

TP 4 : Les tests immunologiques. Ouchterlony, La méthode ELISA et le Sérodiagnostic de la syphilis

Situation initiale : Les anticorps sont spécifiques à un antigène donné.

Questions : Comment utiliser cette propriété pour élaborer des tests de dépistage de maladies ?

I – Le test d'Ouchterlony : recherche d'un antigène

Dans les laboratoires produisant des anticorps pour la recherche, la spécificité de ces anticorps doit être contrôlée avant utilisation. Des lapins reçoivent par injection un antigène. Après quelques temps, des anticorps sont isolés de leur sérum.

On cherche à vérifier la spécificité de ces anticorps par la méthode d'Ouchterlony en identifiant l'antigène contre lequel ils sont dirigés.

Matériel :

- papier absorbant, gants, lunettes
- une petite boîte de Pétri ; un tube emporte-pièce et un cure-dent ;
- un marqueur ; un gabarit de perçage fourni à l'étape 2 ; un récipient poubelle (ou feuille d'essuie-tout) ;
- solution d'anticorps isolés du sérum du lapin injecté (tube n°0) ;
- 5 produits correspondant à des antigènes protéiques : albumine humaine (1), globuline humaine (2), sérum humain (3), albumine de lapin (4), albumine de bœuf (5) ;
- une micropipette avec embouts ou un compte-goutte pour chaque produit ;
- une petite feuille de papier noir pour l'observation des résultats.

Principe de la méthode d'Ouchterlony : test d'immunodiffusion sur gel

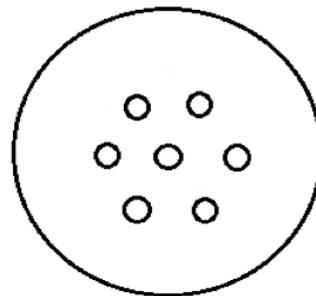
Les solutions déposées dans des puits creusés dans le gel diffusent de façon homogène **dans toutes les directions** autour des puits. Deux auréoles de diffusion peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé. Cette zone de contact reste invisible s'il n'y a pas de réaction entre les deux solutions. En revanche, elle se traduit par un **arc de précipitation** visible à l'œil nu lorsque les deux solutions réagissent, c'est-à-dire si elles forment un **complexe non soluble dans le gel**.

Le temps de réaction est de l'ordre de 24h avec des produits biologiques, mais il est considérablement réduit avec les produits de substitution : c'est la raison pour laquelle vous pourrez lire vos résultats pendant la séance.

PROTOCOLE

I - PREPARATION DE LA BOITE

Utilisez le modèle de perçage ci-contre pour **réaliser** à l'aide du tube emporte pièce et éventuellement un cure-dent, les puits nécessaires dans le gel d'agar.



II - REALISATION DES DEPOTS

1. Avec le marqueur faites un trait sur le côté de la boîte en face d'un puits.
2. Effectuez les dépôts dans la boîte : avec le compte-goutte mettez dans chaque puits 2 gouttes environ de produit (*chaque puits est presque plein mais ne doit pas déborder*) comme suit :
 - dans le puits central, la solution d'anticorps isolés du sérum du lapin injecté.
 - dans les puits périphériques, mettez les produits dans l'ordre que vous voulez mais en partant du puits marqué et en tournant dans le sens des aiguilles d'une montre. Notez bien évidemment cet ordre !
3. Fermez la boîte et placez-la sur le papier noir.
3. Schématisez votre boîte légendée
4. Observez les résultats au bout de 35-40 minutes.
5. Complétez le schéma de votre boîte avec les résultats.

Questions posées au bac :

Dans chaque cas (formation de l'arc de précipitation, ou absence d'arc), **réaliser un schéma d'interprétation** à l'échelle moléculaire, en utilisant le symbole proposé dans la fiche réponse-candidat et d'autres à votre convenance. **Déduire** de l'ensemble des résultats si la spécificité du lot d'anticorps a été vérifiée et quel antigène a été injecté. **Préciser** quels contrôles supplémentaires permettraient au laboratoire de valider ce lot d'anticorps en vue de son utilisation pour la recherche.

II – La méthode ELISA

1 – Le principe

Le test ELISA est un test immunologique classiquement utilisé pour la détection et le dosage protéique. C'est également une des deux techniques utilisées lors du test de dépistage du virus du SIDA.

Au cours de ce TP, nous allons mettre en évidence la présence d'anticorps anti-BSA dans un sérum à l'aide d'un support tapissé de BSA (Bovine Serum Albumin) et d'un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase.

- La première étape, déjà effectuée lors de l'achat des barrettes, est nommée « coating ». Durant cette étape la BSA va se fixer au fond des cupules.
- La deuxième étape correspond à la fixation de l'anticorps à mettre en évidence, on incube dans les cupules 2 gouttes (80µL) de la solution à tester durant 15 minutes. Puis les cupules sont lavées avec un tampon pour enlever les quelques anticorps non fixés.
- Lors de la troisième étape, l'anticorps de détection (ou conjugué) se fixe à l'anticorps anti-BSA. Il est couplé à une enzyme : la peroxydase. Deux gouttes (80µL) de solution d'anticorps de détection sont incubées dans les cupules durant 15 minutes. Puis les cupules sont lavées avec un tampon pour enlever les quelques anticorps non fixés.
- La dernière étape est la détection des anticorps fixés. On incube dans les cupules une solution révélatrice contenant un substrat de la peroxydase : le TMB (Tetra-Méthyl-Benzidine) qui se colore en bleu en présence de l'enzyme. **L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité de peroxydase présente dans la cupule, donc directement proportionnelle à la concentration d'anticorps à doser.**

2 – Protocole

Note : chaque barrette comporte 8 cupules. Ces puits sont utilisés deux par deux.

- Avec une pipette, déposez dans chaque puits :
 - Puits 1 et 2 : deux gouttes d'eau distillée
 - Puits 3 et 4 : deux gouttes de solution d'anticorps anti-BSA C1
 - Puits 5 et 6 : deux gouttes de solution 1 à tester
 - Puits 7 et 8 : deux gouttes de solution 2 à tester.
- Après 15 minutes d'incubation, lavez avec le tampon PBS (à faire 4 fois)
- Ajoutez dans chaque puits 2 gouttes de solution d'anticorps de détection.
- Après 15 minutes d'incubation, lavez avec le tampon PBS (à faire 4 fois)
- Déposez dans chaque puits deux gouttes de TMB

3 – Compte-rendu

a – Le principe

-Etablissez sous forme de schémas le protocole du TP (attention aux temps d'incubation et de révélation, ainsi qu'aux lavages à effectuer).

-A quoi servent les puits 1 et 2 ? les puits 3 et 4 ?

-Pourquoi qualifie-t-on également la technique ELISA, la méthode sandwich ? En faire une représentation schématique.

-Justifiez l'affirmation repérée en gras dans la dernière étape du I – Principe.

b – Résultats

Représentez la barrette avec les colorations obtenues et interprétez les résultats.

III – Le Sérodiagnostic de la Syphilis

La syphilis, maladie hautement contagieuse, est essentiellement transmise au cours des rapports sexuels et par voie transplacentaire. Il s'agit d'une maladie bactérienne causée par le Tréponème pâle. Un test utilisant des antigènes de syphilis (VDRL) permet d'établir un diagnostic à partir d'un sérum d'un individu.

On se propose de déterminer si un individu est séropositif pour la syphilis.

1 – Un peu de théorie

–Qu'entend-on par « individu séropositif pour la syphilis » ?

–Justifier l'utilisation de trois sérums (S, S1 et S2).

2 – Protocole

A l'aide du matériel ci-dessous, imaginer un protocole qui permette de déterminer si un individu est séropositif pour la syphilis.

Matériel : plaque de dépôts, 3 cures dents, un flacon de VDRL, sérum S de l'individu à tester, sérum S1 d'un individu non atteint, sérum S2 d'un individu atteint, 4 pipettes pasteur, marqueur, montre.

Note : parmi les antigènes tréponémiques qui déclenchent la formation d'anticorps spécifiques, se trouvent des phospholipides. Le VDRL latex, utilisé ici, est constitué de particules de latex sur lesquelles sont fixés les phospholipides tréponémiques.

3 – Observations

–Observer les résultats au microscope

–Identifier le ou les résultats positifs

4 – Interprétation

–Représenter par un schéma les associations moléculaires obtenues dans les trois tests réalisés. Utiliser pour cela les symboles proposés sur le document annexe.

–Dédire de la lecture des résultats si l'individu est séropositif pour la syphilis