

Activité 3 : Dosage d'anticorps par le test ELISA

La fièvre jaune (fièvre hémorragique) est une maladie grave qui est causée par un virus transmis par la piqure de moustique (présent dans les zones équatoriales). Pour pouvoir effectuer un séjour en Guyane, les voyageurs doivent être vaccinés (et donc immunisés contre le virus de la fièvre jaune).

Marion et son compagnon Pierre se sont fait vacciner il y a 9 ans contre la fièvre jaune. Ils doivent se rendre en Guyane et souhaitent savoir s'ils sont encore immunisés.

Objectif : Déterminer comment, à l'aide du test ELISA (enzyme Linked immunosorbent assay), il est possible de doser les anticorps.

Principe du test ELISA : ce test est utilisé pour **détecter** et **doser** la quantité d'anticorps spécifiques à un antigène dans le sérum d'un patient. Il s'agit d'une réaction immuno-enzymatique qui fait apparaître une **coloration** si le sérum testé contient les anticorps recherchés on dit alors que le sujet est **séropositif**. Pour doser la quantité d'anticorps, il suffit de faire une comparaison colorimétrique par rapport à une gamme étalon. Le seuil (=concentration plasmatique en anticorps) pour être immunisé contre la fièvre jaune est de 1.06 µg.mL⁻¹

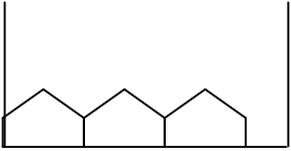
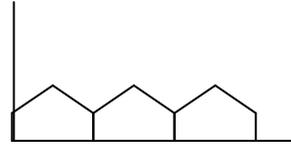
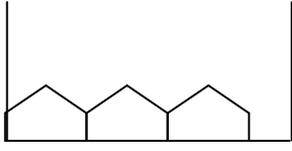
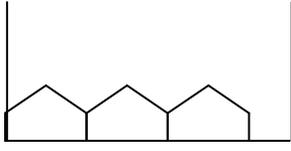
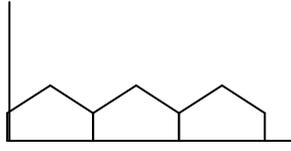
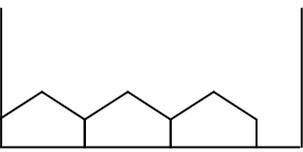
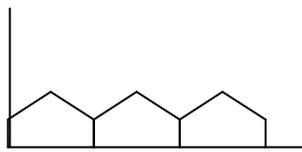
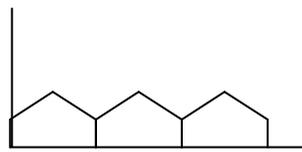
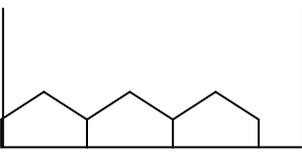
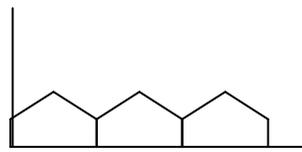


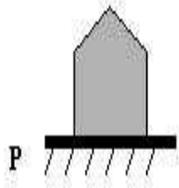
Consigne :

- 1- Proposer une stratégie de résolution réaliste (3 étapes) pour répondre au problème.
Appeler le professeur pour obtenir le protocole.
- 2- Mettre en œuvre le protocole fourni en suivant les indications de la fiche technique. Répondre aux questions 3 et 4 pendant les temps d'attente.
- 3- Préciser l'intérêt du test avec le sérum de la personne non immunisée et la dose seuil de protection.
- 4- Justifier les temps d'incubation des étapes 2 et 7 du protocole et les lavages successifs.
Appeler le professeur pour vérification des résultats.
- 5- En vous aidant de la planche de schémas proposés au verso, complétez les schémas ci-dessous (témoin négatif et personne immunisée) représentant les différents stades de la manipulation.
- 6- Représentez les résultats de la façon la plus judicieuse.
- 7- Décrire et interpréter les résultats pour répondre à la problématique (3 étapes).

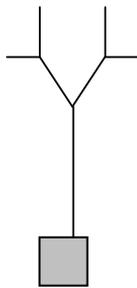
Critères d'évaluation :

Stratégie de résolution	<i>Ce que je fais</i>	1 pt
	<i>Comment je le fais</i>	1 pt
	<i>Ce que j'attends</i>	1 pt
Mise en œuvre du protocole	<i>Respect des étapes</i>	2 pts
	<i>Utilisation correcte du matériel</i>	2 pts
	<i>Résultats cohérents</i>	2 pts
	<i>Rangement et nettoyage</i>	1 pt
Question 3		1 pt
Question 4		1 pt
Question 5		2 pts
Tableau des résultats d'expérience	<i>Bien construit, bien remplis, titré</i>	3 pts
Interprétation	<i>Je vois que</i>	1 pt
	<i>Or je sais que</i>	1 pt
	<i>Donc j'en déduis que</i>	1 pt

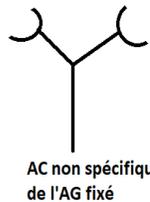
	Incubation avec le sérum	Après le premier lavage	Ajout de l'Ac2	Après le 2 ^{ème} lavage	Ajout du TMB et lecture du résultat
Témoin négatif					
Personne contaminée (donc possédant des anticorps)					



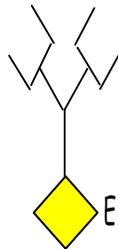
Antigène fixé au fond du puits (P)



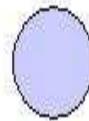
Anticorps AC1 spécifique de l'antigène



AC non spécifique de l'AG fixé



Anticorps conjugué AC2, associé à l'enzyme peroxydase (E)



Substrat de l'enzyme peroxydase

Dans la pratique, on utilise des plaques à concavités au fond desquelles sont fixés des antigènes viraux.

Un sérum de patient contaminé (ou vacciné) contient des anticorps spécifiques dirigés contre une protéine du virus (anticorps anti- fièvre jaune = Ac1).

Si ces anticorps sont effectivement présents dans le sérum, ils reconnaissent et se fixent sur l'antigène préalablement fixé au fond du puits.

Pour révéler les Ac1, on utilise des anti-anticorps = Ac2 spécifiques des anticorps Ac1 ; dans le protocole du test ELISA, ils sont fixés à une enzyme E : la peroxydase.

Cette enzyme catalyse une réaction colorée en présence d'un substrat incolore qui devient coloré en présence de l'enzyme. Ainsi, plus il y aura d'anticorps Ac2 dans le puits, plus la solution sera colorée en bleu.