

Stage de formation
17 & 18 mars 2014

Conférences

Institut français de l'Éducation

Ateliers

École normale supérieure de Lyon (site Monod)




ELISA et le test d'Ouchterlony

*Sylvie Fanfano
Katia Mayol*




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


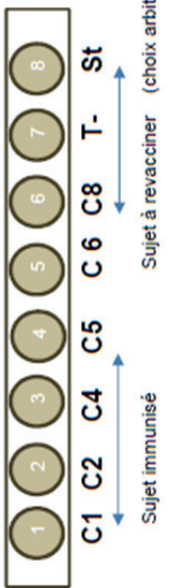


immunité
2014

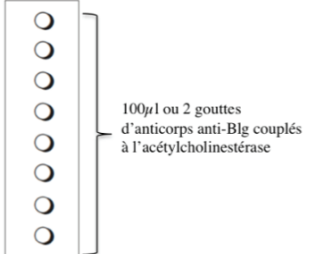

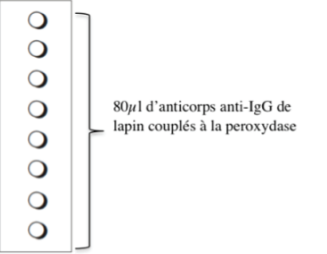
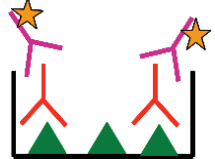
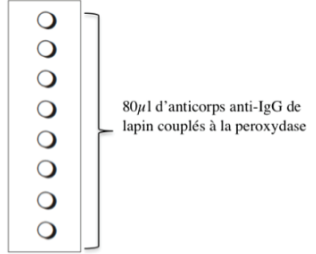
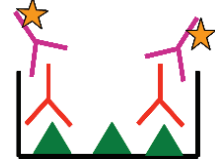
Comparaison des kits disponibles pour réaliser le TP ELISA :

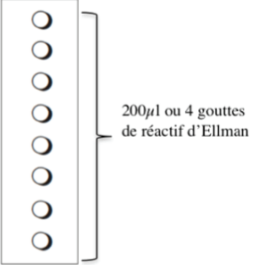
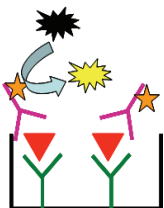
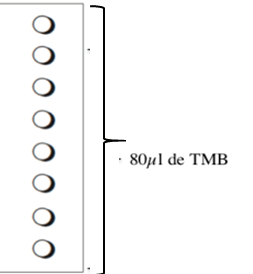
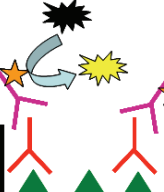
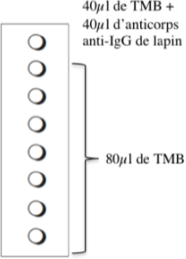
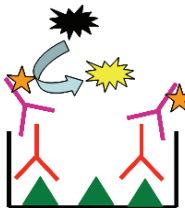
<p>L'APBG (réf : K06ELI ou K07ELI) (54 € port compris – 12 barrettes)</p> 	<p>Jeulin (réf : 11503784) (65,22 € – 24 barrettes)</p> 	<p>Sordalab (réf : ELISA) (55,54 € – 20 barrettes)</p> 
--	--	--

ELISA : tableau comparatif des protocoles et pistes pédagogiques

Étape	APBG	Jeulin	Sordalab	Pistes pédagogiques (cf. fin du document)		
	<p>ELISA sandwich Détection de la b-lactoglobuline (Blg)</p>	<p>ELISA indirect Détection d'anticorps anti-BSA</p>	<p>ELISA indirect Détection d'anticorps anti-BSA</p>	<p>Thème 3-A-1 La réaction inflammatoire : Dosage de la CRP dans le sérum (indicateur d'inflammation)</p>	<p>Thème 3-A-2 L'immunité adaptative : Dosage de l'IL-2</p>	<p>Thème 3-A-3 Le phénotype immunitaire au cours de la vie : Dosage des anticorps anti- vaccin dans le sérum (indicateur de l'efficacité de la vaccination)</p>
<p>1/ Coating</p>	<p>Plaque déjà coâtée avec l'anticorps anti-Blg</p> 	<p>Plaque déjà coâtée avec la BSA</p> 	<p>Plaque déjà coâtée avec la BSA</p> 	<p>Anticorps anti-CRP</p>	<p>Anticorps anti-IL-2</p>	<p>Vaccin (antigène du pathogène)</p>

<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"> ○ } Témoign négatif ○ } Témoign positif ○ } Echantillon 1 ○ } Echantillon 2 <p>Échantillons 1 et 2 : -lait de vache, qui contient la protéine Blg ATTENTION : n'utiliser que du lait cru ! -lait de soja, qui ne contient pas la protéine Bgl (une goutte de lait dans un litre d'eau)</p> 	<p>80µl de :</p>  <p>- solutions C1 à C8 : dilutions d'un sérum de lapin immunisé par de la BSA - échantillon « St » : sérum de lapin à tester (C3 ou C7) - échantillon « T- » : sérum de lapin non immunisé</p> <p>15 min à température ambiante</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>Ou</p> <p>Sérums de sujets sains, infectés par le virus de l'hépatite B, et sujets ayant été infectés et ayant résolu l'infection</p>	<p>Sérum de sujets vaccinés ou non vaccinés</p>
----------------------------------	--	--	--	---	--	---

3) Lavages		3x au PBS Tween (2 gouttes)	2x au PBS Tween (volume approximatif à la pipette)			
4) Dépôt de la solution d'anticorps couplés	 <p>100µl ou 2 gouttes d'anticorps anti-Blg couplés à l'acétylcholinestérase</p> <p>15-20 min à température ambiante</p> 	 <p>80µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase</p> <p>15 min à température ambiante (minimum 20°C) ou à 30°C</p> 	 <p>80µl d'anticorps anti-IgG de lapin couplés à la peroxydase</p> <p>15 min à température ambiante</p> 	Anticorps anti-CRP couplé à la peroxydase	Anticorps anti-IL-2 couplé à la peroxydase	Anticorps anti-Ig couplé à la peroxydase
5) Lavages	1x à l'eau pure ou au tampon phosphate (volume approximatif à la pissette)	3x au PBS-Tween (2 gouttes)	2x au PBS Tween (volume approximatif à la pipette)			

<p>6) Dépôt de la solution de substrat</p> <p>Révélation</p>	 <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>80µl de TMB</p> <p>Lecture après 0-5 min à température ambiante (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> 	<p>Substrat de la peroxydase (TMB)</p>	<p>Substrat de la peroxydase (TMB)</p>	<p>Substrat de la peroxydase (TMB)</p>
--	---	--	--	--	--	--

Caractéristiques des différents kits :

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

Réflexion sur le degré de schématisation des anticorps !!!

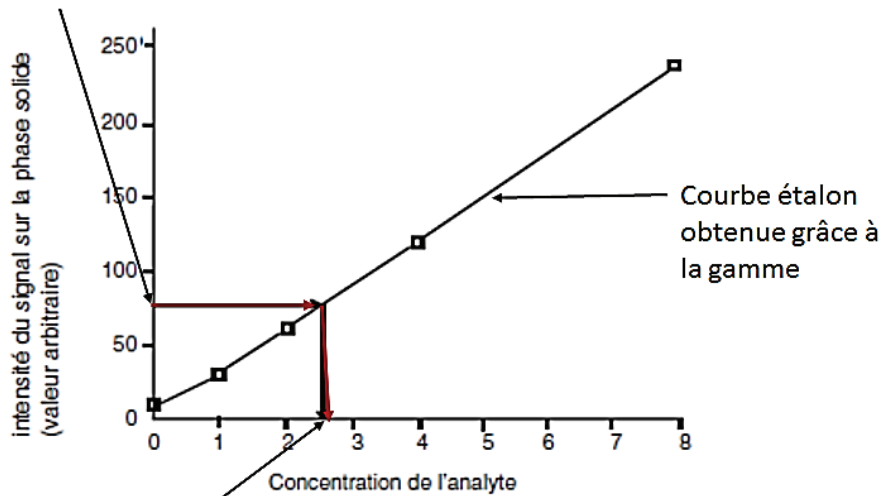
Pour aller plus loin :

expliquer comment on peut faire un dosage quantifié par ELISA

Il faut faire une gamme étalon : l'ELISA est réalisé à partir d'une solution de la protéine à doser dont on connaît la concentration. Cette solution mère est diluée en cascade et on réalise le test ELISA sur chaque point de cette gamme. L'intensité de la couleur obtenue est mesurée par un spectromètre, et on peut alors établir une courbe étalon (DO vs concentration).

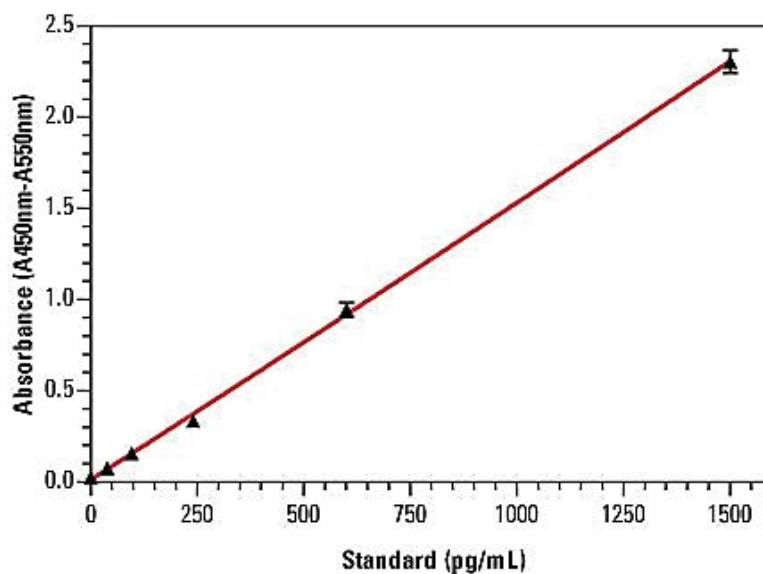
Grâce à la courbe étalon ainsi obtenue, on peut trouver à quelle concentration correspond l'absorbance (densité optique ou DO) mesurée pour les puits tests.

DO de l'échantillon mesurée
grâce au spectromètre



Concentration de la protéine
testée dans l'échantillon

Courbe étalon réalisable avec le kit APBG.

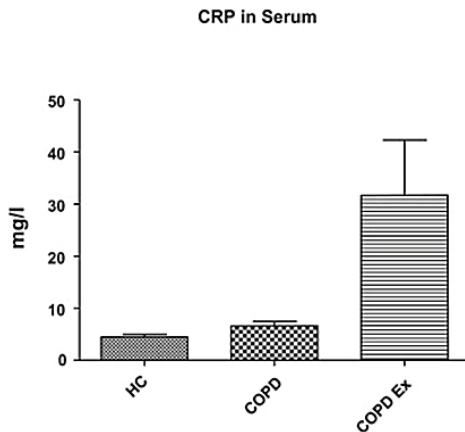


Courbe étalon pour un kit de dosage ELISA de l'IL-2 humaine (Pierce).

Pistes pédagogiques

- Un exemple d'utilisation de l'ELISA en clinique : le dosage de la protéine C réactive (CRP) (thème 3-A-1)

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



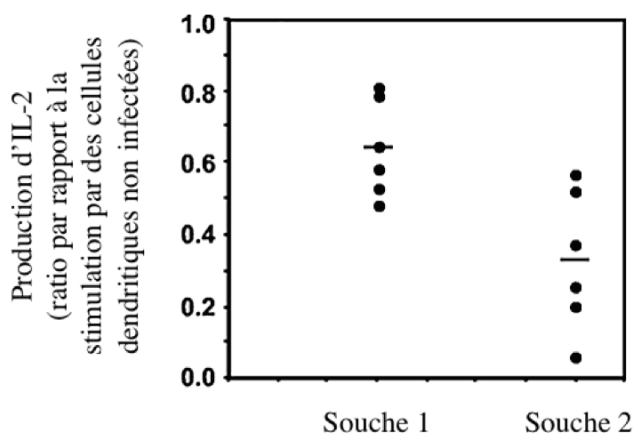
Comparaison de la concentration de protéines CRP dans le sérum de sujets sains (HC) et de patients atteints de maladie pulmonaire obstructive en phase chronique (COPD) ou en phase d'exacerbation aigüe (COPD ex).

Source « Alpha-1 antitrypsin is elevated in exhaled breath condensate and serum in exacerbated COPD patients », *Respiratory Medicine*, 2012, vol. 106, n° 1, p. 120-126.

Mise en scène TP : le patient arrive à l'hôpital, on veut savoir si il a une inflammation (dans ce cas, son sérum contiendra de la CRP).

- Mise en évidence de la perturbation de la réponse immune par le virus de l'immunodéficience humain (VIH) (thème 3-A-2)

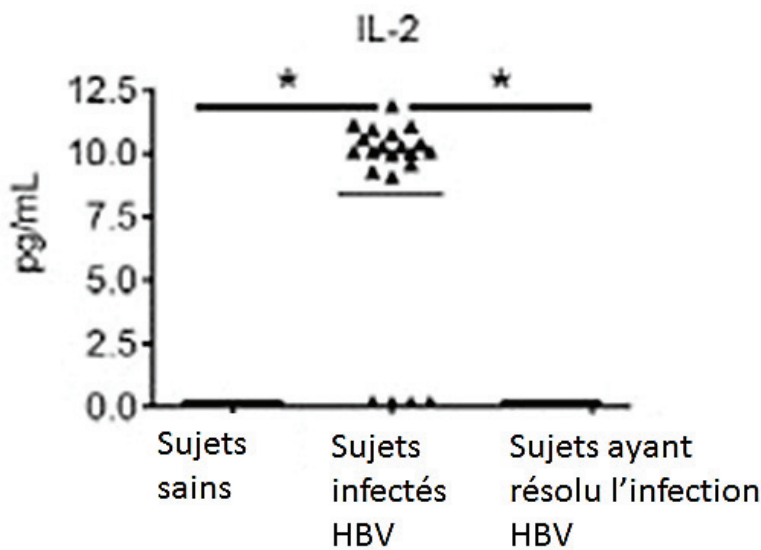
Des lymphocytes T CD4⁺ stimulés par des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes produisent la cytokine mitogène IL-2. On mesure ici par ELISA la production d'IL-2 par des lymphocytes stimulés par des cellules dendritiques infectées ou non par le VIH. On utilise deux souches de VIH notées 1 et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



Comparaison de la production d'IL-2 par des lymphocytes stimulés par des cellules dendritiques infectées ou non par le VIH (chaque point représente un test). 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 », *Journal of Immunology*, 2003, vol. 170, n° 8, pages 4260-4266.

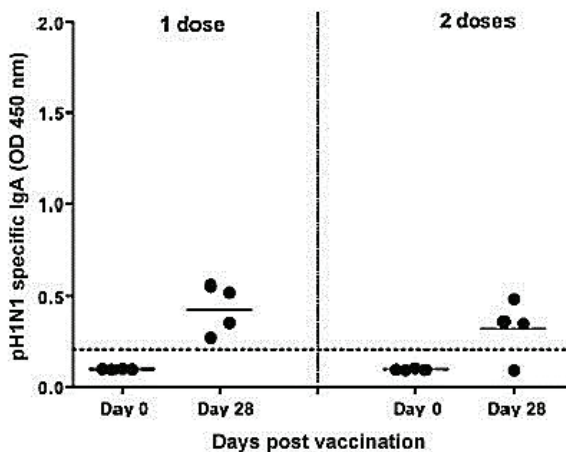
- Dosage de l'IL-2 par ELISA dans le sérum de sujets sains, de patients infectés par le virus de l'hépatite B (HBV), et de personnes ayant été infectés par HBV et ayant résolu l'infection (thème 3-A-2)



(chaque point représente un sujet)

Source « Multiple cytokine expression profiles reveal immune-based differences in occult hepatitis B genotype H-infected Mexican Nahua patients », *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011, vol. 106, n° 8, pages 1007-1013.

- Etude de l'efficacité d'un vaccin par ELISA (thème 3-A-3)
- Un vaccin est efficace s'il induit une réponse immune protectrice. Dans le cas d'un vaccin anti-grippal, la production d'anticorps anti-viraux dans la muqueuse respiratoire (IgA) est un bon indicateur d'une réponse immune 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.

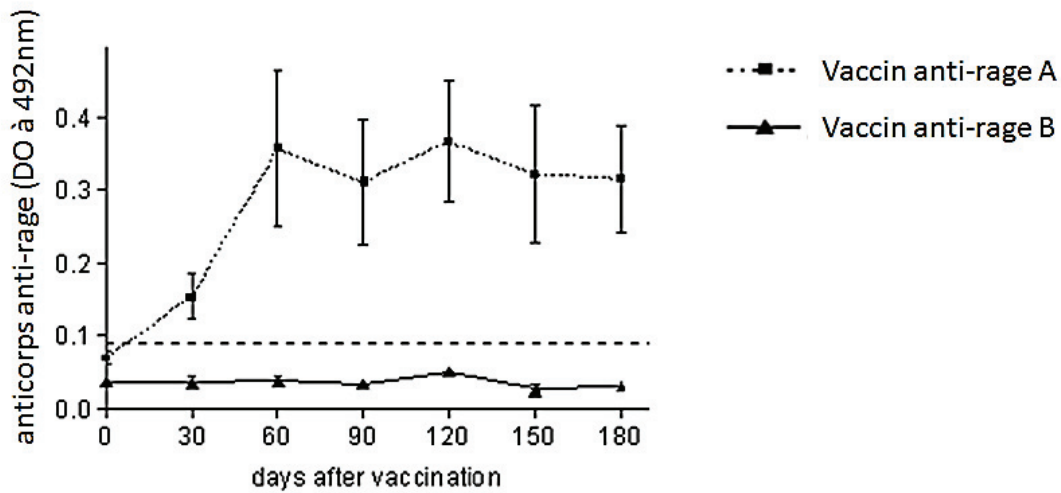


Production d'IgA dans le liquide nasal après vaccination par une ou deux doses vaccinales. La ligne pointillée représente le seuil de positivité du test (chaque point représente un sujet).

Source : « Evaluation of replication, immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated cold-adapted pandemic H1N1 influenza virus vaccine in non-human primates », *Vaccine*, 2012, vol. 30, n° 38, pages 5603-5610.

Mise en scène : l'objectif est de savoir pour ce vaccin le nombre d'injections nécessaires pour une couverture efficace.

- Des chercheurs ont produits deux vaccins contre la rage destinés aux bovins. Ils testent alors leur capacité à induire la production d'anticorps anti-rage après injection aux bovins : pour cela, ils prélèvent du sang avant la vaccination, et régulièrement après l'injection.



Source « Antibody response in cattle after vaccination with inactivated and attenuated rabies vaccines », *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2000, vol. 42, n° 2.

Mise en scène : l'objectif est de déterminer quel vaccin est le plus efficace.

Informations complémentaires : <http://accs.ens-lyon.fr/accs/ressources/immunite-et-vaccination>

Test d'Ouchterlony (mise en évidence de la spécificité de la réaction immunitaire à médiation humorale avec la visualisation de la formation de complexes antigènes-anticorps) :

Sordalab (réf : IMVS ou IMVD, 20 ou 40 postes)
(76,10 € – 20 binômes / 97,73 € – 40 binômes)



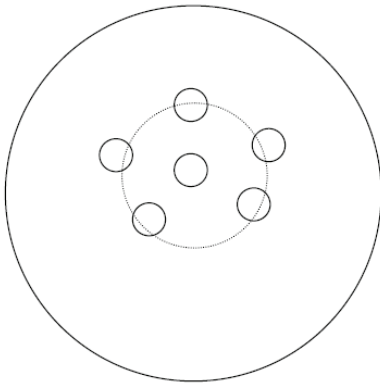
Test d'Ouchterlony (Sordalab)

Le test d'Ouchterlony permet de mettre en évidence la spécificité de la réaction antigène-anticorps.

Préparation avant le TP :

- boîtes de pétri, en y coulant de la gélose. Ces boîtes sont utilisables dès que la gélose est figée dans les boîtes (environ 30 min), ou peuvent être ainsi conservées cinq à sept jours à 4°C.
- resuspendre les anticorps anti-BSA, la BSA, et les sérums de porc, chèvre, lapin, bœuf et cheval.

On réalise d'abord sept puits dans la gélose, à l'aide du modèle fourni :



On dépose alors 20µl d'anticorps anti-BSA dans le puits central, et 20µl de chaque antigène dans chacun des six autres puits (identifier chaque puits en annotant la boîte).

La boîte est alors placée à température constante (entre 20 et 26°C) pendant 24 à 36h : chaque échantillon déposé va diffuser dans la gélose.

On observe alors un arc blanc entre certains puits : quand les anticorps et leurs antigènes spécifiques se rencontrent dans la gélose, ils forment des complexes visibles.



Une fois le résultat obtenu, on peut conserver la boîte dans une enceinte humidificatrice (boîte fermée contenant du papier absorbant humide) à 4°C. Le résultat est ainsi toujours visible une semaine plus tard.