de la préparation du TP, utiliser une nouvelle pipette ou un nouveau cône.



Pour mesurer des liquides qui contiennent des détergents qui moussent (par ex., le tampon de lavage) vous devez lire le volume au niveau de l'interface entre le liquide et les bulles.

## Guide de préparation - déroulement pas à pas

Ces instructions sont destinées à préparer 12 postes de travail, chacun avec 4 élèves.

### Étape 1. Préparer les solutions tampon

Nous vous recommandons d'utiliser un cylindre gradué de 1 litre et un de 100 ml pour préparer les solutions tampons. Vous aurez également besoin d'1 litre d'eau distillée.

a. Préparer 100 ml de PBS 1x. Mesurer 90 ml d'eau distillée, ajouter 10 ml de PBS 10x et mélanger. Etiqueter le conteneur « PBS 1x ».

*Le PBS est utilisé pour réhydrater les trois composants lyophilisés en étape 2 et pour diluer l'ANTIGÈNE en étape 3.*

b. Préparer 900 ml de solution tampon de lavage. Mesurer 805 ml d'eau distillée, ajouter 90 ml de PBS 10x et 4,5 ml de Tween 20 10% et mélanger. Etiqueter le conteneur « solution tampon de lavage ».

*La solution tampon de lavage est utilisée pour diluer les ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES en étape 3.*

### Étape 2. Réhydrater l'antigène, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire lyophilisés.

a. Réhydrater les antigènes et les anticorps dans du PBS 1x. Retirer délicatement les bouchons des trois réactifs lyophilisés et utiliser une pipette pour ajouter 0,5 ml de **PBS 1x** à chacun. **(Utiliser une nouvelle pipette pour chacun.)** Remettre les bouchons et agiter pour mélanger. Ces solutions sont concentrées à 50x. **Remarque : à ce stade vous ne devez pas utiliser la solution tampon de lavage.**

### Étape 3. Diluer les réactifs.

a. Diluer l'antigène. Etiqueter une bouteille de 30 ml « Antigène 1x » et ajouter 7,5 ml de **PBS 1x** à la bouteille. Utiliser une micro-pipette pour ajouter 150 µl d'ANTIGÈNES réhydratés au PBS 1x. Fermer le bouchon et agiter pour mélanger. **Remarque : vous ne devez pas ajouter de solution tampon contenant du Tween 20 à l'antigène, sinon l'expérience ne fonctionnera pas.**

b. Diluer l'anticorps primaire. Etiqueter une bouteille de 30 ml « anticorps primaire 1x » et ajouter 24,5 ml de **solution tampon de lavage** dans la bouteille. Utiliser une nouvelle pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTICORPS PRIMAIRE réhydraté à la bouteille et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec une certaine quantité de réactif dilué pour s'assurer que la totalité de l'anticorps est utilisée. Fermer le bouchon et agitez pour mélanger.

c. Diluer l'anticorps secondaire. Diluer l'anticorps secondaire moins de 24 heures avant le démarrage du cours. Etiqueter une bouteille de 30 ml « anticorps secondaire 1x » et ajoutez 24,5 ml de **solution tampon de lavage** dans la bouteille. Utiliser une nouvelle pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTICORPS SECONDAIRE réhydraté à la bouteille et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec une certaine quantité de réactif dilué pour s'assurer que la totalité de l'anticorps est utilisée. Fermer le bouchon et agiter pour mélanger.

### Étape 4. Distribuer les réactifs aux postes de travail.

a. Distribuer les témoins positifs. Etiqueter 12 tubes violets avec « + » et ajouter à chacun 0,5 ml de solution d'antigène 1x.

b. Distribuer les témoins négatifs. Etiqueter 12 tubes bleus avec « - » et ajouter à chacun 0,5 ml de PBS 1x

c. Distribuer l'anticorps primaire. Etiqueter 12 tubes verts « A P » et ajouter à chacun 1,5 ml de solution d'anticorps primaire 1x.

d. Distribuer l'anticorps secondaire. Etiqueter 12 tubes orange « AS » et ajouter à chacun 1,5 ml de solution d'anticorps secondaire 1x.

e. Distribuer le substrat enzymatique. Etiqueter 12 tubes bruns « SUB » et ajouter 1,5 ml de substrat enzymatique HRP (TMB) à chacun. Remarque : le TMB est sensible à la lumière, il est donc important d'utiliser des tubes sombres pour stoker ce réactif.

f. Distribuer les échantillons infectés aux élèves. Le nombre d'élèves présents au cours déterminera le nombre d'échantillons « infectés » que vous mélangerez avec des échantillons

vierges. Pour un résultat où environ la moitié des élèves sont contaminés, nous vous recommandons de faire un échantillon infecté pour 16 élèves. (Remarque : si votre classe comporte moins de 10 élèves, utiliser un seul échantillon et effectuer simplement deux tours de partage.) Pour réaliser chaque échantillon infecté, ajoutez 100 µl de solution d'antigène 1x à 650 µl de PBS 1x dans un tube jaune et mélanger.

**Remarque : Vous ne devez pas ajouter de tampon contenant du Tween 20 à l'antigène, sinon l'expérience ne fonctionnera pas.** Vous pouvez vouloir séparer les échantillons infectés des échantillons vierges jusqu'au cours pour avoir une trace de ceux qui les reçoivent.

g. Distribuer les échantillons vierges aux élèves. Ajouter 0,75 ml de PBS 1x à suffisamment de tubes jaunes non étiquetés pour votre nombre d'élèves moins les échantillons « infectés ».

**Remarque : Vous devez utiliser du PBS 1x et non pas la solution de tampon de lavage pour les échantillons vierges de vos élèves, sinon l'expérience ne fonctionnera pas.**

h. \*(Option) Pour votre propre information, vous pouvez vouloir numéroter chaque tube d'échantillon d'élève (contaminé et vierge) de 1 à 48 et consigner quels tubes numérotés contiennent des échantillons contaminés (voir page 16).

## Étape 5. Préparer les postes de travail

### Liste de contrôle des postes de travail

Un poste de travail pour 4 élèves.

| Élément (étiquette)   | Contenu  | Numéro          | (√)                      |
|---|--|-----------------|--------------------------|
| Tube jaune  | Echantillons test des élèves (0.75 ml)                               | 4 (1 par élève) | <input type="checkbox"/> |
| Tube violet (+)   | Témoin positif (0,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube bleu (-)   | Témoin négatif (0,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube vert (AP)  | Anticorps primaire (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube orange (AS)  | Anticorps secondaire (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube brun (SUB)   | Substrat enzymatique (1.5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Bandes de micro-plaques à 12-puits  |  | 2               | <input type="checkbox"/> |
| Micro-pipettes à volume fixe 50 µl ou micro-pipettes ajustables 20 à 200 µl |  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Cônes jaunes  |  | 10 à 20         | <input type="checkbox"/> |
| Pipettes de transfert en plastique jetables                                 |  | 5               | <input type="checkbox"/> |
| Solution tampon de lavage 70 à 80 ml dans béccher                           | Soluté physiologique tamponné par les phosphates avec Tween 20 0,05% | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Pile de serviettes en papier  |  | 2               | <input type="checkbox"/> |
| Marqueur noir   |  | 1               | <input type="checkbox"/> |

**Remarque sur le protocole de partage :** vérifier que les élèves partagent leur « liquide organique » avec les élèves d'autres parties de la pièce et pas seulement avec leurs voisins. La meilleure manière de le faire est d'avoir un partage ordonné : dites aux élèves de partager avec une autre personne puis de revenir à leur poste de travail. Une fois que tous les élèves ont terminé le premier partage et sont revenus à leur place, demandez leur de partager avec un autre élève. Ici encore, une fois que les élèves ont terminé le second partage, dites-leur de partager avec un troisième élève.

**Points d'arrêt :** même si cette procédure est conçue pour s'intégrer dans la durée d'un seul cours, si vous désirez arrêter l'activité de travaux pratiques, vous pouvez vous arrêter après avoir partagé les liquides organiques et placé tous les réactifs dans le réfrigérateur pour une nuit à une température de 4°C. Alternativement, si vous voulez arrêter pendant le dosage ELISA, vous pouvez ajouter de la solution tampon de lavage aux puits de micro-plaques à tout stade après l'ajout d'antigènes et avant l'ajout de substrat enzymatique et placer les bandes de micro-plaques et tous les réactifs dans le réfrigérateur pour la nuit, à une température de 4°C.

## Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion

### Questions clefs avant la séance de TP

#### 1. Comment le système immunitaire nous protège-t-il des maladies ?

Le système immunitaire comporte des barrières physiques, telles que la peau et les membranes muqueuses qui empêchent les pathogènes de pénétrer dans le corps, et des réponses cellulaires, telles que la circulation des macrophages qui répondent aux intrus. Notre système immunitaire acquis monte une réponse d'anticorps spécifique lorsque notre corps est exposé à un intrus et nos cellules immunitaires attaquent l'intrus.

#### 2. Comment le médecin utilise-t-il la réponse immunitaire pour nous protéger des maladies ?

Les médecins utilisent la réponse immunitaire lorsqu'ils nous vaccinent contre certaines maladies. Notre système immunitaire mémorise les pathogènes auxquels nous avons été exposés et lors de l'exposition suivante aux pathogènes, notre système immunitaire les attaque plus rapidement et efficacement. Les médecins tirent parti de l'effet d'amorce en nous exposant aux pathogènes inactivés (organismes tués ou affaiblis, qui ne peuvent pas nous rendre malades) de sorte que si nous sommes exposés ultérieurement aux pathogènes actifs, notre corps montera une réponse d'anticorps puissante et immédiate, réduisant ou éliminant les risques d'être contaminés par la maladie.

#### 3. Pouvez-vous nous citer certains modes de propagation des maladies ?

| Maladies qui se propagent par :          | Exemples :   |
|--|--|
| Echange de liquides organiques           | • VIH, SRAS, virus Epstein-Barr (cause de la mononucléose), MST  |
| Ingestion d'aliments ou d'eau contaminés | • <i>E. coli</i> O157 : H7, prions qui provoquent la maladie de Creutzfeldt-Jakob et la maladie de la vache folle, protozoaires qui provoquent la lamblie, nématodes qui provoquent la trichinose          |
| Inhalation                               | • Virus qui provoquent la grippe, bactéries qui provoquent la tuberculose  |
| Vecteur de transfert                     | • Maladies véhiculées par les moustiques (malaria, virus du West Nile, fièvre de la dengue, fièvre jaune), maladies transportées par les tiques (maladie de Lyme, fièvre pourprée des Montagnes rocheuses) |

#### 4. Pouvez-vous nous donner un exemple de maladie qui s'attaque au système immunitaire de l'homme ?

Les maladies qui s'attaquent au système immunitaire de l'homme comportent les maladies auto-immunes (par ex. arthrite rhumatoïdale, lupus, asthme, eczéma, déficit immunitaire avec défaut d'expression des molécules HLA) et SIDA.

#### 5. Quels problèmes peuvent empêcher le système immunitaire de fonctionner correctement ?

Les problèmes du système immunitaire se subdivisent en trois catégories : hypersensibilité, immunodéficience et maladies auto-immunes. L'hypersensibilité intervient lorsque le système immunitaire réagit de manière trop violente à un antigène ; les réactions de l'hypersensibilité comportent des réactions anaphylactiques, des allergies et la sensibilité au contact (par ex. la réaction au sumac vénéneux). L'immunodéficience signifie qu'un individu ne peut pas monter une réponse immunitaire efficace. L'immunodéficience peut être génétique (par ex. déficit immunitaire avec défaut d'expression des molécules HLA ou maladie du « bébé bulle ») ou induite par une maladie (par ex. immunodéficience due à une infection par le VIH) ou par des médicaments immunodépresseurs (par ex., médicaments administrés après une transplantation d'organe pour prévenir le rejet). Une maladie auto-immune vient d'un système immunitaire qui se monte de manière inappropriée une réponse immunitaire à lui-même, par exemple, les maladies telles que le lupus érythémateux disséminé (lupus, LED), l'arthrite rhumatoïdale, la sclérose en plaques, les diabètes insulino-dépendants et la maladie coeliaque.



**6. Pourquoi les immunodépresseurs sont-ils nécessaires dans le cas d'une greffe d'organe ?**

Les immunodépresseurs (tels que la prednisolone et la cyclosporine) empêchent le corps de traiter l'organe transplanté comme un intrus ; la présence des immunodépresseurs est largement responsable du succès de la transplantation comme traitement en cas d'organes défaillants. Le rejet d'organe est un type de réaction d'hypersensibilité dans laquelle le corps monte une forte réponse immunitaire à la transplantation. L'inconvénient est que l'action des immunodépresseurs n'est pas spécifique et qu'ils suppriment toutes les réactions immunologiques. Les bénéficiaires de transplantation sont donc très vulnérables aux infections.

**7. Pourquoi est-il important de détecter rapidement l'exposition à une maladie ?**

La détection rapide de l'exposition à une maladie est importante pour plusieurs raisons. Pour de nombreuses maladies, la détection précoce de l'infection et la rapidité de l'engagement du traitement peuvent réduire la gravité des symptômes, voire même totalement prévenir la maladie. La détection rapide de l'exposition à la maladie est également importante pour éviter la propagation de cette dernière.

**8. Que signifie ELISA ?**

Ezyme-linked immunosorbent assay.

**9. Pourquoi les enzymes sont-elles utilisées dans ce dosage immunitaire ?**

Les enzymes permettent de voir si l'anticorps primaire s'est attaché à sa cible (antigène) dans le puits de micro-plaques. Les anticorps primaires et secondaires sont invisibles, une méthode de détection est donc nécessaire. L'enzyme, la peroxydase de raifort (HRP) est liée à l'anticorps secondaire. La HRP réagit avec un substrat incolore dans une réaction chimique qui vire au bleu. Si l'anticorps secondaire est présent dans le puits, le changement de couleur indique un résultat positif.

**10. Pourquoi avez-vous besoin de doser des échantillons témoins positifs et négatifs ainsi que des échantillons expérimentaux ?**

Les témoins sont nécessaires pour s'assurer que l'expérience a fonctionné. S'il n'y a pas de témoin positif et si l'échantillon est négatif, nous ne pouvons savoir si l'échantillon était véritablement négatif ou si le dosage n'a pas fonctionné. À l'inverse, sans témoin négatif, il n'y a aucun moyen de savoir si tous les échantillons (positifs ou non) auraient donné un résultat positif.

**Questions clefs après la séance de TP**

**11. Les échantillons que vous avez ajoutés à la bande de micro-plaques contiennent de nombreuses protéines et peuvent ou non contenir l'antigène de la maladie. Qu'est-il advenu des protéines du puits en plastique si l'échantillon contenait de l'antigène ? Qu'en est-il advenu s'il ne contenait pas d'antigène ?**

Dans les deux cas, toutes les protéines présentes dans les échantillons se lient aux puits en plastique.

**12. Pourquoi avez-vous eu besoin de laver les puits après chaque étape ?**

Le lavage retire toutes les protéines qui ne se sont pas liées aux puits en plastique et tous les anticorps qui ne se sont pas liés à leurs cibles, empêchant, par là même, les protéines non-liées (antigènes ou anticorps) de donner de faux résultats positifs.

**13. Lorsque vous avez ajouté l'anticorps primaire aux puits, que s'est-il produit si votre échantillon contenait de l'antigène ? S'il n'en contenait pas ?**

Si l'échantillon contenait de l'antigène, l'anticorps primaire s'est lié à l'antigène. S'il n'en contenait pas, l'anticorps primaire ne s'est pas lié.

**14. Lorsque vous avez ajouté l'anticorps secondaire aux puits, que s'est-il produit si votre échantillon contenait de l'antigène ? S'il n'en contenait pas ?**

Si l'échantillon contenait de l'antigène, l'anticorps secondaire s'est lié à l'anticorps primaire, lui-même déjà lié à l'antigène dans les puits. Si l'échantillon test ne contenait pas d'antigène, l'anticorps primaire ne s'est pas lié dans les puits de sorte que l'anticorps secondaire n'avait rien sur quoi se lier.

**15. Si l'échantillon a donné un résultat négatif pour l'agent provoquant la maladie, est-ce que cela signifie que vous n'avez pas la maladie ? Comment peut-on expliquer un résultat négatif alors que vous avez en fait contracté la maladie ?**

Un résultat négatif ne signifie pas forcément que vous n'êtes pas contaminé. Cela peut être un faux négatif. Le test ELISA peut ne pas être suffisamment sensible pour détecter les niveaux très faibles d'agents de la maladie, par exemple les niveaux présents juste après l'infection. Une autre cause de résultats faux négatifs est l'erreur expérimentale, comme par exemple mettre un témoin négatif dans un puits, alors que vous pensiez y mettre un échantillon expérimental.

**16. Pourquoi avez-vous effectué un dosage de vos échantillons en triple ?**

Effectuer le dosage des échantillons en trois exemplaires est un autre contrôle. Si vous n'obtenez pas les mêmes résultats dans les trois puits, votre technique expérimentale a sans doute un problème ou vous avez fait une erreur de pipette. Dans un laboratoire clinique, l'expérience devrait être reprise. Si cette erreur intervient dans cette activité, prenez le résultat des deux puits qui coïncident car il est sans doute correct.

**17. Quels tests à base d'anticorps pouvez-vous acheter dans votre pharmacie locale ?**

Les kits de test qui s'appuient sur le même principe qu'ELISA comportent les tests de détection de grossesse ou d'ovulation à domicile et les tests pour détecter la présence de drogues illégales telles que la marijuana et la cocaïne.

**18. Si le résultat de votre test est positif pour une exposition à la maladie, avez-vous eu un contact direct avec l'un des élèves contaminés de départ ? Dans le cas contraire, à quelles conclusions pouvez-vous aboutir à propos de la transmissibilité de la maladie dans une population ?**

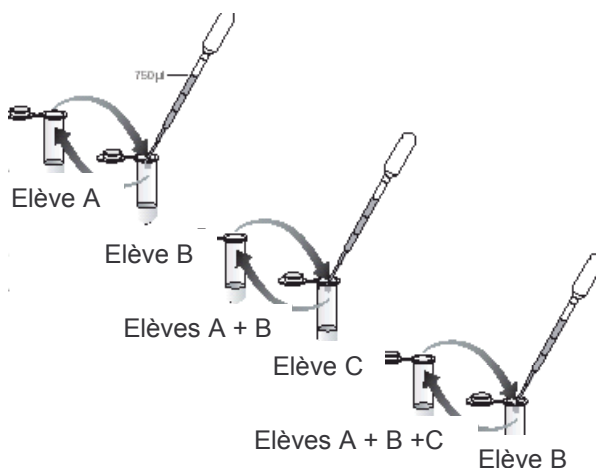
Avoir un contact intime avec une autre personne signifie que vous êtes exposé non seulement à cette personne mais également à tous les contacts intimes précédents de cette personne.



## Mode opératoire du TP

### Détection des épidémies avec ELISA

- 1 Etiqueter un tube jaune et une pipette de transfert en plastique avec vos initiales.
- 2 Utiliser la pipette pour transférer la totalité de votre "fluide organique" dans le tube d'un autre élève. Mélanger délicatement les échantillons, puis prendre la moitié de l'échantillon partagé (750 µl) dans votre propre tube. Consigner le nom de l'élève à côté de "partenaire de partage N°1".
- 3 Lorsque le professeur le demande, répéter deux fois le protocole de partage.



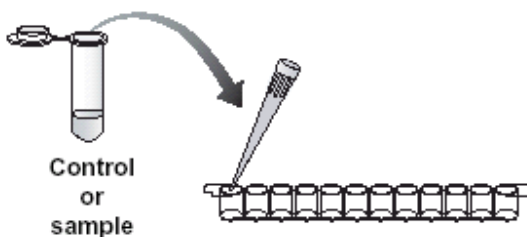
*Point d'arrêt éventuel : les échantillons peuvent être stockés à 4°C pour la nuit.*

Partenaire de partage N°1 \_\_\_\_\_

Partenaire de partage N°2 \_\_\_\_\_

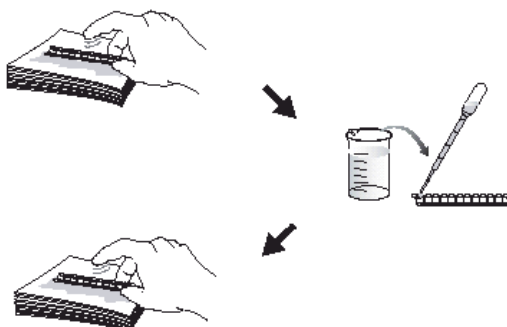
Partenaire de partage N°3 \_\_\_\_\_

- 4 Etiqueter votre bande de 12 puits. Incrire "+" pour les témoins positifs des trois premiers puits de chaque bande et un "-" pour les trois puits suivants pour les témoins négatifs. Etiqueter les puits restants avec vos initiales et celles de votre partenaire (3 puits chacun).
- 5 Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl de témoin positif (+) dans les trois puits (+).
- 6 Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl de témoin négatif (-) dans les trois puits (-).
- 7 Transférer 50 µl de votre échantillon dans les trois puits ayant vos initiales en utilisant un nouveau cône pour chaque échantillon.

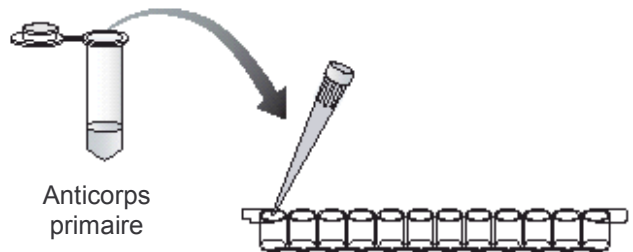


Témoin ou échantillon

- 8 Attendre 5 minutes que les protéines des échantillons se lient aux puits en plastique.
- 9 **LAVÉ**
  - a. Renverser la bande de micro-plaques sur les serviettes en papier et taper délicatement la bande à plusieurs reprises, à l'envers.
  - b. Jeter la serviette en papier du haut de la pile.
  - c. Utiliser une pipette de transfert pour remplir chaque puits avec la solution tampon de lavage.
  - d. Renverser la bande de micro-plaques sur les serviettes en papier et taper.
  - e. Jeter les 2 à 3 serviettes du haut de la pile.



- 10 Utiliser un nouveau cône pour transférer 50  $\mu$ L d'anticorps primaire (AP) dans les 12 puits de la bande de micro-plaques.

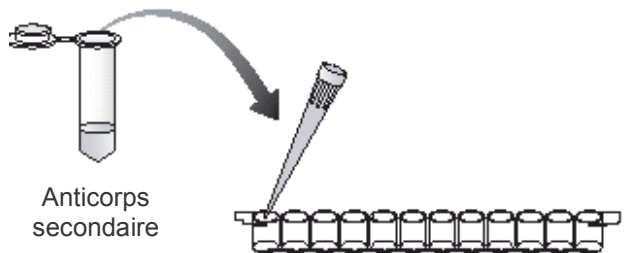


- 11 Attendre 5 minutes que les anticorps se lient à leurs cibles.

- 12 Laver les anticorps primaires non-liés des puits en répétant le lavage de l'étape 9.

### LAVER

- 13 Utiliser un nouveau cône pour transférer 50  $\mu$ l d'anticorps secondaires (AS) dans les 12 puits de la bande de micro-plaques.

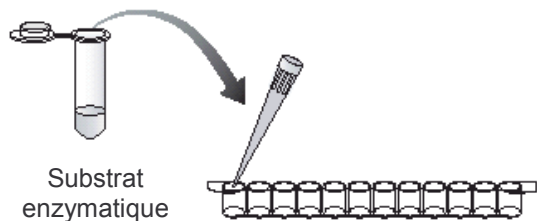


- 14 Attendre 5 minutes que les anticorps se lient à leurs cibles.

- 15 Laver les anticorps secondaires non liés des puits en répétant à deux reprises le lavage de l'étape 9.

### LAVER 2 X

- 16 Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50  $\mu$ l de substrat enzymatique (SUB) dans les 12 puits de la bande de microplaques.



- 17 Attendre 5 minutes. Observer et consigner les résultats.





## **Protocole II : Détection des antigènes avec ELISA**

|  |    |
|--|----|
| Guide de l'enseignant  | 27 |
| Présentation générale du TP  | 28 |
| Préparation du TP  | 29 |
| Liste de contrôle des postes de travail                              | 31 |
| Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion | 32 |
| Mode opératoire du TP  | 34 |

## Protocole II : ELISA pour détecter les antigènes

### Guide de l'enseignant

Cette activité interactive est conçue pour simuler la mise en œuvre d'un test pour détecter la présence d'un antigène dans un échantillon donné. Le protocole peut être utilisé pour discuter comment un dosage ELISA basé sur les anticorps peut détecter des agents pathogènes dans des échantillons tels que les fluides organiques (avant que le corps n'ait eu la chance de monter une réponse immunitaire). La variole est l'un des grands exemples. Si elle est détectée et traitée avec le vaccin dans les 2 à 3 jours suivant l'exposition, les patients ne développent pas la variole. D'autres scénari basés sur des maladies incluent le virus du West Nile, le VIH, le SRAS et l'anthrax). On peut également prendre des exemples de sources d'antigènes liés aux maladies dans les animaux de la ferme, les produits agricoles, les produits alimentaires et l'eau.

Vous pouvez également choisir de vous concentrer sur des applications non basées sur une maladie, telles que la détection de l'hormone hCG dans un test de grossesse, la détection de stéroïdes illégaux dans un test de présence de drogues, la présence de toxines bactériennes dans un test de sécurité alimentaire ou la détection de la présence d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans des aliments non OGM - ou tout autre scénario qui peut stimuler l'intérêt de vos élèves.

Ce dosage ELISA s'appuie sur des anticorps qui sont fabriqués pour détecter des antigènes spécifiques dans des fluides organiques ou dans des échantillons provenant d'animaux de la ferme, de produits alimentaires ou d'eau. Chaque élève va recevoir un échantillon simulé pour doser la présence de l'antigène.

### Mise en œuvre - délai

|        |               |                     |
|--------|---------------|---------------------|
| Jour 1 | Mise en scène | Cours et discussion |
| Jour 2 | TP Elisa      |                     |

## Présentation générale du TP

**Étape 1 :** en utilisant une pipette, ajouter 50 µl de l'échantillon de chaque élève (inconnu) avec les témoins positifs et négatifs aux puits de la bande de microplaques et laisser incubé pendant 5 minutes, ce qui permet à l'antigène, s'il est présent, de se lier aux puits. Rincer les puits avec une solution tampon de lavage (PBST : soluté physiologique tamponné par les phosphates contenant 0,05% de Tween 20) pour bloquer les sites liant les protéines dans les puits.



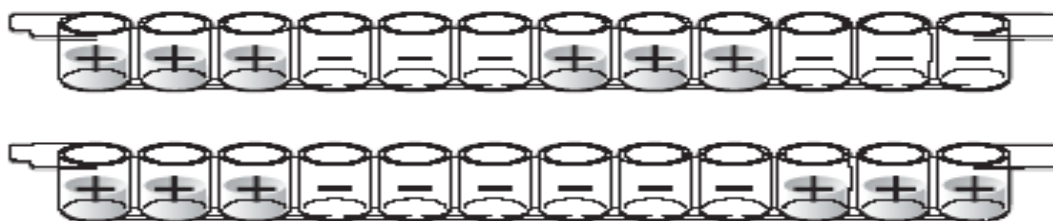
**Étape 2 :** ajouter l'anticorps primaire (50 µl) aux puits et laisser incubé pendant 5 minutes à température ambiante. L'anticorps primaire est un anticorps qui reconnaît et se lie à l'antigène. Rincer les puits avec le soluté physiologique pour retirer l'anticorps non lié.



**Étape 3 :** ajouter de la peroxydase de raifort (HRP)-liée à l'anticorps secondaire (50 µl) aux puits et laisser incubé pendant 5 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire est un anticorps qui reconnaît et se lie à l'anticorps primaire. L'HRP est une enzyme qui oxydara un substrat produisant de la couleur. Rincer les puits avec la solution tampon de lavage pour retirer l'anticorps secondaire non lié.



**Étape 4 :** ajouter le substrat enzymatique (50 µl) à chaque puits ; les élèves surveillent l'évolution de la couleur. Si de l'HRP est présent (ce qui signifie que l'antigène était présent dans l'échantillon), la solution dans les puits vire au bleu dans les 5 minutes. En l'absence d'antigène dans l'échantillon, les puits restent incolores.



Résultats ELISA typiques.

## Préparation du TP

Cette section est conçue pour vous aider à préparer efficacement cet exercice pratique. Nous vous recommandons de réhydrater et diluer l'antigène et l'anticorps primaire au maximum 3 jours avant le cours et l'anticorps secondaire moins de 24 heures avant le cours. Nous suggérons également d'utiliser de l'eau distillée stérile pour préparer la solution tampon PBS afin d'éviter de contaminer des agents réhydratés. Ces réactifs doivent être conservés dans de la glace ou dans le réfrigérateur s'ils ont été préparés plus de 4 heures avant le cours.

La chose la plus importante pour les élèves est de mettre les bons composants dans les puits de dosage, dans le bon ordre ; par conséquent, il est crucial pour la réussite de l'exercice, que les tubes soient clairement étiquetés et correctement codés par couleur.

### Objectifs

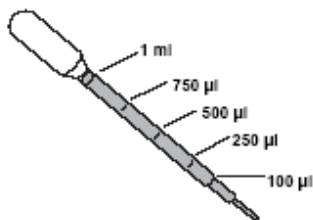
- Étape 1. Préparer des solutions tampon
- Étape 2. Réhydrater l'antigène lyophilisé, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire
- Étape 3. Diluer les réactifs
- Étape 4. Distribuer les réactifs aux postes de travail
- Étape 5. Préparer les postes de travail

**Temps nécessaire** 1 à 3 heures

**Remarque :** si vous envisagez d'utiliser ce kit pour plusieurs sessions de TP, sur une période de 1 ou 2 semaines, nous vous recommandons fortement d'utiliser de l'eau stérilisée pour préparer la solution tampon PBS afin d'éviter de contaminer les réactifs. (L'eau peut être stérilisée en la portant à ébullition dans un four à micro-ondes plus de 5 minutes dans une bouteille bouchée, sans trop serrer ; après avoir retiré la bouteille du four à micro-ondes, la laisser refroidir puis resserrer le bouchon). Diluer uniquement la quantité d'anticorps et d'antigènes nécessaires pour chaque séance de travaux pratiques. Les anticorps réhydratés sont des concentrats à 50x. Stocker les antigènes et anticorps concentrés restant dans le réfrigérateur à 4°C. Nous ne recommandons pas de stocker l'anticorps et l'antigène concentrés pendant plus de 2 semaines, même à 4°C. Ne pas congeler les solutions.

### Mesures des volumes

Ce kit contient des pipettes de transfert en plastique jetables graduées à utiliser pour préparer certains réactifs lorsque des volumes entre 250 microlitres ( $\mu\text{l}$ ) et 5 millilitres (ml) sont nécessaires. Par ailleurs, des micro-pipettes à volume ajustable ou fixe sont nécessaires pour assurer des volumes de 50  $\mu\text{l}$ . L'illustration montre les graduations correspondant aux volumes à mesurer. Des volumes supérieurs à 1 ml exigeront des ajouts multiples. Pour chaque étape de la préparation du TP, utiliser une nouvelle pipette ou un nouveau cône.



Pour mesurer des liquides qui contiennent des détergents qui moussent (par ex., le tampon de lavage) vous devez lire le volume au niveau de l'interface entre le liquide et les bulles.

## Guide de préparation - déroulement pas à pas

Ces instructions sont destinées à préparer 12 postes de travail, chacun avec 4 élèves.

### Étape 1. Préparer les solutions tampon

Nous vous recommandons d'utiliser un cylindre gradué de 1 litre et un de 100 ml pour préparer les solutions tampons. Vous aurez également besoin d'1 litre d'eau distillée.

a. Préparer 100 ml de PBS 1x. Mesurer 90 ml d'eau distillée, ajouter 10 ml de PBS 10x et mélanger. Etiqueter le conteneur « PBS 1x ».

*Le PBS est utilisé pour réhydrater les trois composants lyophilisés en étape 2 et pour diluer l'ANTIGÈNE en étape 3.*

b. Préparer 900 ml de solution tampon de lavage. Mesurer 805 ml d'eau distillée, ajouter 90 ml de PBS 10x et 4,5 ml de Tween 20 10% et mélanger. Etiqueter le conteneur « solution tampon de lavage ».

*La solution tampon de lavage est utilisée pour diluer les ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES en étape 3.*

### Étape 2. Réhydrater l'antigène, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire lyophilisés.

a. Réhydrater les antigènes et les anticorps dans du PBS 1x. Retirer délicatement les bouchons des trois réactifs lyophilisés et utiliser une pipette pour ajouter 0,5 ml de PBS 1x à chacun. (**Utiliser une nouvelle pipette pour chacun.**) Remettre les bouchons et agiter pour mélanger. Ces solutions sont concentrées à 50x. **Remarque : à ce stade vous ne devez pas utiliser la solution tampon de lavage.**

### Étape 3. Diluer les réactifs.

a. Diluer l'antigène. Etiqueter une bouteille de 30 ml « antigène 1x » et ajouter 24,5 ml de PBS 1x à la bouteille. Utiliser une pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTIGÈNES réhydratés au PBS 1x et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec du réactif dilué et s'assurer que la totalité de l'antigène est utilisée. Fermer le bouchon et agiter pour mélanger. **Remarque : vous ne devez pas ajouter de solution tampon contenant du Tween 20 à l'antigène, sinon l'expérience ne fonctionnera pas.**

b. Diluer l'anticorps primaire. Etiqueter une bouteille de 30 ml « anticorps primaire 1x » et ajouter 24,5 ml de **solution tampon de lavage** dans la bouteille. Utiliser une nouvelle pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTICORPS PRIMAIRE réhydraté à la bouteille et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec une certaine quantité de réactif dilué pour s'assurer que la totalité de l'anticorps est utilisée. Fermer le bouchon et agitez pour mélanger.

d. Diluer l'anticorps secondaire. Diluer l'anticorps secondaire moins de 24 heures avant le démarrage du cours. Etiqueter une bouteille de 30 ml « anticorps secondaire 1x » et ajoutez 24,5 ml de **solution tampon de lavage** dans la bouteille. Utiliser une nouvelle pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTICORPS SECONDAIRE réhydraté à la bouteille et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec une certaine quantité de réactif dilué pour s'assurer que la totalité de l'anticorps est utilisée. Fermer le bouchon et agiter pour mélanger.

### Étape 4. Distribuer les réactifs aux postes de travail.

a. Distribuer les témoins positifs. Etiqueter 12 tubes violets avec « + » et ajouter à chacun 0,5 ml de solution d'antigène 1x.

b. Distribuer les témoins négatifs. Etiqueter 12 tubes bleus avec « - » et ajouter à chacun 0,5 ml de PBS 1x.



- c. Distribuer l'anticorps primaire. Etiqueter 12 tubes verts « AP » et ajouter à chacun 1,5 ml de solution d'anticorps primaire 1x.
- d. Distribuer l'anticorps secondaire. Etiqueter 12 tubes orange « AS » et ajouter à chacun 1,5 ml de solution d'anticorps secondaire 1x.
- e. Distribuer le substrat enzymatique. Etiqueter 12 tubes bruns « SUB » et ajouter 1,5 ml de substrat enzymatique HRP (TMB) à chacun. Remarque : le TMB est sensible à la lumière, il est donc important d'utiliser des tubes sombres pour stoker ce réactif.
- f. Distribuer les échantillons test aux élèves. Nous vous recommandons de concevoir l'expérience de sorte que 50% de vos élèves aient un test positif et 50% aient un test négatif. Toutefois, c'est à vous que revient le choix final du ratio. Faites un échantillon test d'élève pour chaque élève de votre classe. Pour un ratio de 50/50 dans votre classe, ajoutez 0,25 ml de solution d'antigène 1x à 24 tubes jaunes sans étiquette et 0,25 ml de PBS 1x à 24 tubes jaunes sans étiquette. Mélangez les tubes.

## Étape 5. Préparer les postes de travail

### Liste de contrôle des postes de travail

Un poste de travail pour 4 élèves.

| Élément (étiquette)   | Contenu  | Numéro          | (√)                      |
|---|--|-----------------|--------------------------|
| Tube jaune  | Echantillons test des élèves (0,25 ml)                               | 4 (1 par élève) | <input type="checkbox"/> |
| Tube violet (+)   | Témoin positif (0,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube bleu (-)   | Témoin négatif (0,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube vert (AP)  | Anticorps primaire (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube orange (AS)  | Anticorps secondaire (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube brun (SUB)   | Substrat enzymatique (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Bandes de micro-plaques à 12-puits  |  | 2               | <input type="checkbox"/> |
| Micro-pipettes à volume fixe 50 µl ou micro-pipettes ajustables 20 à 200 µl |  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Cônes jaunes  |  | 10 à 20         | <input type="checkbox"/> |
| Pipettes de transfert en plastique jetables                                 |  | 5               | <input type="checkbox"/> |
| Solution tampon de lavage 70 à 80 ml dans bécher                            | Soluté physiologique tamponné par les phosphates avec Tween 20 0,05% | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Pile de serviettes en papier  |  | 2               | <input type="checkbox"/> |
| Marqueur noir   |  | 1               | <input type="checkbox"/> |

**Points d'arrêt :** même si cette procédure est conçue pour s'intégrer dans la durée d'un seul cours, si vous désirez arrêter la procédure, vous pouvez ajouter de la solution tampon de lavage aux puits de micro-plaques à tout stade après l'ajout d'antigènes et avant l'ajout de substrat enzymatique et placer les bandes de micro-plaques et tous les réactifs dans le réfrigérateur pour la nuit, à une température de 4°C.

## Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion

### Questions clefs avant la séance de TP

#### 1. Comment le système immunitaire nous protège-t-il des maladies ?

Le système immunitaire comporte des barrières physiques, telles que la peau et les membranes muqueuses qui empêchent les pathogènes de pénétrer dans le corps, et des réponses cellulaires, telles que la circulation des macrophages qui répondent aux intrus. Notre système immunitaire acquis monte une réponse d'anticorps spécifique lorsque notre corps est exposé à un intrus et nos cellules immunitaires attaquent l'intrus.

#### 2. Comment le médecin utilise-t-il la réponse immunitaire pour nous protéger des maladies ?

Les médecins utilisent la réponse immunitaire lorsqu'ils nous vaccinent contre certaines maladies. Notre système immunitaire mémorise les pathogènes auxquels nous avons été exposés et lors de l'exposition suivante aux pathogènes, notre système immunitaire les attaque plus rapidement et efficacement. Les médecins tirent parti de l'effet d'amorce en nous exposant aux pathogènes inactivés (organismes tués ou affaiblis qui ne peuvent pas nous rendre malades) de sorte que si nous sommes exposés ultérieurement aux pathogènes actifs, notre corps montera une réponse d'anticorps puissante et immédiate, réduisant ou éliminant les risques d'être contaminés par la maladie.

#### 3. Comment les anticorps sont-ils fabriqués dans notre corps ?

Les anticorps du corps sont fabriqués par les cellules immunes appelées lymphocytes B (ou cellules B). La production d'un anticorps pour un antigène particulier augmente lorsque vous êtes exposé à l'antigène.

#### 4. Comme sont fabriqués les anticorps qui sont utilisés dans ELISA ?

Les anticorps utilisés par les scientifiques sont en général fabriqués en immunisant des animaux. Des anticorps polyclonaux sont purifiés à partir de sérum animal. Les anticorps monoclonaux sont obtenus en fusionnant des cellules B venant de souris immunisées avec des cellules immortalisées en culture et en collectant les anticorps pompés dans le fluide de croissance. Il existe des méthodes plus avancées technologiquement pour fabriquer des anticorps impliquant la technologie de l'ADN recombinant.

#### 5. Pourquoi un test de détection d'antigène rapide est-il nécessaire ?

En médecine, les patients et les médecins ont rapidement besoin des résultats des tests de manière à pouvoir prendre les décisions cruciales pour le traitement du patient. Les responsables chargés de veiller au respect de l'application de la loi et les responsables sportifs ont besoin de résultats rapides aux tests de consommation de drogue pour les aider à décider si oui ou non une action doit être engagée contre une personne soupçonnée d'avoir consommé des drogues. Les tests de sécurité des aliments/de l'eau et de l'environnement doivent donner des résultats rapides car la santé et la sécurité de la population peuvent être en jeu. Par ailleurs, dans tous les cas ci-dessus, le temps consacré à attendre les résultats de tests peut avoir un impact économique.

#### 6. Que signifie ELISA ?

Enzyme-linked immunosorbent assay.

#### 7. Pourquoi les enzymes sont-elles utilisées dans ce dosage immunitaire ?

Les enzymes permettent de voir si l'anticorps primaire s'est attaché à sa cible (antigène) dans le puits de micro-plaques. Les anticorps primaires et secondaires sont invisibles, une méthode de détection est donc nécessaire. L'enzyme, la peroxydase de raifort (HRP) est liée à l'anticorps secondaire. La HRP réagit avec un substrat incolore dans une réaction chimique qui vire au bleu. Si l'anticorps secondaire est présent dans le puits, le changement de couleur indique un résultat positif.

**8. Pourquoi avez-vous besoin de doser des échantillons témoins positifs et négatifs ainsi que des échantillons expérimentaux ?**

Les témoins sont nécessaires pour s'assurer que l'expérience a fonctionné. S'il n'y a pas de témoin positif et si l'échantillon est négatif, nous ne pouvons savoir si l'échantillon était véritablement négatif ou si le dosage n'a pas fonctionné. À l'inverse, sans témoin négatif, il n'y a aucun moyen de savoir si tous les échantillons (positifs ou non) auraient donné un résultat positif.

**Questions clefs après la séance de TP**

**9. Est-ce que votre échantillon contenait des antigènes ?**

Les élèves donnent des explications en utilisant les données provenant de leurs résultats.

**10. Les échantillons que vous avez ajoutés à la bande de micro-plaques contiennent de nombreuses protéines et peuvent ou non contenir l'antigène. Qu'est-il advenu des protéines du puits en plastique si l'échantillon contenait de l'antigène ? Qu'en est-il advenu s'il ne contenait pas d'antigène ?**

Dans les deux cas, toutes les protéines présentes dans les échantillons se lient aux puits en plastique.

**11. Pourquoi avez-vous eu besoin de laver les puits après chaque étape ?**

Le lavage retire toutes les protéines qui ne se sont pas liées aux puits en plastique et tous anticorps qui ne se sont pas liés à leurs cibles, empêchant, par là même, les protéines non-liées (antigènes ou anticorps) de donner de faux résultats positifs.

**12. Lorsque vous avez ajouté l'anticorps primaire aux puits, que s'est-il produit si votre échantillon contenait de l'antigène ? S'il n'en contenait pas ?**

S'il est positif pour l'antigène, l'anticorps primaire s'est lié à l'antigène. S'il est négatif, l'anticorps primaire ne s'est pas lié.

**13. Lorsque vous avez ajouté l'anticorps secondaire aux puits, que s'est-il produit si votre échantillon contenait de l'antigène ? S'il n'en contenait pas ?**

Si l'échantillon contenait de l'antigène, l'anticorps secondaire s'est lié à l'anticorps primaire, lui-même déjà lié à l'antigène dans les puits. Si l'échantillon test ne contenait pas d'antigène, l'anticorps primaire ne s'est pas lié dans les puits de sorte que l'anticorps secondaire n'avait rien sur quoi se lier.

**14. Si l'échantillon a donné un résultat négatif pour l'antigène, est-ce que cela signifie que l'antigène n'est pas présent ? Comment peut-on expliquer un résultat négatif alors que l'antigène est en fait présent ?**

Un résultat négatif ne signifie pas forcément que l'antigène n'est pas présent. Cela peut être un faux négatif. Le test ELISA peut ne pas être suffisamment sensible pour détecter les niveaux très faibles d'antigène. Une autre cause de résultats faux négatifs est l'erreur expérimentale, comme par exemple mettre un témoin négatif dans un puits, alors que vous pensiez y mettre un échantillon expérimental.

**15. Pourquoi avez-vous effectué un dosage de vos échantillons en triple ?**

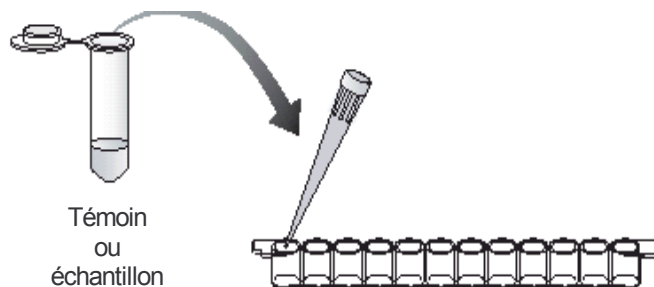
Effectuer le dosage des échantillons en trois exemplaires est un autre contrôle. Si vous n'obtenez pas les mêmes résultats dans les trois puits, votre technique expérimentale a sans doute un problème ou vous avez fait une erreur de pipette. Dans un laboratoire clinique, l'expérience devrait être reprise. Si cette erreur intervient dans cette activité, prenez le résultat des deux puits qui coïncident car il est sans doute correct.

**16. Quels tests à base d'anticorps pouvez-vous acheter dans votre pharmacie locale ?**

Les kits de test qui s'appuient sur les mêmes principes qu'ELISA comportent les tests de détection de grossesse ou d'ovulation à domicile et les tests pour détecter la présence de drogues illégales telles que la marijuana et la cocaïne.

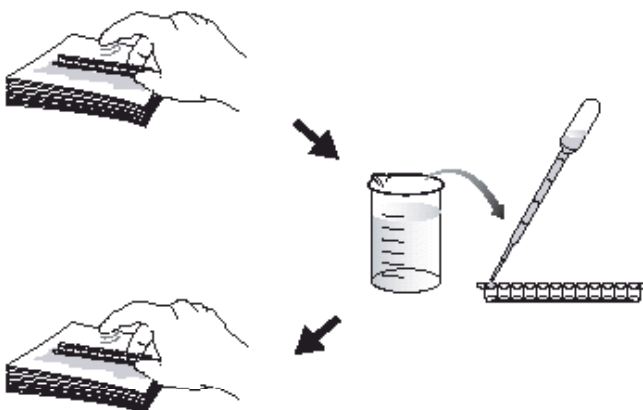
## Mode opératoire du TP Détection des antigènes avec ELISA

1. Etiqueter un tube jaune avec vos initiales.
2. Etiqueter votre bande de 12 puits. Inscrivez "+" pour les témoins positifs des trois premiers puits de chaque bande et un "-" pour les trois puits suivants pour les témoins négatifs. Etiqueter les puits restants avec vos initiales et celles de votre partenaire (3 puits chacun).
3. Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl de témoin positif (+) dans les trois puits (+).
4. Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl de témoin négatif (-) dans les trois puits (-).
5. Transférer 50 µl de votre échantillon dans les trois puits ayant vos initiales en utilisant un nouveau cône pour chaque échantillon.

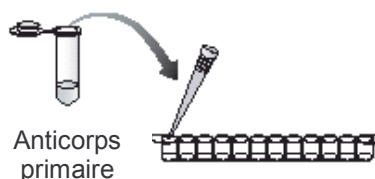


6. Attendre 5 minutes que les protéines des échantillons se lient aux puits en plastique.
7. **LAVER**

- a. Renverser la bande de micro-plaques sur les serviettes en papier et taper délicatement la bande à plusieurs reprises, à l'envers.
- b. Jeter la serviette en papier du haut de la pile.
- c. Utiliser une pipette de transfert pour remplir chaque puits avec la solution tampon de lavage.
- d. Renverser la bande de micro-plaques sur les serviettes en papier et tapoter.
- e. Jeter les 2 à 3 serviettes du haut de la pile.



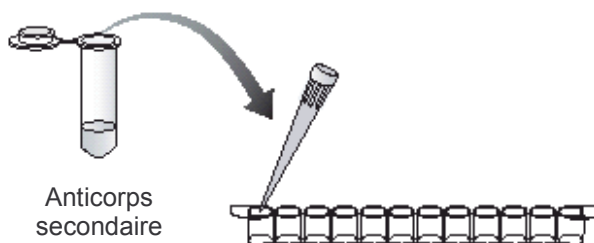
8. Utiliser un nouveau cône pour transférer 50 µL d'anticorps primaire (AP) dans les 12 puits de la bande de micro-plaques.
9. Attendre 5 minutes que les anticorps se lient à leurs cibles.



10. Laver les anticorps primaires non liés des puits en répétant la totalité de l'étape de lavage 7.

11. Utiliser un nouveau cône pour transférer 50 µl d'anticorps secondaires (AS) dans les 12 puits de la bande de microplaques.

## LAVAGE



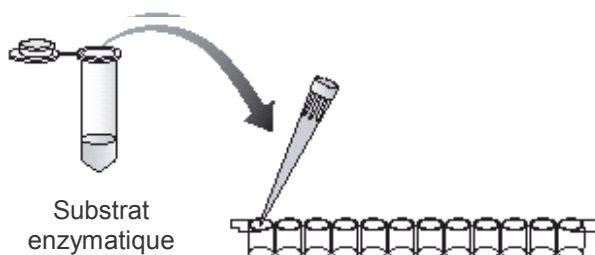
12. Attendre 5 minutes que les anticorps se lient à leurs cibles.

13. Laver les anticorps secondaires non liés des puits en répétant à deux reprises le lavage de l'étape 7.

14. Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl de substrat enzymatique (SUB) dans les 12 puits de la bande de microplaques.

15. Attendre 5 minutes. Observer et consigner les résultats.

## LAVAGE 2X



## **Protocole III : Test des anticorps avec ELISA**

|  |    |
|--|----|
| Guide de l'enseignant  | 37 |
| Présentation générale du TP  | 38 |
| Préparation du TP  | 39 |
| Liste de contrôle des postes de travail                              | 41 |
| Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion | 42 |
| Mode opératoire du TP  | 45 |

## Protocole III : Test des anticorps avec ELISA

### Guide de l'enseignant

Ce protocole est conçu pour simuler un examen de diagnostic sanguin pour détecter des anticorps dans le sérum. Avec ce protocole, les élèves effectuent un dosage ELISA pour détecter les anticorps circulant dans le sang comme indication de l'exposition à un agent pathogène. Chaque élève reçoit un échantillon de sérum simulé et il est chargé de doser l'échantillon et de rechercher la présence d'anticorps.

Vous pouvez également choisir de vous concentrer sur une variété de maladies telles que le VIH, le virus West Nile (chez les personnes et les animaux), le SRAS, la maladie de Lyme, la trichinose, la tuberculose ou toute autre maladie qui stimule l'intérêt de vos élèves. Cette technique est utile pour détecter et effectuer un diagnostic post-infection, alors que l'antigène lui-même n'est pas détectable dans le corps. Une fois que le corps a monté une réponse immune, les anticorps sont présents dans le sérum sanguin et peuvent être détectés. Par exemple, très récemment encore, il n'était pas possible d'utiliser ELISA pour détecter directement le virus VIH, mais les anticorps du sérum contre le virus pouvaient être détectés in vitro en utilisant ELISA. Par conséquent, le test des anticorps ELISA était le seul moyen rapide de diagnostiquer l'infection par le VIH. Aujourd'hui, à la suite de lourds investissements dans la recherche sur la biologie du VIH/SIDA, il est possible de détecter l'antigène VIH dans le sang directement avec ELISA, ce qui permet un traitement précoce et permet de prolonger la vie.

### Mise en œuvre - délai

Jour 1 Mise en scène  
Jour 2 TP Elisa

Cours et discussion

## Présentation générale du TP

Ce protocole est conçu pour simuler un examen de diagnostic sanguin par détection des anticorps dans le sérum. Avec ce protocole, les élèves effectuent un dosage ELISA pour détecter les anticorps circulant dans le sang comme indication de contamination par un agent pathogène. Chaque élève reçoit un échantillon de sérum simulé et est chargé de rechercher et de doser les anticorps.

Dans le cas du SIDA, dès que la réponse immunitaire est réalisée, les anticorps sont présents dans le sérum sanguin et peuvent être détectés. Très récemment encore, il n'était pas possible d'utiliser ELISA pour détecter directement le virus VIH. Par conséquent, le test des anticorps ELISA était le seul moyen rapide de diagnostiquer l'infection par le VIH. Aujourd'hui, à la suite de lourds investissements dans la recherche sur la biologie du VIH/SIDA, il est possible de détecter l'antigène VIH dans le sang directement avec ELISA, ce qui permet un traitement précoce et plus efficace.

**Étape 1 :** en utilisant une pipette, ajouter 50 µl d'antigène pathogène purifié (simulée) aux puits de la bande de microplaques et laisser incuber pendant 5 minutes, ce qui permet à l'antigène de se lier aux puits. Rincer les puits avec une solution tampon de lavage (PBST : soluté physiologique tamponné par les phosphates contenant 0,05% de Tween 20) pour éliminer l'antigène non fixé et bloquer les sites liant les protéines non occupés dans les puits.



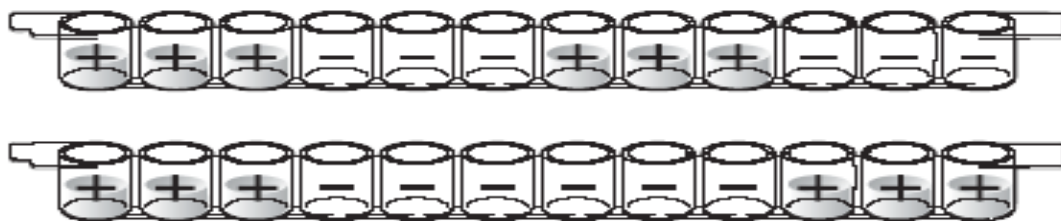
**Étape 2 :** ajouter les échantillons de sérum et les témoins positifs et négatifs (50 µl) aux puits et laisser incuber pendant 5 minutes à température ambiante. Dans ce protocole, les échantillons de sérum contiennent des anticorps primaires qui représentent les anticorps primaires du sang d'un patient. Si les anticorps contre la maladie sont présents dans l'échantillon de sérum, ils se lieront à l'antigène de la maladie purifié déjà fixé dans les puits. Rincer les puits avec la solution tampon de lavage pour retirer l'anticorps non lié.



**Étape 3 :** ajouter de la peroxydase de raifort (HRP)-liée à l'anticorps secondaire (50 µl) aux puits et laisser incuber pendant 5 minutes à température ambiante. L'anticorps secondaire est un anticorps qui reconnaît et se lie à l'anticorps primaire. Dans cette simulation, l'anticorps secondaire représente un anticorps anti-humain. L'HRP est une enzyme qui oxydara un substrat en un produit coloré bleu. Rincer les puits avec la solution tampon de lavage pour retirer l'anticorps secondaire non lié.



**Étape 4 :** ajouter le substrat enzymatique (50 µl) à chaque puits ; les élèves surveillent l'évolution de la couleur. Si de l'HRP est présente (ce qui signifie que l'antigène était présent dans l'échantillon), la solution dans les puits vire au bleu dans les 5 minutes indiquant un diagnostic positif. S'il n'y a pas d'anticorps à l'antigène de la maladie, les puits restent incolores, indiquant un diagnostic négatif.



Résultats ELISA typiques.



## Préparation du TP

Cette rubrique est conçue pour vous aider à préparer efficacement cet exercice pratique. Nous vous recommandons de réhydrater et diluer l'antigène et l'anticorps primaire au maximum 3 jours avant la séance et l'anticorps secondaire moins de 24 heures avant la séance. Ces réactifs doivent être conservés dans le réfrigérateur ou dans de la glace s'ils ont été préparés plus de 4 heures avant le TP.

Il est essentiel que les élèves mettent les bons composants dans les bons puits de dosage, et ceci dans le bon ordre ; par conséquent, il est crucial pour la réussite de l'exercice, que les tubes soient clairement étiquetés et correctement codés par couleur.

### Objectifs

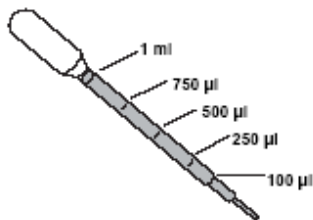
- Étape 1. Préparer des solutions tampon
- Étape 2. Réhydrater l'antigène lyophilisé, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire
- Étape 3. Diluer les réactifs
- Étape 4. Distribuer les réactifs aux postes de travail
- Étape 5. Préparer les postes de travail

**Temps nécessaire** 1 à 3 heures

**Remarque :** si vous envisagez d'utiliser ce kit pour plusieurs sessions de TP, sur une période de 1 ou 2 semaines, nous vous recommandons fortement d'utiliser de l'eau stérilisée pour préparer la solution tampon PBS afin d'éviter de contaminer les réactifs. (L'eau peut être stérilisée en la portant à ébullition dans un four à micro-ondes plus de 5 minutes dans une bouteille bouchée, sans trop serrer ; après avoir retiré la bouteille du four à micro-ondes, la laisser refroidir puis resserrer le bouchon). Diluer uniquement la quantité d'anticorps et d'antigènes nécessaires pour chaque séance de travaux pratiques. Les anticorps réhydratés sont des concentrats à 50x. Stocker les antigènes et anticorps concentrés restant dans le réfrigérateur à 4°C. Il est déconseillé de stocker l'anticorps et l'antigène concentrés pendant plus de 2 semaines, même à 4°C. Ne pas congeler les solutions.

### Mesures des volumes

Ce kit contient des pipettes de transfert en plastique jetables graduées à utiliser pour préparer certains réactifs lorsque des volumes entre 250 microlitres ( $\mu\text{l}$ ) et 5 millilitres (ml) sont nécessaires. Par ailleurs, des micro-pipettes à volume ajustable ou fixe sont nécessaires pour assurer des volumes de 50  $\mu\text{l}$ . L'illustration montre les graduations correspondant aux volumes à mesurer. Des volumes supérieurs à 1 ml exigeront des ajouts multiples. Pour chaque étape de la préparation du TP, utiliser une nouvelle pipette ou un nouveau cône.



Pour mesurer des liquides qui contiennent des détergents qui moussent (par ex., le tampon de lavage) vous devez lire le volume au niveau de l'interface entre le liquide et les bulles.

## Guide de préparation - déroulement pas à pas

Ce guide est destiné à préparer 12 postes de travail, chacun avec 4 élèves.

### Étape 1. Préparer les solutions tampon

Nous vous recommandons d'utiliser une éprouvette graduée de 1 litre et une de 100 ml pour préparer les solutions tampon. Vous aurez également besoin d'1 litre d'eau distillée.

- a. Préparer 100 ml de PBS 1x. Dans l'éprouvette de 100ml, verser 10 ml de PBS 10x , complétez à 100mL avec 90 ml d'eau distillée et mélanger. Etiqueter le conteneur « PBS 1x».

*Le PBS est utilisé pour réhydrater les trois composants lyophilisés en étape 2 et pour diluer l'ANTIGÈNE en étape 3.*

- b. Préparer 900 ml de solution tampon de lavage. Dans l'éprouvette de 1L, verser 90 ml de PBS 10x et 4,5 ml de Tween 20 10%, compléter à 900ml avec de l'eau distillée et mélanger. Etiqueter le conteneur « solution tampon de lavage ».

*La solution tampon de lavage est utilisée pour diluer les ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES en étape 3.*

### Étape 2. Réhydrater l'antigène, l'anticorps primaire et l'anticorps secondaire lyophilisés.

- b. Réhydrater les antigènes et les anticorps dans du PBS 1x. Retirer délicatement les bouchons des trois réactifs lyophilisés et utiliser une pipette pour ajouter 0,5 ml de PBS 1x à chacun. **(Utiliser une nouvelle pipette pour chacun.)** Fermer les flacons et agiter pour mélanger. Ces solutions sont concentrées à 50x. **Remarque : à ce stade vous ne devez pas utiliser la solution tampon de lavage.**

### Étape 3. Diluer les réactifs.

- a. Diluer l'antigène. Etiqueter une bouteille de 30 ml « antigène 1x » et ajouter 24,5 ml de PBS 1x à la bouteille. Utiliser une pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTIGÈNES réhydratés au PBS 1x et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec du réactif dilué et s'assurer que la totalité de l'antigène est utilisée. Fermer le bouchon et agiter pour mélanger. **Remarque : vous ne devez pas ajouter de solution tampon contenant du Tween 20 à l'antigène, sinon l'expérience ne fonctionnera pas.**
- e. Diluer l'anticorps primaire. Etiqueter une bouteille de 30 ml « anticorps primaire 1x » et ajouter 24,5 ml de **solution tampon de lavage** dans la bouteille. Utiliser une nouvelle pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTICORPS PRIMAIRE réhydraté à la bouteille et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec une certaine quantité de réactif dilué pour s'assurer que la totalité de l'anticorps est utilisée. Fermer le bouchon et agitez pour mélanger.
- f. Diluer l'anticorps secondaire. Diluer l'anticorps secondaire moins de 24 heures avant le démarrage du TP. Etiqueter une bouteille de 30 ml « anticorps secondaire 1x » et ajoutez 24,5 ml de **solution tampon de lavage** dans la bouteille. Utiliser une nouvelle pipette pour ajouter le contenu du flacon d'ANTICORPS SECONDAIRE réhydraté à la bouteille et utiliser la pipette pour rincer le flacon avec une certaine quantité de réactif dilué pour s'assurer que la totalité de l'anticorps est utilisée. Fermer le bouchon et agiter pour mélanger.

#### Étape 4. Distribuer les réactifs aux postes de travail.

- Distribuer les témoins positifs. Etiqueter 12 tubes violets avec « + » et ajouter à chacun 0,5 ml de solution d'anticorps primaire 1x.
- Distribuer les témoins négatifs. Etiqueter 12 tubes bleus avec « - » et ajouter à chacun 0,5 ml de solution tampon de lavage.
- Distribuer l'antigène. Etiqueter 12 tubes verts « AG » et ajouter à chacun 1,5 ml d'antigène 1x.
- Distribuer l'anticorps secondaire. Etiqueter 12 tubes orange « AS » et ajouter à chacun 1,5 ml de solution d'anticorps secondaire 1x.
- Distribuer le substrat enzymatique. Etiqueter 12 tubes bruns « SUB » et ajouter 1,5 ml de substrat enzymatique HRP (TMB) à chacun. Remarque : le TMB est sensible à la lumière, il est donc important d'utiliser des tubes sombres pour stocker ce réactif.
- Distribuer l'anticorps primaire (échantillons de sérum simulé). Nous vous recommandons de faire en sorte que 50% de vos élèves aient un test positif et 50% aient un test négatif. Toutefois, c'est à vous que revient le choix final du ratio. Préparez un échantillon de sérum simulé pour chaque élève de votre classe. Pour un ratio de 50/50 dans votre classe, ajoutez 0,25 ml de solution de d'anticorps primaire 1x à 24 tubes jaunes sans étiquette et 0,25 ml de tampon de lavage à 24 tubes jaunes sans étiquette. Mélangez les tubes.

#### Étape 5. Préparer les postes de travail

#### Liste de contrôle des postes de travail

Un poste de travail pour 4 élèves.

| Élément (étiquette)   | Contenu  | Numéro          | (√)                      |
|---|--|-----------------|--------------------------|
| Tube jaune  | Echantillons test des élèves (0,25 ml)                               | 4 (1 par élève) | <input type="checkbox"/> |
| Tube violet (+)   | Témoin positif (0,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube bleu (-)   | Témoin négatif (0,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube vert (AG)  | Antigène purifié (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube orange (AS)  | Anticorps secondaire (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Tube brun (SUB)   | Substrat enzymatique (1,5 ml)  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Bandes de micro-plaques à 12-puits  |  | 2               | <input type="checkbox"/> |
| Micro-pipettes à volume fixe 50 µl ou micro-pipettes ajustables 20 à 200 µl |  | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Cônes jaunes  |  | 10 à 20         | <input type="checkbox"/> |
| Pipettes de transfert en plastique jetables                                 |  | 5               | <input type="checkbox"/> |
| Solution tampon de lavage 70 à 80 ml dans bécher                            | Soluté physiologique tamponné par les phosphates avec Tween 20 0,05% | 1               | <input type="checkbox"/> |
| Pile de serviettes en papier  |  | 2               | <input type="checkbox"/> |
| Marqueur noir   |  | 1               | <input type="checkbox"/> |

**Points d'arrêt :** même si cette procédure est conçue pour s'intégrer dans la durée d'une seule séance, si vous désirez arrêter la séance de TP, vous pouvez ajouter de la solution tampon de lavage aux puits de micro-plaques à tout stade après l'ajout d'antigènes et avant l'ajout de substrat enzymatique et placer les bandes de micro-plaques et tous les réactifs dans le réfrigérateur pour la nuit, à une température de 4°C.

## Réponses des enseignants aux questions clefs et sujets de discussion

### Questions clefs avant la séance de TP

#### 1. Comment le système immunitaire nous protège-t-il des maladies ?

Le système immunitaire comporte des barrières physiques, telles que la peau et les membranes muqueuses qui empêchent les pathogènes de pénétrer dans le corps, et des réponses cellulaires, telles que la circulation des macrophages qui répondent aux intrus. Notre système immunitaire acquis monte une réponse d'anticorps spécifique lorsque notre corps est exposé à un intrus et nos cellules immunitaires attaquent l'intrus.

#### 2. Comment le médecin utilise-t-il la réponse immunitaire pour nous protéger des maladies ?

Les médecins utilisent la réponse immunitaire lorsqu'ils nous vaccinent contre certaines maladies. Notre système immunitaire mémorise les pathogènes auxquels nous avons été exposés et lors de l'exposition suivante aux pathogènes, notre système immunitaire les attaque plus rapidement et efficacement. Les médecins tirent parti de l'effet d'amorce en nous exposant aux pathogènes inactivés (organismes tués ou affaiblis qui ne peuvent pas nous rendre malades) de sorte que si nous sommes exposés ultérieurement aux pathogènes actifs, notre corps montera une réponse d'anticorps puissante et immédiate, réduisant ou éliminant les risques d'être contaminés par la maladie.

#### 3. Pouvez-vous nous donner un exemple de maladie qui s'attaque au système immunitaire de l'homme ?

Les maladies qui s'attaquent au système immunitaire de l'homme comportent les maladies auto-immunes (par ex. arthrite rhumatoïdale, lupus, asthme, eczéma, déficit immunitaire avec défaut d'expression des molécules HLA) et SIDA.

#### 4. Quels problèmes peuvent empêcher le système immunitaire de fonctionner correctement ?

Les problèmes du système immunitaire se subdivisent en trois catégories : hypersensibilité, immunodéficience et maladies auto-immunes. L'hypersensibilité intervient lorsque le système immunitaire réagit de manière trop violente à un antigène ; les réactions de l'hypersensibilité comportent des réactions anaphylactiques, des allergies et la sensibilité au contact (par ex. la réaction au sumac vénéneux). L'immunodéficience signifie qu'un individu ne peut pas monter une réponse immunitaire efficace. L'immunodéficience peut être génétique (par ex. déficit immunitaire avec défaut d'expression des molécules HLA ou maladie du « bébé bulle ») ou induite par une maladie (par ex. immunodéficience due à une infection par le VIH) ou par des médicaments immunodépresseurs (par ex., médicaments administrés après une transplantation d'organe pour prévenir le rejet). Une maladie auto-immune vient d'un système immunitaire qui se monte de manière inappropriée une réponse immunitaire à lui-même, par exemple, les maladies telles que le lupus érythémateux disséminé (lupus, LED), l'arthrite rhumatoïdale, la sclérose en plaques, les diabètes insulino-dépendants et la maladie coeliaque.

#### 5. Pourquoi est-il important de détecter les anticorps chez les gens qui n'ont pas l'air malades ?

C'est important parce que les gens peuvent être porteurs de la maladie, même s'ils ne sont pas malades eux-mêmes. La fièvre typhoïde est un exemple de maladie qui a des porteurs chroniques ; jusqu'à 5% des individus infectés par la fièvre typhoïde excrètent les bactéries pendant un an. Par exemple, dans le cas historique de la Typhoïde Mary, Mary Mallon a contaminé 47 personnes avec la fièvre typhoïde sur 15 ans, même si elle n'a jamais été malade elle-même.

Le virus West NILE (WNC) est un autre bon exemple de l'importance de détecter les anticorps chez des gens qui ne sont pas malades. Le WNC se propage par les moustiques. La plupart des personnes qui sont infectés par ce virus ne présentent pas de symptômes ou de très légers symptômes. Pour obtenir une véritable image de l'épidémiologie du virus West Nile, il est nécessaire de tester les anticorps contre le WNC chez des individus beaucoup plus nombreux que les quelques uns qui développent les symptômes. Par exemple, si une personne dans une rue est atteinte du WNC, si l'on teste tous ses voisins on peut constater que des douzaines ont été infectées par le virus sans tomber malades. Des informations sur les taux d'infection, pas simplement sur les taux de maladie, sont nécessaires pour obtenir une image précise de la maladie.

Pour une maladie telle que le VIH/SIDA, il est crucial de détecter très tôt l'infection. Les personnes infectées par le VIH peuvent n'avoir aucun symptôme pendant de nombreuses années, mais si elles commencent le traitement avant le déclenchement de la maladie, l'apparition des symptômes peut être repoussée indéfiniment. Par ailleurs, durant la phase asymptomatique de l'infection, les individus infectés par le VIH et ignorant leur infection ont pu transmettre le virus à d'autres personnes avec lesquelles ils ont eu des contacts intimes.

**6. Que signifie ELISA ?**

Enzyme-linked immunosorbent assay.

**7. Pourquoi les enzymes sont-elles utilisées dans ce dosage immunitaire ?**

Les enzymes permettent de voir si l'anticorps primaire s'est attaché à sa cible (antigène) dans le puits de micro-plaques. Les anticorps primaires et secondaires sont invisibles, une méthode de détection est donc nécessaire. L'enzyme, la peroxydase de raifort (HRP) est liée à l'anticorps secondaire. La HRP réagit avec un substrat incolore dans une réaction chimique qui vire au bleu. Si l'anticorps secondaire est présent dans le puits, le changement de couleur indique un résultat positif.

**8. Pourquoi avez-vous besoin de doser des échantillons témoins positifs et négatifs ainsi que des échantillons expérimentaux ?**

Les témoins sont nécessaires pour s'assurer que l'expérience a fonctionné. S'il n'y a pas de témoin positif et si l'échantillon est négatif, nous ne pouvons savoir si l'échantillon était véritablement négatif ou si le dosage n'a pas fonctionné. À l'inverse, sans témoin négatif, il n'y a aucun moyen de savoir si tous les échantillons (positifs ou non) auraient donné un résultat positif.

**Questions clefs après la séance de TP**

**10. Est-ce que votre sérum contenait des antigènes de la maladie ?**

Les élèves donnent des explications en utilisant les données provenant de leurs résultats.

**11. Si votre test a donné un résultat positif aux anticorps, est-ce que cela signifie que vous avez été exposé à la maladie ?**

Un résultat positif ne signifie pas forcément que vous avez été exposé à la maladie.

**12. Comment pourrait-on expliquer un résultat positif alors que vous n'avez pas en fait la maladie ?**

Cela peut être un faux positif. Tous les dosages ne sont pas spécifiques à un seul agent pathogène. Par exemple, le test ELISA pour l'exposition à la maladie de Lyme, qui teste l'IgG et l'IgM contre les bactéries qui causent la maladie, a une spécificité de 72% seulement et un ELISA positif doit être confirmé par un test plus spécifique, tel qu'un transfert de type western.

Une autre cause de faux positifs est une exposition passée à une maladie. Par exemple, la plupart des adultes ont été exposés au virus d'Epstein-Barr (EBV) (la cause de nombreuses mononucléoses, mais pas de toutes) et certaines personnes maintiennent des niveaux d'anticorps à l'EBV pendant des années après avoir éliminé la maladie. S'ils se présentent à leur médecin avec une fièvre et une angine, ils peuvent donner un résultat positif au test de l'EBV sans que l'EBV soit la cause de leurs symptômes.

Une troisième cause de faux positifs est une erreur expérimentale, par exemple mettre une référence positive dans un puits alors que vous pensiez avoir mis un échantillon expérimental.

**13. Pourquoi avez-vous effectué un dosage de vos échantillons en triple ?**

Effectuer le dosage des échantillons en trois exemplaires est un autre contrôle. Si vous n'obtenez pas les mêmes résultats dans les trois puits, votre technique expérimentale a sans doute un problème ou vous avez fait une erreur de pipette. Dans un laboratoire clinique, l'expérience devrait être reprise. Si cette erreur intervient dans cette activité, prenez le résultat des deux puits qui coïncident car il est sans doute correct.

**14. Lorsque vous avez ajouté les échantillons de sérum aux puits, qu'est-il arrivé aux anticorps de sérum si l'échantillon était positif? S'il était négatif ?**

Les anticorps de sérum qui reconnaissent les antigènes purifiés dans le puits se sont liés à l'antigène. Si l'échantillon est négatif, aucun anticorps ne s'est lié.

**15. Pourquoi faut-il nettoyer les puits après chaque étape ?**

Le lavage retire les protéines qui ne se sont pas liées aux puits en plastique et tous les anticorps qui ne se sont pas liés à leurs cibles, empêchant, par là même, les protéines non liées (antigènes ou anticorps) de donner des résultats faux positifs.

**16. Lorsque vous ajoutez l'anticorps secondaire, qu'arrive-t'il si votre échantillon de sérum est positif ? S'il est négatif ?**

Si l'échantillon est positif, l'anticorps secondaire s'est lié aux anticorps du sérum qui s'étaient liés à l'antigène purifié absorbé par les puits. Si l'échantillon est négatif, il n'y avait pas d'anticorps de sérum liés dans les puits et, par conséquent, les anticorps secondaires n'avaient rien sur quoi se lier et ont été lavés.

**17. Quels tests de type ELISA pouvez-vous acheter dans votre pharmacie locale ?**

Les kits de test qui s'appuient sur les mêmes principes qu'ELISA comportent les tests de détection de grossesse ou d'ovulation à domicile et les tests pour détecter la présence de drogues illégales telles que la marijuana et la cocaïne.

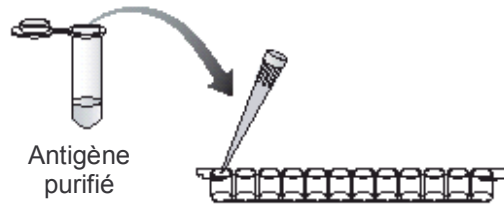
## Mode opératoire du TP

### Test des anticorps avec ELISA

1. Etiqueter les tubes jaunes (si besoin) pour identifier les échantillons qui sont testés.
2. Etiqueter votre bande de 12 puits. Inscrivez "+" pour les témoins positifs des trois premiers puits de chaque bande et un "-" pour les trois puits suivants pour les témoins négatifs. Etiqueter les puits restants pour identifier les échantillons qui sont testés (3 puits chacun).

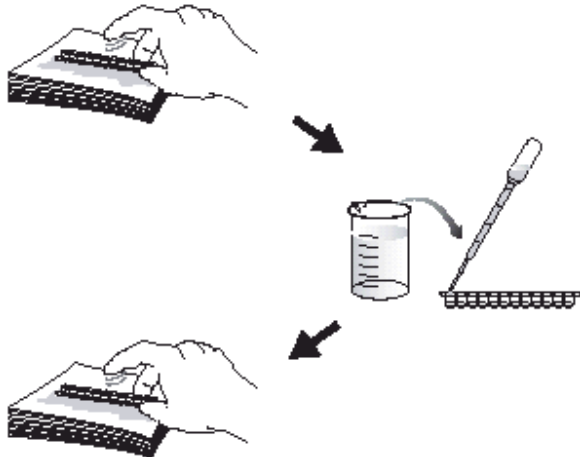


3. Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl d'antigène purifié (AG) dans les 12 puits de la bande de microplaques.
4. Attendre 5 minutes que les antigènes se lient aux puits en plastique.

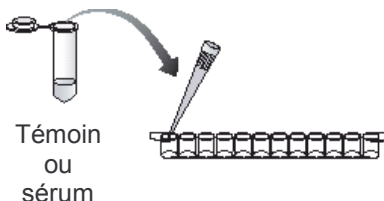


### 5. LAYER

- a. Renverser la bande de micro-plaques sur les serviettes en papier et taper délicatement la bande à plusieurs reprises, à l'envers.
- b. Jeter la serviette en papier du haut de la pile.
- c. Utiliser une pipette de transfert pour remplir chaque puits avec la solution tampon de lavage.
- d. Renverser la bande de micro-plaques sur les serviettes en papier et tapoter.
- e. Jeter les 2 à 3 serviettes du haut de la pile.

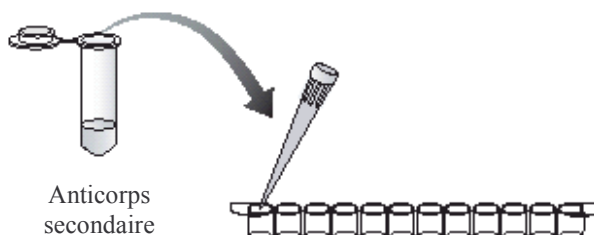


6. Utiliser un nouveau cône pour transférer 50 µL de témoin positif (+) dans les trois puits (+).
7. Utiliser un nouveau cône pour transférer 50 µL de témoin négatif (-) dans les trois puits (-).
8. Transférer 50 µl de votre échantillon de sérum dans les trois puits ayant vos initiales, en utilisant un nouveau cône pour chaque échantillon de sérum.



9. Attendre 5 minutes que les anticorps se lient à leurs cibles.
10. Laver les anticorps primaires non liés des puits en répétant la totalité de l'étape de lavage 5
11. Utiliser un nouveau cône pour transférer 50 µl d'anticorps secondaires (AS) dans les 12 puits de la bande de microplaques.

## LAVAGE



12. Attendre 5 minutes que les anticorps se lient à leurs cibles.
13. Laver les anticorps secondaires non liés des puits en répétant **à deux reprises** le lavage de l'étape 5.

## LAVAGE 2X

14. Utiliser un nouveau cône de pipette pour transférer 50 µl de substrat enzymatique (SUB) dans les 12 puits de la bande de microplaques.
15. Attendre 5 minutes. Observer et consigner les résultats.

