Seropositivité au tétanos ?

Anna s'est blessée dans son jardin avec un outil rouillé. Elle a perdu son carnet de vaccination. Elle se souvient avoir été vacciné mais elle ne se souvient pas quand et quand elle regarde le calendrier de vaccination, elle s'aperçoit qu'il faut renouveler le DT polyo tous les 10 ans.

Mise en situation et recherche à mener

On sait qu'Anna a été vaccinée contre le tétanos à l'aide d'une antitoxine c'est-à-dire un antigène Ag1. Des signes cliniques laissent à penser que sa réponse immunitaire n'est pas suffisamment efficace.

On cherche à déterminer si une sérothérapie est nécessaire, c'est-à-dire s'il faut injecter à ce patient des anticorps (Ac1) spécifiques de Ag1 afin de renforcer sa réaction immunitaire.

Ressources

Document : les propriétés des anticorps

Les anticorps sont des molécules dont les propriétés sont les suivantes :

- Ce sont des protéines qui sont chargées électriquement dès lors qu'elles sont placées dans une solution tampon à un pH défini
- Ce sont des molécules solubles qui se fixent spécifiquement à un antigène. Cette reconnaissance entraîne la formation d'un complexe immun (Ag-Ac) insoluble

- Toutes molécules (anticorps, antigènes…) nécessaires

Matériel envisageable :

- de laboratoire (verrerie, instruments …)
- d'observation (microscope, loupe binoculaire…)
- de mesure et d'expérimentation (balance, chaine ExAO…)
- informatique et d'acquisition numérique
- électrophorèse

Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (durée maximale : 10 minutes)

Proposer une démarche d'investigation permettant de déterminer la concentration en anticorps du sérum de cet individu et donc de savoir si une sérothérapie est nécessaire.

Etape 2 : <u>Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables</u>

Mettre en œuvre le protocole de détection de la présence des anticorps (test de détection moléculaire ELISA), afin de **vérifier** si la vaccination de l'individu a produit une réaction suffisante pour éliminer la totalité des antigènes ou, dans le cas contraire, à quelle concentration ils persistent dans son sang.

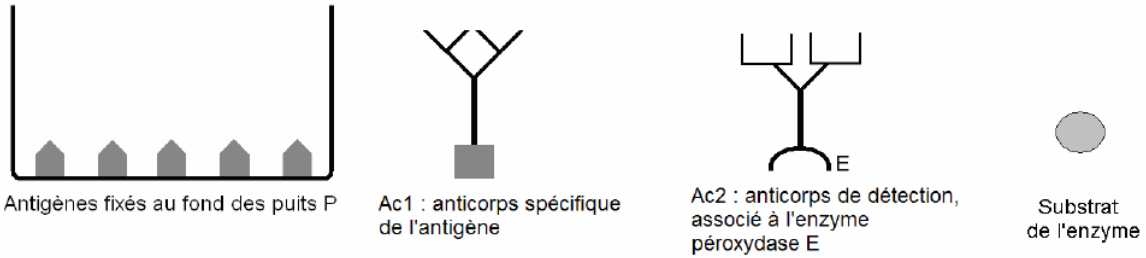
Au point 4 du protocole, **demander les résultats** afin de commencer la présentation des résultats de l'étape 3 mais veiller à **poursuivre le protocole en entier**.

Appeler le professeur pour vérifier les résultats et éventuellement obtenir une aide.

Etape 3 : <u>Présenter les résultats pour les communiquer</u>

En attendant, l'obtention des résultats, faites le schéma du puits C5 et quand vous obtiendrez les résultats, faites le schéma du 8 ème puits correspondant à l'individu à tester

<u>Aide à la représentation :</u>**Planche de représentation permettant la réalisation du schéma explicatif à l'échelle moléculaire :**



Etape 4 : <u>Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème</u>

Exploiter les résultats pour déterminer si la vaccination de l'individu a produit une réaction suffisante pour éliminer la totalité des antigènes ou, dans le cas contraire, à quelle concentration ils persistent dans son sang.

<u>Information complémentaire :</u> Le seuil en dessous duquel l'individu est considéré comme non immunisé est dans notre exemple une concentration de 1,06 mg d'AC. ml -1.

Concentration en **µg d'Ac.mL^{-1}**	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	17,00	8,50	4,25	2,12	1,06	0,53	0,26

Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

Principe :

La technique ELISA (***Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay***) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène (Ag) – anticorps (Ac1 anti-Ag) grâce à une réaction colorée produite pas l'action sur un substrat (réactif d'Ellman) d'une enzyme (E) préalablement fixée à un deuxième anticorps anti-Ac (Ac2).

Matériel disponible :

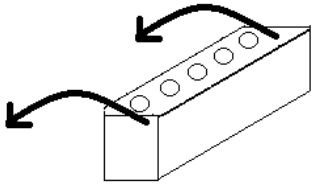
- sérum S de l'individu à tester
- 7 solutions d'anticorps Ac de concentrations décroissantes, notées de C1 à C7 avec : C1 > C2 > C3 > C4 > C5 > C6 > C7
- barrette de puits au fond desquels sont fixés des antigènes (**Ag1**) *permettant de "capturer" Ac*
- solution d'un deuxième anticorps anti-Ac (**Ac2**) de "détection" des Ag fixés : *cet anticorps anti-Ac est associé à une enzyme **E***
- solution du réactif d'Ellman, substrat de l'enzyme qui détecte cette dernière, quand elle est fixée, par apparition d'une coloration *(réaction enzyme-substrat)*
- solution de lavage et une pipette de prélèvement
- gants, lunettes, papier filtre, cuvette ou évier à proximité, micropipettes et embouts jetables (ou équivalent), un feutre permanent, un chronomètre, récipient avec eau de javel pour mettre les embouts usagés

1- **Numéroter** les puits de 1 à 7 et **nommer** S le 8ème puits.
2- **Déposer** 2 gouttes ou 80 µL :
   - de C1 dans le puits 1 (témoin positif), C2 dans le puits 2, etc., jusqu'à C7 (témoin négatif) dans le puits 7 ;
   - du sérum S de l'individu testé, de concentration inconnue, dans le puits S.

   Les niveaux des liquides doivent être, au final, équivalents.

3- **Laisser agir** 10 min à température ambiante

Pendant ce temps d'attente, réaliser le protocole transmission du VIH.



4- **Vider** la barrette en la renversant horizontalement (voir schéma ci-contre) et d'un geste rapide au-dessus de l'évier (ou de la cuvette) de manière à éviter le mélange des produits. Avant de la remettre à l'endroit, **tamponner** la surface des puits sur du papier filtre pour éliminer l'excès de produits et éviter la contamination.
5- **Remplir** tous les puits avec la solution de lavage, sans débordement, et vider immédiatement comme précédemment. **Répéter** 2 fois ce lavage.
6- **Mettre** dans les puits 2 gouttes ou 80 µL de la solution d'anticorps de détection Ac2 sur lequel est déjà fixé l'enzyme.
   Les niveaux doivent être, au final, équivalents.

7- **Laisser** agir 10 minutes

8- **Vider** les puits et les **laver** 2 fois comme au point 6.
9- **Mettre** dans les puits 2 gouttes ou 80 µL de substrat de l'enzyme E. Les niveaux doivent être équivalents au final.
10- Attendre 30 secondes maximum qu'une coloration éventuelle se développe. (Au-delà, tous les puits seront bleus !)

Photographier le résultat et appeler le professeur pour qu'il valide le résultat