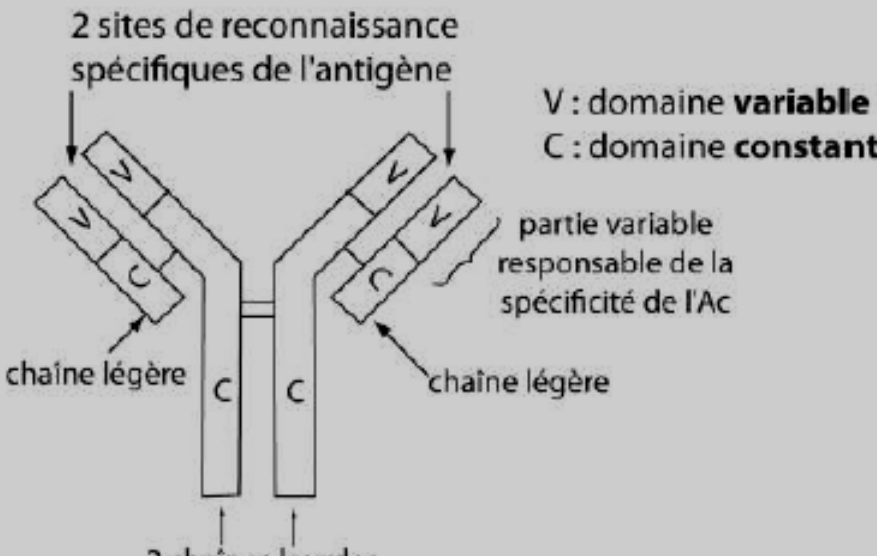


TP 18 : LE PHENOTYPE IMMUNITAIRE

Après une vaccination, l'organisme réagit par la production d'anticorps dirigés contre l'antigène injecté. L'individu est immunisé. Au fil des ans, cette production d'anticorps dirigés contre l'antigène injecté diminue peu à peu. Cependant, une mémoire immunitaire s'est mise en place et lors d'un second contact avec l'antigène, la production d'anticorps sera beaucoup plus rapide et plus importante. Des dosages d'anticorps dans le sérum d'un individu vacciné peuvent être réalisés par l'utilisation du test ELISA. En-dessous d'un certain seuil d'anticorps, l'individu n'est plus suffisamment immunisé et on décidera de renouveler la vaccination.

On cherche à déterminer si un individu doit être ou non, de nouveau vacciné.

Ressources	
	<p>Matériel disponible :</p> <ul style="list-style-type: none"> - anticorps - antigènes - matériel courant de laboratoire (verrerie, instruments, matériel d'observation, de mesures, informatique etc.) <p>Les anticorps sont des protéines chargées électriquement dès lors qu'elles sont placées dans une solution tampon à un pH défini.</p> <p>Les anticorps sont des molécules solubles, qui forment des complexes immuns insolubles (Ag-Ac) en se fixant sur un antigène spécifique.</p>

Ressource complémentaire :

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection des Ac (ici un anticorps lié à une vaccination l'Ac-v). Il permet de visualiser une réaction antigène (Ag) – anticorps (Ac-v) grâce à une **réaction colorée** produite par l'action sur un substrat (réactif d'Ellman) d'une enzyme (E) préalablement fixée à un deuxième anticorps anti-Ag (Ac).

Plus la concentration d'anticorps Ac1 est élevée, plus la coloration est intense.

Le **seuil** en dessous duquel l'individu est considéré comme non immunisé est, dans notre exemple, une concentration de **1,06 µg d'Ac1/mL**.



Concentration	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
en µg d'Ac1/mL	17,00	8,50	4,25	2,12	1,06	0,53	0,26

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

Proposer une stratégie de résolution réaliste permettant de savoir si un individu, en contact avec un antigène, a réagi et produit des anticorps en quantité suffisante pour être protégé.

Étape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

Matériel :

- une barrette de 8 puits au fond desquels sont fixés des antigènes BSA correspondant à ceux injectés lors de la vaccination de l'individu
- 7 solutions d'anticorps Ac1 de concentrations décroissantes appelées C1, C2, C3, C4, C5, C6 et C7
- gants, papier filtre, cuvette ou évier à proximité, micropipettes (ou équivalent), un feutre effaçable, un chronomètre
- sérum S de l'individu à tester
- solution d'anticorps de détection Ac2 = complexe entre anticorps et enzyme
- solution de lavage et une pipette de prélèvement
- solution de substrat de l'enzyme peroxydase = H₂O₂ (l'action de l'enzyme sur ce substrat se traduit par une coloration)
- verre à pied avec javel pour mettre les pipettes usagées

Activité 1 : Expliquer la manipulation

A l'aide du document 1 présentant le principe du test ELISA et de l'animation « Test_ELISA-SORDALAB.swf », **expliquer** l'intérêt d'avoir des solutions d'anticorps Ac1 à différentes concentrations connues.

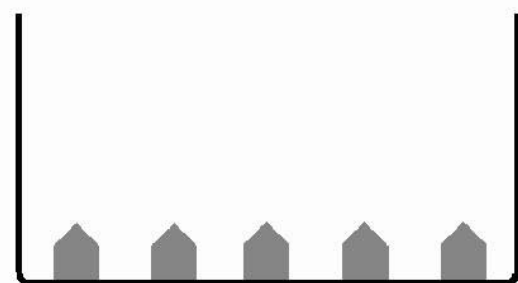
Activité 2 : Réaliser la manipulation

Mettre en œuvre le protocole en suivant les indications du document 2.

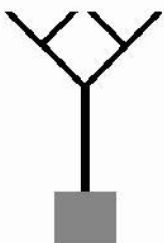
Étape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer

Schématiser les molécules présentes en fin de test dans le puits G et celles présentes dans le puits A. Ces représentations utiliseront les schémas du document 3. Elles rendront compte des associations moléculaires et des concentrations.

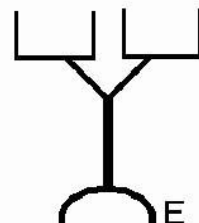
Document 3 : Planche de représentation permettant la réalisation du schéma explicatif à l'échelle moléculaire :



Antigènes BSA
fixés au fond des puits



Ac1 : anticorps spécifique
de l'antigène BSA



Ac2 : anticorps de détection,
associé à l'enzyme
péroxydase E



Produit
coloré



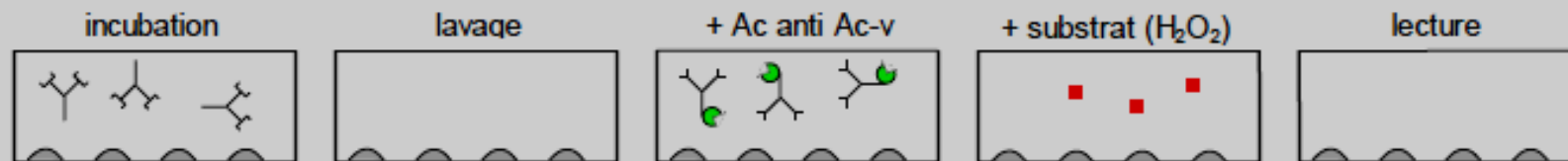
Substrat
de l'enzyme

Étape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Utiliser les résultats obtenus pour déterminer si l'individu doit être ou non, de nouveau vacciné.

Document 1 : Principe du Test EILSA

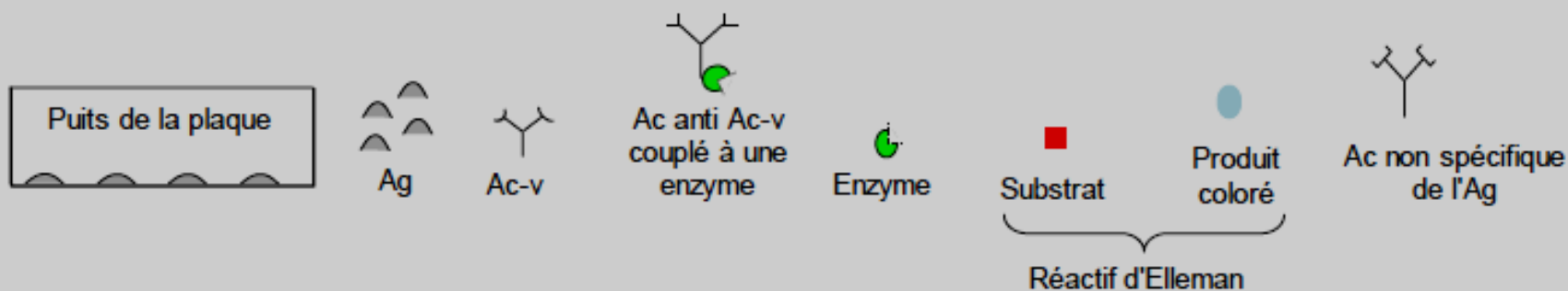
Témoin



Très séropositif



Peu séropositif



Document 2 : PROTOCOLE DU DOSAGE D'ANTICORPS PAR L'UTILISATION DU TEST ELISA

1- **Organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement et en respectant les consignes de sécurité.

2- L'encoche de la barrette du puits permet de repérer le puits A, ou bien vous pouvez le marquer au feutre.

3- **Déposer** 80 μ L (voir fiche technique micropipette) :

- de sérum de lapin immunisé C1 dans le puits A, C2 dans le puits B, etc., jusqu'à C7 dans le puits G ;
- du sérum S de l'individu à tester, de concentration inconnue, dans le puits H.

Consignes de prélèvements et de dépôts des sérums :

- Attention : une seule solution par puits !

- On règle la micropipette de façon à prélever 80 μ L de solution à chaque fois

- On utilisera le même embout de la micropipette pour prélever et déposer les sérums C1, C2, ..., mais en commençant par le sérum de plus faible concentration en anticorps (C7) pour finir par celui de plus forte concentration (C1).

- On utilise 1 embout différent pour le sérum S.

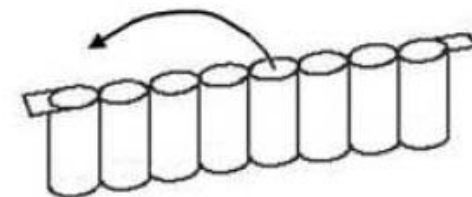
- Lors des dépôts, l'embout de la micropipette ne doit pas toucher le fond du puits.

- Les embouts sont éjectés dans la poubelle au fur et à mesure qu'ils sont utilisés.

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

4- **Laisser incuber** 15 min à température ambiante.

5- **Vider** la barrette en la renversant d'un geste rapide au-dessus de l'évier de manière à éviter le mélange des produits entre puits. **Tout en laissant la barrette en position retournée, tamponner** ensuite les puits sur du papier-filtre pour éliminer l'excès de produits et éviter la contamination entre puits.



6- **Laver** les puits : **remplir doucement** tous les puits au trois quarts avec la solution de lavage, **sans déborder**, et vider immédiatement comme précédemment. On utilisera le même embout de micropipette pour tous les dépôts en veillant **à ne pas toucher** les parois des puits ni les solutions qu'ils contiennent, pour éviter les contaminations. **Répéter** 4 fois ce lavage.

7- **Mettre** dans les puits 80 μ L de la solution d'anticorps de détection Ac2 sur lequel est fixée l'enzyme peroxydase. Les niveaux doivent être, au final, équivalents. **Laisser** incuber 15 minutes.

8- **Vider** les puits et les **laver** 4 fois comme à l'étape 6.

9- **Mettre** dans les puits 160 μ L de substrat incolore de l'enzyme peroxydase. Les niveaux doivent être, au final, équivalents. Une coloration bleue se développe peu à peu. Ne pas attendre pour comparer les colorations car au bout de 5 minutes, les différences s'estompent.