

# stage de formation

## 5&6 février 2015

atelier n° 1

### *ELISA et le test d'Ouchterlony*

Sylvie Fanfano  
Stéphanie Breuil

contact ✉ [nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr](mailto:nathalie.davoust-nataf@ens-lyon.fr)  
informations et ressources ✉ <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination>

immunité  
et vaccination



*Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la*  
[Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale -](#)  
[Partage dans les Mêmes Conditions 4.0 International](#)

# ELISA et le test d'Ouchternoly

Sylvie Fanfano, enseignante de SVT, lycée Lumière, académie de Lyon & Stéphanie Brueil, enseignante de SVT, lycée du Parc, académie de Lyon,  
équipe ACCES, IFÉ-ENS de Lyon



APBG  
(réf. : Ko6ELI ou Ko7ELI)  
**54 € - 12 barrettes**  
(port compris)



Jeulin  
(réf. : 11503784)  
**65,22 € - 24 barrettes**

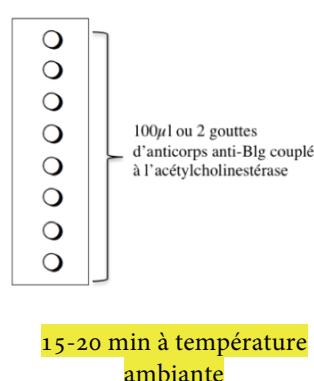
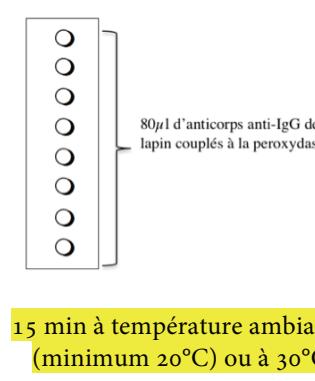
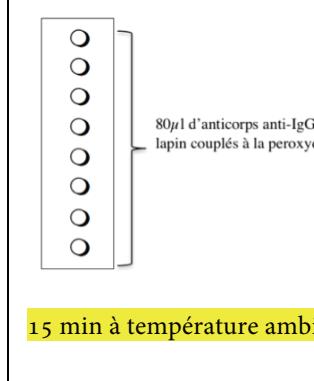


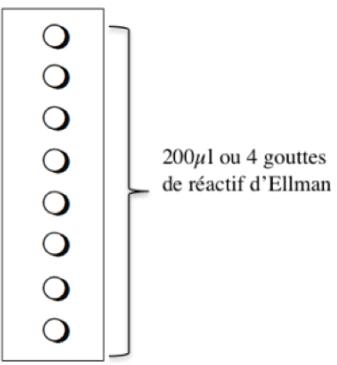
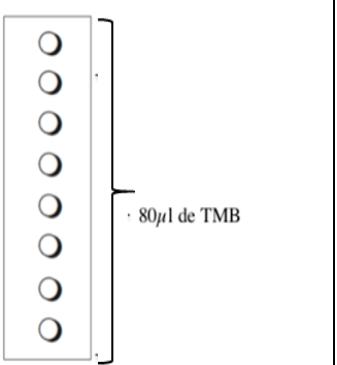
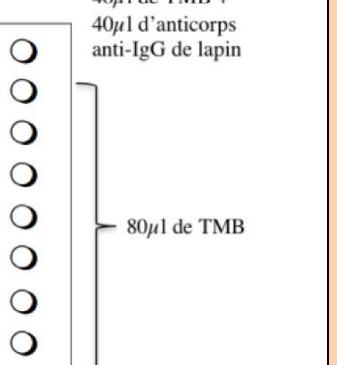
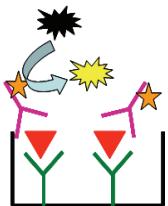
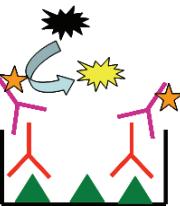
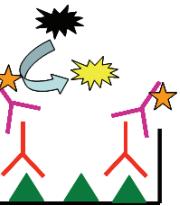
Sordalab  
(réf. : ELISA)  
**55,54 € - 20 barrettes**

Tableau comparatif des protocoles et pistes pédagogiques

Étape	APBG	Jeulin	Sordalab	Pistes pédagogiques (cf. fin du document)
	<b>ELISA sandwich</b> Détection de la b-lactoglobuline (Blg) donc d'une protéine	<b>ELISA indirect</b> Détection d'anticorps anti-BSA	<b>ELISA indirect</b> Détection d'anticorps anti-BSA	<b>Situations possibles :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Détection de la séropositivité chez un patient (séropositivité pour le SIDA ou la grippe)</li> <li>Identification de la souche de la grippe</li> <li>Vérification de la protection d'un sujet suite à une vaccination ancienne sans les rappels nécessaires</li> </ul>
1) Coating	Plaque déjà « coatée » avec l'anticorps anti-Blg 	Plaque déjà « coatée » avec la BSA 	Plaque déjà « coatée » avec la BSA 	<b>Identifier dans le cadre de la situation choisie la nature des molécules présentes au fond des puits et la nature des molécules recherchées.</b>

	<p>En même temps que l'anticorps couplé</p> <p>100µl ou 2 gouttes de :</p>	<p>80µl de :</p>	<p>80µl de :</p> <p>- solutions C1 à C7 : dilutions en cascade de sérum de lapin immunisé par la BSA</p>	<p>Identifier le nombre de puits nécessaires ainsi que les concentrations retenues selon la situation retenue et l'objectif pédagogique.</p>
2) Dépôt des échantillons		<p>15 min à température ambiante</p>	<p>15 min à température ambiante</p>	

3) Lavages		3x au PBS Tween (deux gouttes)	2x au PBS Tween (volume approximatif à la pipette)	
4) Dépôt de la solution d'anticorps couplés	  			Identifier la nature des anticorps couplés selon la situation retenue.
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)	Préciser l'importance de cette étape de lavage qui est la même pour toute situation pédagogique.

	<b>6) Dépôt de la solution de substrat</b>				
	<b>Révélation</b>	Lecture à partir de 3-4 min, idéalement 10-15 min à température ambiante	Lecture après 0-5 min à température ambiante (lecture rapide ou ajout de HCl pour bloquer la réaction)	Lecture après 0-5 min à température ambiante (lecture rapide ou ajout de HCl pour bloquer la réaction)	
					<b>Exploiter les résultats obtenus dans le cadre de la situation pédagogique retenue.</b>
	<b>Aspect des résultats</b>				

## Caractéristiques des différents kits

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

# Le test d'immunodiffusion ou test d'Ouchterlony

Le test d'Ouchterlony est basé sur la reconnaissance antigène/anticorps (spécificité) et sur le phénomène d'**immunoprécipitation** lié à la présence de *deux sites identiques de reconnaissance par Ac* et à la formation du complexe immun. Ac et Ag diffusent autour des trous dans toutes les directions. Quand les anticorps et leurs antigènes spécifiques se rencontrent, ils forment un complexe immun visible à l'œil sous forme d'arc de précipitation.

Kit de Sordalab Ref. : IMVS ; 77,5 €	Test d'Ouchterlony utilisant des produits de substitution réalisable en laboratoire de l'établissement... à peu de frais	Applications pédagogiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Boîte de gélose (agar 1%) dans lesquelles plusieurs trous ont été creusés, un trou central et des trous périphériques</li> </ul> <p data-bbox="67 849 804 949"> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les Ac anti-BSA sont à positionner dans le trou central</li> <li>- Les sérums à tester (porc, chèvre, lapin, bœuf et cheval) sont à positionner dans les trous périphériques</li> </ul> </p> <p data-bbox="67 1364 804 1434">         La précipitation <b>est très lente</b> (24 à 36hoo)          mais se conserve à 4°C pendant une semaine       </p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Préparation des boîtes de Pétri où on coule la gélose (agar 1%) et dans lesquelles plusieurs trous ont été creusés, un trou central et des trous périphériques ou on fait réaliser le perçage par les élèves.</li> </ul> <p data-bbox="826 674 1500 742">         Les produits de substitutions viennent remplacer anticorps et antigènes.       </p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- solution de soude (<math>\text{NaOH}</math>) à <math>0.1 \text{ mol.L}^{-1}</math> substitut d'une solution qui contiendrait l'Ac</li> <li>- solution de sulfate de Zinc à <math>0.1 \text{ mol.L}^{-1}</math> substitut de la solution contenant l'Ag spécifique</li> <li>- eau distillée substitut des solutions qui ne contiennent pas l'Ag spécifique.</li> </ul> <p data-bbox="826 1023 1500 1123">         Le mélange soude/sulfate engendre un précipité marqué par l'apparition d'un arc similaire à celui qu'aurait produit une liaison Ag/Ac       </p> <p data-bbox="916 1266 1410 1334">         La précipitation est <b>rapide</b> (20 à 30 mn)          Le précipité est stable pendant 3-4 heures       </p>	<p data-bbox="1522 496 1814 525">Extrait du programme :</p> <p data-bbox="1522 533 2160 668"><i>Les lymphocytes B sécrètent dans le sang des molécules nommées anticorps, capables de participer à la neutralisation des micro-organismes et de favoriser la phagocytose.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Recherche de la présence ou de l'absence d'anticorps : mise en évidence de la séro-positivité et de la séronégativité vis-à-vis d'une infection (SIDA ou grippe ou autre maladie)</li> <li>• Compréhension du mode d'action des anticorps</li> <li>• Identification d'un antigène inconnu (comme pour le diagnostic d'une maladie type grippe)</li> </ul>

## **PROTOCOLE**

### *Matériel par poste :*

- une plaque chauffante et une balance électronique, un Bécher, une éprouvette graduée ou équivalent 20 mL
- une coupelle, une pince en bois, un flacon d'Agar, un flacon d'eau distillée, une spatule
- deux petites boîtes de Pétri (**6 cm de diamètre**) ; une pipette 10 mL et pipeteur, un tube emporte-pièce (tube en verre de petit diamètre) et un cure-dent ou une aiguille lancéolée
- un marqueur (pour marquer la boîte de Pétri) ; un gabarit de perçage ; un récipient poubelle
- Solution d'Ac (sérum de lapin ou produit de substitution, NaOH à 0.1 mol.L<sup>-1</sup>) dirigé contre l'Ag que l'on cherche à identifier.
- Solution d'Ag spécifique (ou produit de substitution, sulfate de Zinc à 0.1 mol.L<sup>-1</sup>)
- Autres solutions d'Ag (ou eau distillée)
- une micro-pipette avec embouts **ou un compte-goutte** pour chaque produit, des gants ; une lampe de bureau et une petite feuille de papier noir.

## **ÉTAPES**

### *1/ Couler les boîtes*

Pour 20 boîtes, mélanger 1g d'Agar pour 100mL d'eau, porté à ébullition sur plaque chauffante, couler les boîtes lorsque le mélange a suffisamment refroidi. Laisser refroidir.

### *2/ Préparer les trous*

A l'aide d'un emporte-pièce, en suivant le modèle d'un gabarit, percer les différents trous nécessaires. Identifier les trous sur un schéma et placer une marque sur la tranche de la boîte à cheval sur le couvercle et le fond.

### *3/ Déposer les échantillons dans les trous*

On dépose alors 20µl d'anticorps anti-BSA dans le trou central, et 20µl de chaque antigène dans chacun des six autres trous. Le dépôt peut se faire à la micropipette ou avec un compte-goutte.

### *4/ Attendre les résultats*

NB : on place dans le trou central, soit l'Ac soit l'Ag en fonction du nombre respectif d'Ac et d'Ag disponibles et selon la situation retenue.

# Pistes pour des démarches d'investigation en collège

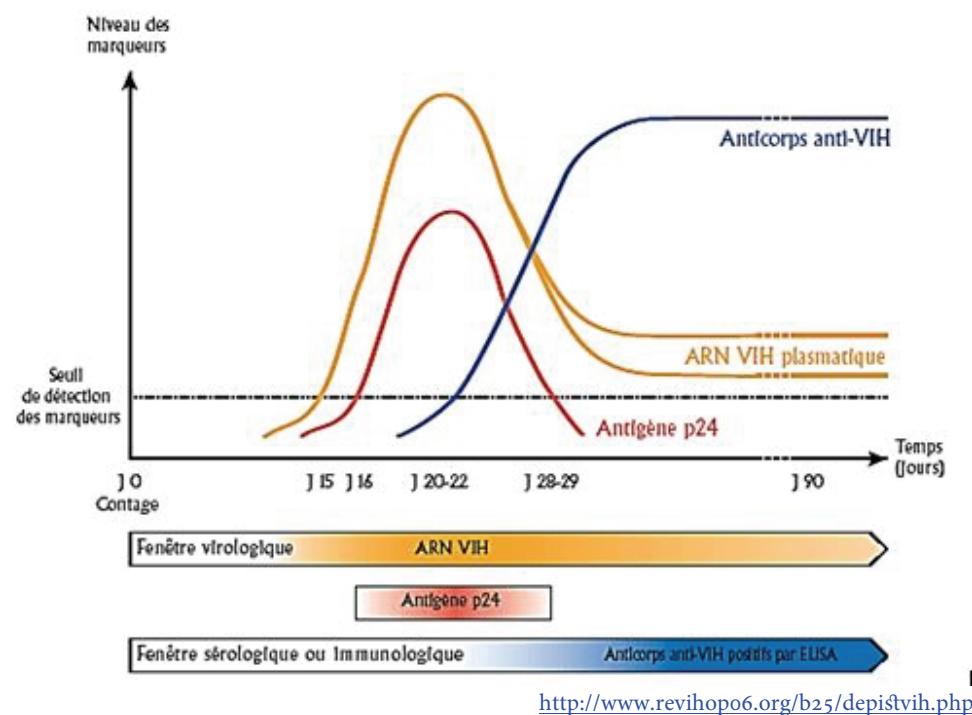
## 1/ DEPISTER UNE INFECTION AU VIH

Le SIDA est une IST. Le SIDA est la maladie qui résulte d'une infection au VIH (virus d'immunodéficience Humaine). En cas de conduite à risque, il est important de pouvoir être rassuré au plus vite. Cependant, il faut souvent attendre trois à six semaines afin d'avoir un diagnostic fiable.

→ Comment diagnostiquer une contamination par le VIH ?

Document 1 : Structure du virus VIH

Document 2 : Graphique de la variation de la quantité de certains marqueurs de contamination par le VIH dans le sang (en unités arbitraires) et leurs seuils de détection par les tests disponibles.



*Remarque :* La notion d'ARN n'est pas connue en troisième mais elle peut être expliquée simplement (il s'agit d'une molécule de la même famille que l'ADN et qui porte l'information génétique du virus)

**Objectifs de la démarche d'investigation :** Identifier des molécules signatures de l'infection ; rechercher un principe d'un protocole permettant de les mettre en évidence.

**Réflexion nécessaire pour le professeur :** quels sont les acquis cognitifs et méthodologiques nécessaires à cette activité élève ? Quel matériel proposer ? Quelle fiche technique proposer aux élèves ?

**Prolongement possible :** Comment expliquer le temps d'attente nécessaire à la fiabilité du résultat ?

## 2/ DETECTER LE VIRUS DE LA GRIPPE

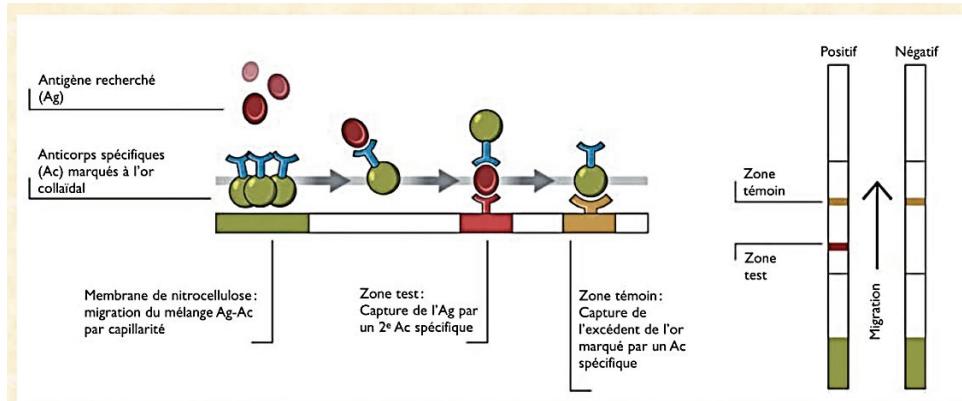
Les symptômes liés à la grippe saisonnière sont des symptômes que l'on retrouve pour d'autres infections virales. Les données cliniques ne suffisent donc pas toujours à diagnostiquer une grippe. Il existe par ailleurs plusieurs souches de virus de la grippe et il peut être important d'identifier la souche précise responsable de l'infection.

→ Comment savoir si un patient est effectivement atteint de la grippe ?  
Comment identifier la souche responsable ?

**Proposition d'activité élève :** les tests d'Ouchterlony ou ELISA sont possibles pour cette activité.

**Réflexion nécessaire :** Quels sont les acquis cognitifs et méthodologiques nécessaires à cette activité élève ? Quel matériel proposer ? Quelle fiche technique proposer aux élèves ?

Dans les faits, les tests de dépistage de la grippe utilisés en routine par les médecins (en particulier les généralistes) sont des tests d'immuno-chromatographie dont le principe est présenté ci-dessous : à partir de prélèvements naso-pharyngés, ces tests permettent de mettre en évidence la présence éventuelle d'antigènes spécifiques.



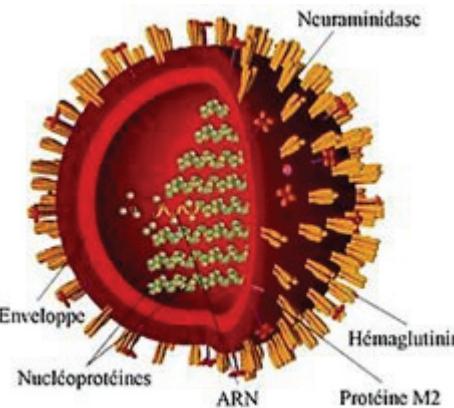
[http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Antennes/Auvergne/Journee/2014/15\\_04\\_14/3\\_test\\_diagnostic.pdf](http://cclin-sudest.chu-lyon.fr/Antennes/Auvergne/Journee/2014/15_04_14/3_test_diagnostic.pdf)  
<http://rms.medhyg.ch/numero-152-page-908.htm>



Exemple d'un test positif pour la souche B

### Pour aller plus loin : les virus de la grippe et les souches utilisées dans les vaccins

**Structure d'un virus influenza de type A**  
 En surface, au niveau de l'enveloppe virale se trouvent deux glycoprotéines : l'hémagglutinine A (HA) et la neuraminidase (NA) et des protéines canaux M2. A l'intérieur, le complexe ribonucléoprotéique contient l'ARN viral, associé à des nucléoprotéines.



Source : <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/doissiers/d/medecine-tout-savoir-grippe-312/page/4/>

La grippe saisonnière est une maladie causée par le virus de la grippe, influenza. Il existe en fait de très nombreuses souches de ce virus qui appartiennent à deux types principaux, le type A et le type B. Les virus du groupe B n'infectent que l'homme et sont responsables de petites épidémies. Il s'agit de souches relativement stables. Par contre les virus du groupe A peuvent infecter l'homme et d'autres animaux. Il s'agit de souches hautement variables qui mutent chaque année entraînant la modification de leurs antigènes.

Les vaccins, produit chaque année en Europe contiennent les Ag de trois souches de virus, deux de type A et un de type B, choisis en fonction des souches présentes au cours de l'hiver précédent dans l'hémisphère Sud.

Ainsi pour le vaccin antigrippal 2012-2013, les experts ont recommandé les souches : A/California/7/2009(H1N1) inchangée ; A/Victoria/361/2011 (H3N2) nouveau et B/Wisconsin/1/2010 nouveau

Pour la saison 2013-2014 dans l'hémisphère Nord la souche B diffère de celle de la saison précédente et le vaccin contient : A/California/7/2009(H1N1) inchangée ; A/Victoria/361/2011 (H3N2) inchangée et B/ Massachussetts/2/2012 nouvelle

### 3/ QUANTIFIER LA QUANTITE D'AC D'UN INDIVIDU AFIN DE SAVOIR S'IL EST IMMUNISE VIS-A-VIS D'UN ANTIGENE PRECIS

Recherche d'une activité élève, de sa motivation et des documents nécessaires.

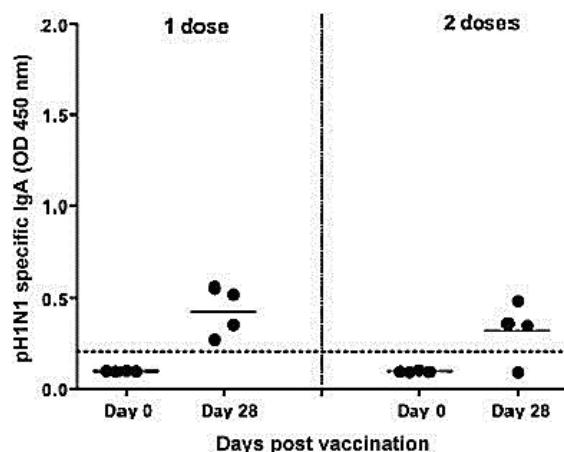
**Réflexion nécessaire :** Quels sont les acquis cognitifs et méthodologiques nécessaires à cette activité élève ? Quel matériel proposé ? Quelle fiche technique proposer aux élèves ?

### 4/ QUANTIFIER LA QUANTITE D'AC AFIN DE TESTER L'EFFICACITE D'UN VACCIN

Deux exemples de l'utilisation d'un test Elisa pour tester l'efficacité d'un vaccin

#### Vaccin contre la grippe

- 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.



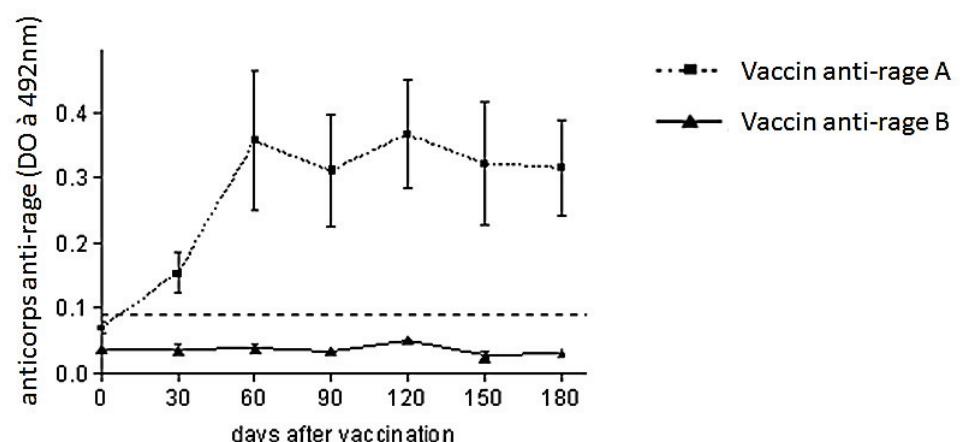
Production d'IgA dans le liquide nasal après vaccination par 1 ou 2 doses vaccinales. La ligne pointillée représente le seuil de positivité du test (chaque point représente un sujet).

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, issue 38, p. 5603-5610.

L'objectif peut être d'identifier pour ce vaccin le nombre d'injections nécessaires pour une couverture efficace.

#### Vaccin contre la rage

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 São Paulo*, 2000, vol. 42, n° 2.

L'objectif peut être de déterminer quel vaccin est le plus efficace.