

ATELIER ELISA

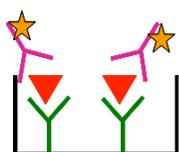
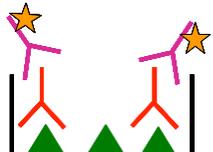
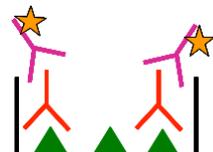
Le matériel utilisé pendant cet atelier a été fourni par :

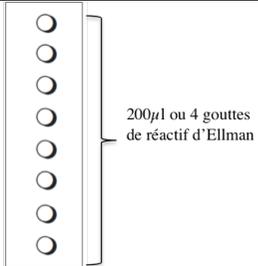
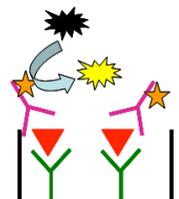
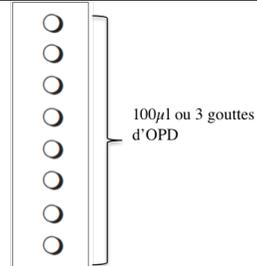
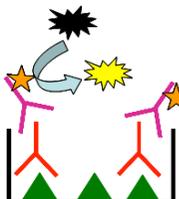
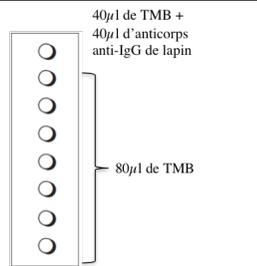
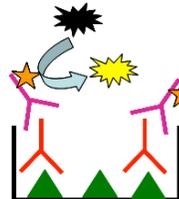
- l'APBG réf : K06ELI ou K07ELI
- Jeulin réf : 11503084
- Sordalab réf : ELISA



Tableau comparatif des protocoles et pistes pédagogiques :

Étape	APBG	Jeulin	Sordalab	Pistes pédagogiques		
				Thème 3-A-1 La réaction inflammatoire	Thème 3-A-2 L'immunité adaptative	Thème 3-A-3 Le phénotype immunitaire au cours de la vie
1) Coating	<p>ELISA sandwich Détection de la b-lactoglobuline (Blg)</p> <p>Plaque déjà coatée avec l'anticorps anti-Blg</p> 	<p>ELISA indirect Détection d'anticorps anti-BSA</p> <p>100µl ou 3 gouttes de solution de BSA 15 min à 30°C</p> 	<p>ELISA indirect Détection d'anticorps anti-BSA</p> <p>Plaque déjà coatée avec la BSA</p> 	Anticorps anti-CRP	Anticorps anti-IL-2	Antigène d'intérêt

<p>2) Dépôt des échantillons</p>	<p>En même temps que l'anticorps couplé</p> <p>100µl ou 2 gouttes de :</p> <ul style="list-style-type: none">  } Témoin négatif  } Témoin positif  } Echantillon 1  } Echantillon 2 	<p>100µl ou 3 gouttes de :</p> <ul style="list-style-type: none">  } Témoin négatif  } Témoin positif  } Echantillon 1  } Echantillon 2 <p>- échantillon 1 : sérum de lapin immunisé par de la BSA - échantillon 2 : sérum de lapin non immunisé</p> <p>15 min à 30°C</p> 	<p>80µl de :</p> <ul style="list-style-type: none">  PBS (témoin positif de réaction)  Solution C1  Solution C2  Solution C3  Solution C4  Solution C5  Solution C6  Solution C7  Témoin négatif (sérum non immunisé) <p>- solutions C1 à C7 : dilutions en cascade de sérum de lapin immunisé par de la BSA</p> <p>15 min à température ambiante</p> 	<p>Sérum de patient pour lequel il y a suspicion d'inflammation</p>	<p>Surnageants de lymphocytes T CD4+ stimulés par des cellules présentatrices d'antigènes</p>	<p>Sérum +/- vaccination</p>
<p>3) Lavages</p>		<p>3x au PBS Tween (100µl ou 3 gouttes)</p>	<p>2x au PBS Tween (volume approximatif à la pipette)</p>			
<p>4) Dépôt de la solution d'anticorps couplés</p>	<p>100µl ou 2 gouttes d'anticorps anti-Blg couplés à l'acétylcholinestérase</p> <p>15-20 min à température ambiante</p> 	<p>100µl ou 3 gouttes d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase</p> <p>15 min à 30°C</p> 	<p>80µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase</p> <p>15 min à température ambiante</p> 	<p>Anticorps anti-CRP couplé à la peroxydase</p>	<p>Anticorps anti-IL-2 couplé à la peroxydase</p>	<p>Anticorps anti-Ig couplé à la peroxydase</p>

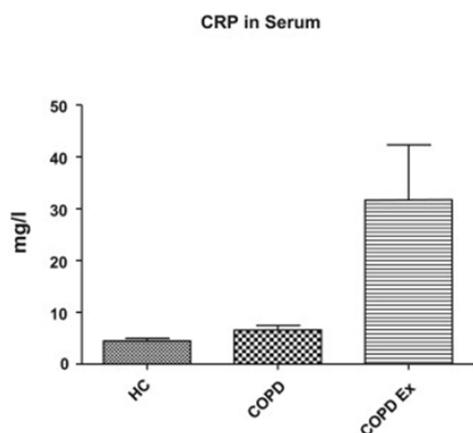
Étape	APBG	Jeulin	Sordalab	Pistes pédagogiques		
5) Lavages	1x à l'eau pure ou au tampon phosphate (volume approximatif à la pissette)	3x au PBS-Tween (100µl ou 3 gouttes) puis 3x au PBS (100µl ou 3 gouttes)	2x au PBS Tween (volume approximatif à la pipette)			
6) Dépôt de la solution de substrat Révélation	 <p>200µl ou 4 gouttes de réactif d'Ellman</p> <p>Lecture à partir de 3-4 min, idéalement 10-15 min à température ambiante</p> 	 <p>100µl ou 3 gouttes d'OPD</p> <p>Lecture après 10-45 min à 30-37°C (lecture rapide ou ajout de HCl pour bloquer la réaction)</p> 	 <p>40µl de TMB + 40µl d'anticorps anti-IgG de lapin</p> <p>80µl de TMB</p> <p>Lecture après 0-5 min à température ambiante (lecture rapide ou ajout de HCl pour bloquer la réaction)</p> 	Substrat de la peroxydase (TMB)	Substrat de la peroxydase (TMB)	Substrat de la peroxydase (TMB)

Notes	APBG	Jeulin	Sordalab
Les -	<ul style="list-style-type: none"> - étape de coating non réalisée par les élèves - observation présence/absence : pas de notion de dosage quantitatif 	<ul style="list-style-type: none"> - observation présence/absence : pas de notion de dosage quantitatif - besoin d'un incubateur en classe - solution de blocage de la réaction de révélation non fournie : temps limité pour l'observation (recommandation : préparer une solution d'HCl pour le blocage) 	<ul style="list-style-type: none"> - étape de coating non réalisée par les élèves - solution de blocage de la réaction de révélation non fournie : temps limité pour l'observation (recommandation : préparer une solution d'HCl pour le blocage) - témoin positif : pas pour la présence de la molécule à détecter, mais pour la réaction de détection
Les +	<ul style="list-style-type: none"> - pas besoin de stopper la réaction de révélation : temps d'observation illimité - pas besoin d'incubateur 	<ul style="list-style-type: none"> - étape de coating réalisée par les élèves 	<ul style="list-style-type: none"> - pas besoin d'incubateur - gamme de la molécule à détecter : notion de quantification

Pistes pédagogiques

- **Un exemple d'utilisation de l'ELISA en clinique : le dosage de la protéine C réactive (CRP)**

La protéine C réactive est produite au cours de l'inflammation. Elle constitue un marqueur pertinent de la phase aiguë de la réponse inflammatoire : son dosage dans le sérum est utilisé en clinique pour diagnostiquer une inflammation aiguë.

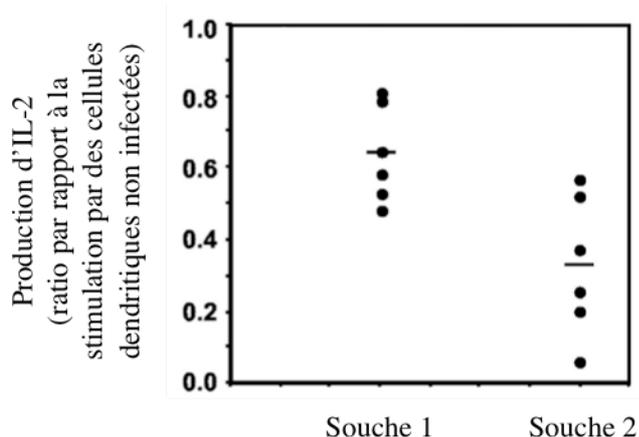


Comparaison de la concentration de protéines CRP dans le sérum de sujets sains (HC) et de patients atteints de maladie pulmonaire obstructive en phase chronique (COPD) ou en phase d'exacerbation aiguë (COPD ex).

Source : « Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients », Respiratory Medicine, volume 106, issue 1, pages 120-126, Janvier 2012.

- **Mise en évidence de la perturbation de la réponse immune par le virus de l'immunodéficience humain (VIH)**

Des lymphocytes T CD4⁺ stimulés par des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes produisent la cytokine mitogène IL-2. On mesure ici par ELISA la production d'IL-2 par des lymphocytes stimulés par des cellules dendritiques infectées ou non par le VIH. On utilise deux souches de VIH notées 1 et 2.

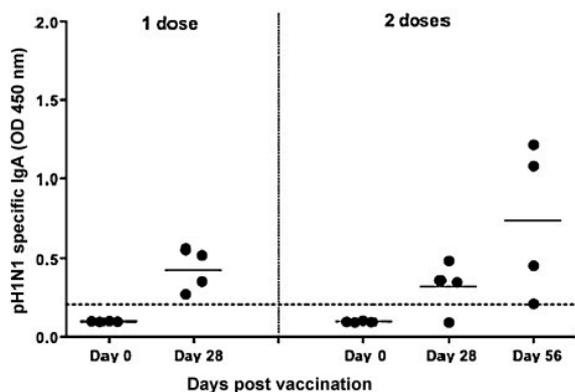


Comparaison de la production d'IL-2 par des lymphocytes stimulés par des cellules dendritiques infectées ou non par le VIH. *Des valeurs inférieures à 1 indiquent une diminution de la production d'IL-2 par rapport à des lymphocytes stimulés par des cellules dendritiques non infectées.*

Source : « Decreased stimulation of CD4⁺ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells », J Immunol, volume 170, issue 8, pages 4260-6, Avril 2003.

- **Etude de l'efficacité d'un vaccin par ELISA**

Un vaccin est efficace s'il induit une réponse immunitaire protectrice. Dans le cas d'un vaccin antigrippal, la production d'anticorps anti-viraux dans la muqueuse respiratoire (IgA) est un bon indicateur d'une réponse immunitaire protectrice. Ici, un nouveau vaccin a été testé chez le singe et la production d'IgA anti-grippe (pH1N1) dans le liquide nasal a été mesurée par ELISA.



Production d'IgA dans le liquide nasal après vaccination par 1 ou 2 doses vaccinales. La ligne pointillée représente le seuil de positivité du test.

Source : « Evaluation of replication, immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated cold-adapted pandemic H1N1 influenza virus vaccine in non-human primates », Vaccine, volume 30, issue 38, pages 5603-10, Juillet 2012.

Informations complémentaires : <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>