

DEPISTAGE DU VIRUS HIV PAR ELISA.

KIT DE SIMULATION DE DEPISTAGE DU VIRUS HIV PAR ELISA

Réf. 912 001

Conditions de conservation du kit : voir page 3

1. Objectif de l'expérience :

Ce kit permet à l'élève de comprendre la biologie moléculaire du virus de l'immunodéficience humaine et de la pathogénèse du syndrome d'immunodéficience acquise.

Ce kit repose sur la méthode ELISA simulée « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » ou littéralement « dosage d'immunoabsorption par enzyme liée » dans le contexte d'une recherche clinique d'anticorps dans des échantillons de sérum.

2. Composition du kit :

Ce kit est conçu pour 10 groupes d'élèves.

Solutions :

- A - Antigènes du VIH simulés,
- B - Contrôle positif (anticorps primaire),
- C - Sérum simulé du donneur 1,
- D - Sérum simulé du donneur 2,
- E - Anti IgG peroxydase conjugué (anticorps secondaire),
- F - Peroxyde d'hydrogène stabilisé,
- G - Acide aminosalicyle (co-substrat du peroxyde),
- H - Solution saline tamponnée concentrée (tampon phosphate).

Matériel :

- Plaques de microtitration
- Pipettes de transfert
- Microtubes à essais à couvercles
- Pipettes de 1 mL,
- Tubes en plastique de 50 mL,

3. Matériel complémentaires requis :

- Eau déminéralisée ou désionisée,
- Bêchers propre secs et exempts de résidus de savon ou de liquide vaisselle,
- Incubateur à 37°C,
- Gants jetables,
- Lunettes de sécurité,
- Micropipettes de 100 µL et pointes.

Stocker le kit au réfrigérateur

Ce kit ne contient pas de sang ou de produits sanguins ni de VIH ou de constituants du VIH.

Les composants de ce kit sont conçus pour l'enseignement uniquement. Ils ne doivent en aucun cas être utilisés pour le diagnostic médical, ils ne doivent en aucun cas être administrés à des humains ou animaux.

4. Rappels théoriques

Le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA) est une maladie se manifestant par la détérioration progressive du système immunitaire d'un individu. L'affaiblissement des défenses immunitaires permet à des agents infectieux tels que des virus, bactéries, champignons et parasites d'envahir l'organisme de l'individu contaminé. En parallèle l'incidence de certains cancers augmente considérablement en raison de leurs faibles défenses immunitaires.

Le SIDA est une maladie grave qui représente un problème de santé publique à l'échelle mondiale. Des recherches actives sont effectuées dans différents pays pour améliorer la détection, le traitement clinique et la prévention.

A propos du VIH

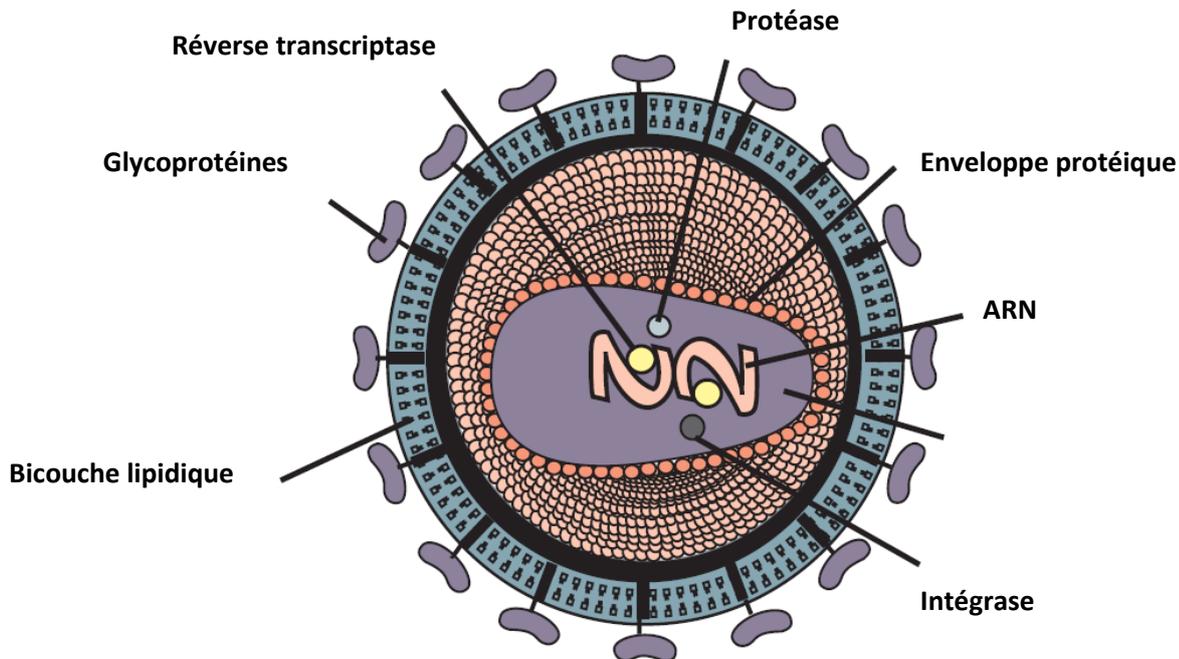
L'agent pathogène du SIDA est le VIH-1 Virus de l'Immunodéficience Acquis de type 1. Il s'agit d'un rétrovirus. Ce virus contient un génome à ARN et l'enzyme reverse transcriptase (ADN polymérase dépendant de l'ARN).

De nombreux membres de la famille des rétrovirus sont responsables de pathogénèses de certains types de leucémies et de sarcomes chez l'homme et l'animal.

La structure et le mécanisme de réplication du virus VIH et semblables à ceux d'autres rétrovirus. Le VIH est cependant unique en ce sens qu'il cible spécifiquement le système

immunitaire de son hôte, il est immunoévasif et se développe de façon significative dans les derniers stades de la maladie. Il peut en outre de transmettre lors des rapports sexuels.

La particule virale de VIH est entourée d'une bicouche lipidique fournie par la cellule hôte lors du bourgeonnement. Les protéines virales situées à la surface de la bicouche lipidiques sont identifiées par les préfix gp pour glycoprotéines et p pour protéines suivies d'un nombre indiquant le poids moléculaire approximatif en kilodaltons.



La bicouche lipidique contient ainsi les protéines **gp120**, **gp160** et **gp41**. La **gp41** ancre la gp 120 dans la bicouche lipidique. Sous la bicouche lipidique se trouve une capside formée par p17 et p18.

A l'intérieur de cette enveloppe se trouve le noyau viral. Ce noyau viral est formé de p24 et p25 et dans ce noyau viral se trouvent deux molécules d'ARN identiques longues de 9000 nucléotides. Associée par liaison hydrogène à chaque ARN viral se trouve une molécule d'ARNt cellulaire. Le noyau viral contient approximativement 50 molécules de reverse transcriptase.

Mécanisme de l'infection par le VIH

Un individu peut être contaminé par le VIH après une abrasion d'une surface muqueuse (par exemple les parois génitales ou rectales), une transfusion sanguine ou une injection avec une aiguille contaminée.

Le virus ou des cellules infectées se trouvent dans les fluides corporels comme le sang ou le liquide séminal.

Dans les premiers stades de l'infection d'un individu immunocompétent, le VIH provoque une réponse immunitaire humorale et cellulaire qui aboutit à la circulation d'une variété de molécules d'IgG (immunoglobulines G) visant plusieurs épitopes viraux. Cependant le VIH présentant un taux de mutation élevé les mutants survivent et leur progéniture a la même capacité d'échapper à l'immunosurveillance.

Contrairement aux autres ADN polymérase cellulaires, l'ADN polymérase du VIH (réverse transcriptase) présente un taux d'erreurs de transcriptions élevé. Ces mutations fréquentes modifient continuellement les protéines virales (épitopes). Les chercheurs pensent que c'est ce mécanisme qui est principalement responsable de l'immunoévasion du VIH. Les principales cibles du VIH sont les cellules hématopoïétiques telles que les monocytes produits par la moelle osseuse, les myélocytes et les lymphocytes. L'infection des principaux effecteurs du système immunitaire tels que les lymphocytes T et les macrophages est responsable des principaux effets cliniques du SIDA.

La gp120 se lie aux récepteurs CD4 à la surface des lymphocytes T auxiliaires (Lymphocytes T helpers ou cellules TH). Ces récepteurs sont des glycoprotéines liées à la membrane et sont impliqués dans la maturation des lymphocytes T à partir de leurs précurseurs. Les lymphocytes T auxiliaires sont indispensables à toutes les réponses immunitaires.

La bicouche lipidique virale fusionne avec la membrane de la cellule et le noyau viral pénètre dans la cellule par endocytose à récepteur. Ensuite le reste des récepteurs CD4 sont intériorisés dans la cellule et la gp120 apparaît à la surface du lymphocyte.

Réplication du VIH et transcription.

Par l'intermédiaire d'un mécanisme complexe impliquant plusieurs étapes, la transcriptase réverse synthétise l'ADN double brin qui est la copie de l'ARN génomique du virus. La molécule d'ARNt joue le rôle d'amorce pour la synthèse du premier brin d'ADN. La transcriptase reverse grâce à son activité RNase régrade le brin ARN du duplexe ADN-ARN et ensuite son activité polymérase synthétise le brin ADN complémentaire. L'ADN double brin transcrit migre dans le noyau de la cellule, il est ensuite intégré de façon covalente dans le génome cellulaire. L'intégration est catalysée par l'intégrase présente initialement dans le VIH.

L'ADN transcrit s'intègre via des séquences auto complémentaires aux deux extrémités appelées séquences terminales longues répétées. Ces séquences ont une fonction importante dans la transcription virale.

L'ADN intégré dans le génome de la cellule est appelé ADN proviral ou provirus. Le provirus rentre dans une période de latence qui peut durer plusieurs années. Il est répliqué avec l'ADN de la cellule hôte et est transmis aux générations de cellule suivantes.

L'ADN proviral du HIV contient la plupart des gènes communs aux rétrovirus. Ces gènes sont gag, pol, et env. Le VIH contient cinq ou six autres gènes plus petits. La transcription rétrovirale est un processus complexe qui produit de l'ARN. La promotion de la transcription est contrôlée par les séquences longues répétées est les signaux terminaux de la transcription sont localisés dans les chaque gène principal. Ces ARN transcrits qui demeurent non épissés se retrouvent dans les nouvelles particules virales.

Le gène gag est traduit en un polypeptide qui est clivé par une protéase virale en 4 protéines et forment l'enveloppe protéique interne du VIH. En raison de l'importance de l'action des protéases dans la multiplication du VIH, des inhibiteurs spécifiques à ces enzymes sont utilisés pour inhiber la production de protéines et limiter la prolifération du VIH chez les patients souffrant du SIDA.

Le gène pol code pour la transcriptase reverse et l'intégrase. Le gène env, code pour les glycoprotéines que la particule virale acquiert lorsqu'elle bourgeonne depuis la cellule.

La réponse immunitaire.

Les macrophages sont des monocytes circulants qui sont impliqués dans la phagocytose non spécifique des corps étrangers et des débris cellulaires. Ces matériaux sont dégradés par les lysosomes présents dans les macrophages. Les peptides provenant des protéines dégradées sont transportés jusqu'à la surface des macrophages et demeurent liés à des récepteurs spécifiques. Les lymphocytes TH inactifs interagissent avec ces complexes antigène-récepteur de surface ce qui leur permet d'être pleinement activés. Le VIH infecte les macrophages en se liant à leurs récepteurs CD4. Les lymphocytes TH activés sécrètent plusieurs types de facteurs collectivement appelés lymphokines. Certains de ces facteurs sont des interleukines qui provoquent la sécrétion d'anticorps par les lymphocytes B, permettent l'activation des macrophages et stimulent l'accroissement général de la population des lymphocytes T et active les lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T cytotoxiques sont impliqués dans la destruction des cellules étrangères et des cellules infectées par des virus.

Les lymphocytes TH infectés par le VIH demeurent dans un état relativement tranquille semblable à celui de cellule non infectées. Quand un lymphocyte TH contenant le provirus subit une activation antigénique, l'ADN viral copié intégré à son génome devient disponible pour la transcription de l'ARN viral.

La réplication virale occasionne la destruction des cellules TH. Les cellules TH infectées forment également des cellules fusionnées également appelées syncytia. Les syncytia se produisent lorsque les gp120 présentes sur les cellules infectées se lient aux récepteurs CD4 et autres cellules TH. Une transmission du virus de cellule à cellule peut alors se produire dans les syncytia sans avoir recours à des intermédiaires viraux libres. La réplication du virus se produit également dans les macrophages activés ce qui provoque leur destruction et la libération de particules virales. Ces événements provoquent l'effondrement du système immunitaire.

La longue période de latence entre la contamination et le développement du SIDA serait liée à la l'activation ou non des cellules TH. A chaque contact entre l'organisme de l'individu contaminé mais encore asymptomatique, avec des antigènes (bactéries, virus ou même produits chimiques), une partie des cellules TH répondant à cet antigène vont être activées. L'activation des cellules TH portant le provirus va provoquer la réplication du virus et la mort de ces cellules. Après plusieurs vagues successives d'infections la population des cellules TH et des macrophages s'effondre et le SIDA se développe.

Un très petit nombre de personnes ont coexisté avec le VIH pendant plus de 15 ans sans que les raisons de cette coexistence soit bien comprise. L'hygiène de vie (bonne alimentation, pratique régulière du sport et techniques permettant de limiter le stress), semble être un facteur important. Des études génétiques visent à déterminer si de subtiles différences génétiques dans les systèmes immunitaires constituent des facteurs déterminants.

Description de la méthode simulée de détection du VIH.

La méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a été initialement développée pour le dosage d'anticorps. Ces tests ont aussi été adaptés avec succès à la détection d'antigènes dans des échantillons.

Cette simulation de test de détection du VIH par ELISA a été conçue pour détecter des IgG dirigés contre des antigènes du VIH simulé.

Les tests sont réalisés dans des plaques de microtitration en matière plastique formant des micros puits dans lesquels les échantillons à l'état liquide sont déposés.

Les différentes étapes du protocole de la réaction ELISA sont détaillées ci-après.

Etape 1

Des antigènes sont placés dans les puits et certains vont demeurer adsorbés par les surfaces des puits par liaisons hydrophobes. Les antigènes peuvent être des lysates, du HIV, des protéines spécifiques du HIV, ou un mélange des deux.

Il n'y a pas de réaction particulière impliquée dans le mécanisme d'adsorption entre les antigènes et les parois des puits et les différentes substances expriment chacune un mode de liaison particulier.

Dans certains tests ELISA, les antigènes sont liés de façon covalente aux puits par traitement UV.

Etape 2 :

Les puits sont lavés pour évacuer les antigènes non adsorbés.

Etape 3 :

Les sites inoccupés sur les parois des puits sont bloqués avec des protéines, par exemple de la gélatine ou de l'albumine sérique bovine.

Etape 4 :

L'infection par le VIH provoque chez l'individu une réponse immunitaire qui s'exprime par la production d'IgG dans le plasma qui se lie spécifiquement aux différentes protéines du VIH (ou à différents sites d'une même protéine).

Si ces anticorps sont présents dans le plasma de la personne testée, ils vont se lier spécifiquement aux antigènes adsorbés dans les puits et y demeurer après lavage.

En revanche si le patient testé n'est pas infecté par le VIH, aucun IgG ne va se lier aux antigènes adsorbés.

On a recours ensuite à des anticorps secondaires qui sont produits par des lapins ou des chèvres immunisés avec des IgG humaines. Ces anticorps secondaires (Anti-HIV-IgG) sont purifiés et liés de façon covalente à des peroxydases de radis noir.

Cette modification ne modifie pas l'affinité de ces anticorps et l'activité enzymatique de la peroxydase.

Etape 5 :

Les puits sont lavés pour évacuer les anticorps secondaires non liés.

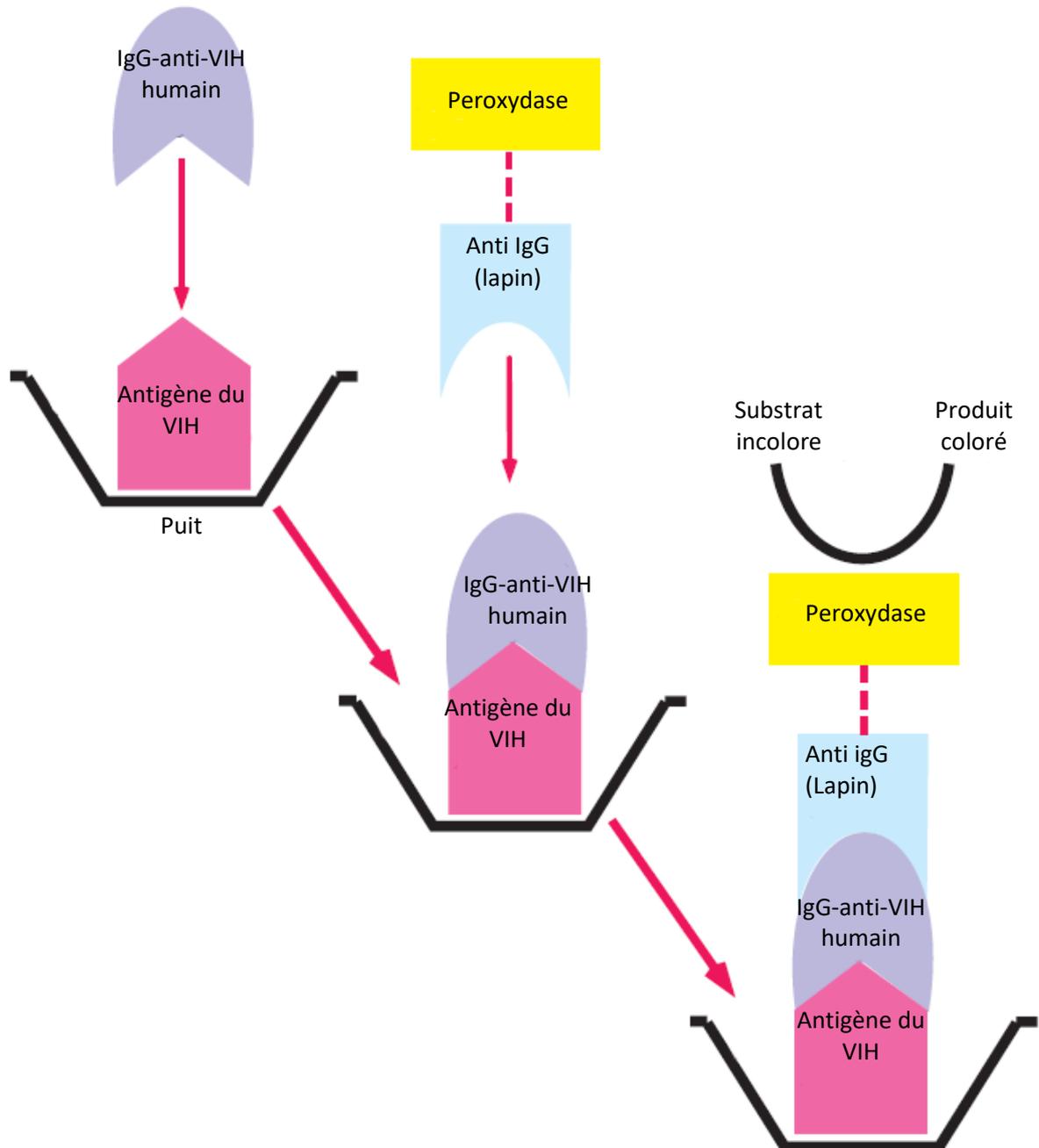
Etape 6 :

Après lavage, une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et de l'aminosalicylate est ajoutée dans chaque puits. La peroxydase présente une forte activité enzymatique qui peut dépasser un taux de rotation de 106 par seconde.

Par conséquent il se produit une amplification d'un échantillon positif au VIH de plusieurs ordres de grandeur. Un grand nombre de co-substrats hydrogène donneurs peuvent être utilisés avec la peroxydase. Dans ce TP on utilise de l'aminosalicylate.

La solution de co-substrat utilisée pour la réaction ELISA est presque incolore. La peroxydase transforme les peroxydes en H₂O + O₂ utilisant l'aminosalicylate comme donneur d'hydrogène. L'aminosalicylate oxydé prend une couleur brune qui peut être facilement observée dans les puits contenant des IgG-anti-HIV (plasma positif).

Présentation schématique du test ELISA



5. Grandes lignes et instructions générales :

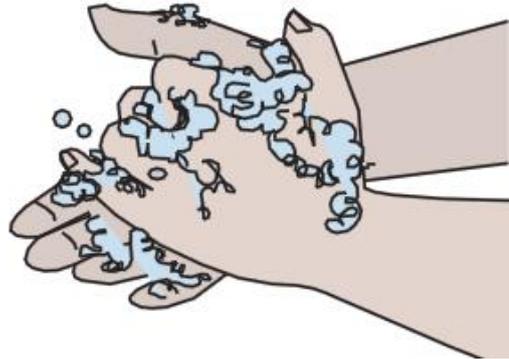
Objectifs de l'expérience

L'objectif du TP est de réaliser un dépistage simulé du VIH par ELISA en suivant un protocole précis.

Sécurité

Porter de lunettes de sécurité ainsi que des gants pendant toute la durée de l'expérience.

Se laver les mains au savon et à grande eau avec soin après la manipulation.



Ne pas pipeter à la bouche, utiliser une poire à pipeter ou un pipeteur.

Prendre toutes les précautions d'usage pour garantir la sécurité lors de l'utilisation des appareils de laboratoire de chauffage (étuves, incubateurs...)

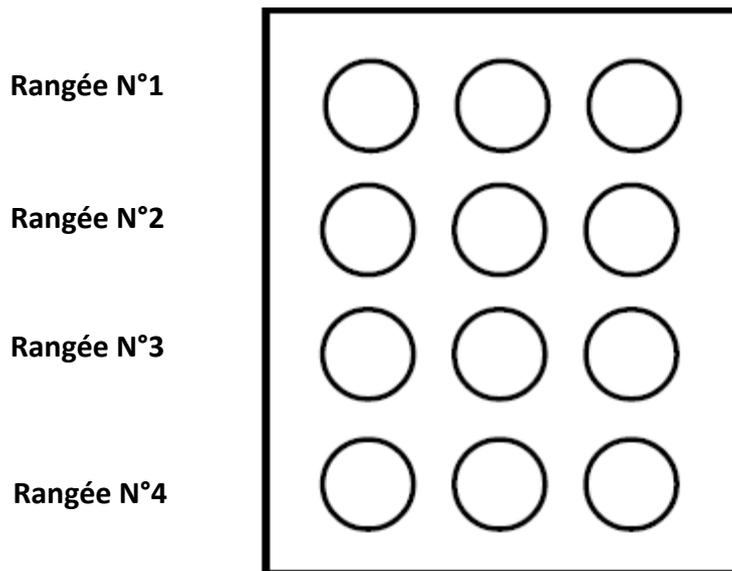
6. Préparation de l'expérience :

Préparation de l'incubateur

Mettre l'incubateur en marche de façon à ce que sa température soit stabilisée à 37 °C avant le début de l'expérience.

1- Identification des microplaques à titration

- Placer les microplaques à titration verticalement comme indiqué dans le schéma ci-après.
- Noter le nom du binôme ou du groupe d'élèves et numéroter les rangées de 1 à 4.



2- Identification des pipettes de transfert.

- Identifier les pipettes de transfert comme indiqué ci-après.

(-) Négatif

(+) Positif

DS 1 Sérum du donneur N° 1

DS 2 Sérum du donneur N° 2

TPS Tampon phosphate salin.

7. Instructions pour ajouter les solutions et laver les puits :

Ajout des solutions.

Pour ajouter les solutions dans les puits utiliser la même pipette de transfert de 1 mL.

Rincer la pipette soigneusement à l'eau distillée avant de l'utiliser pour ajouter le réactif suivant.

Retrait du liquide et lavage

Lorsqu'il est indiqué dans le protocole (détaillé ci-après) de retirer les liquides des puits avec les pipettes appropriées et laver les puits comme indiqué ci-dessous :

Utiliser la pipette de transfert indiquée « TPS » pour ajouter du tampon TPS dans tous les puits. Ajouter de la solution jusqu'à ce que les puits soient presque remplis.

La contenance de chaque puits est approximativement de 0,2 mL. **Ne pas faire couler le contenu des puits dans les puits adjacents.**

Avec la pipette appropriée retirer la solution de TPS de chaque puits et le verser dans un bécher identifié comme « poubelle ».

8. Protocole expérimental :

Suivre pas à pas les étapes suivantes :

- 1- Dans chaque puits ajouter 100 µL de « VIH » (antigène viraux).
- 2- Laisser incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- 3- Retirer le liquide (antigènes viraux) avec la pipette de transfert.
- 4- Rincer chaque puits avec du tampon TPS comme indiqué dans le paragraphe précédent.

Remarque :

A ce stade, dans le protocole ELISA, les sites dans les puits sont saturés avec une solution de blocage constitué d'un mélange de protéines (albumine sérique bovine par exemple).

Ce TP a été adapté pour éliminer cette étape pour gagner du temps et simplifier l'expérience pour les élèves.

- 5- Ajouter les réactifs comme indiqué ci-dessous.

Bien rincer la pipette de 1 mL soigneusement et abondamment à l'eau distillée avant d'ajouter un nouveau réactif.

Si une micropipette automatique est utilisée pour cette étape prendre une nouvelle pointe pour chaque réactif.

- Ajouter 100 µL de tampon TPS dans les 3 puits de la rangée N° 1 (cette rangée jouera le rôle de témoin (contrôle négatif).

- Ajouter 100 µL de solution (+) (positif) dans les 3 puits de la rangée N° 2 (cette rangée jouera le rôle du contrôle positif).

- Ajouter 100 µL de solution DS 1 (Sérum du donneur N°1) dans les 3 puits de la rangée N° 3.

- Ajouter 100 µL de solution DS 2 (Sérum du donneur N°2) dans les 3 puits de la rangée N° 4.

- 6- Incuber à 37°C pendant 15 minutes

- 7- Retirer le liquide de chaque puits avec la pipette de transfert appropriée (les pipettes ont été identifiées à cet effet).
- 8- Rincer chaque puits une fois avec tu tampon TPS (comme indiqué dans le chapitre précédent).
- 9- Ajouter 100 μ L de conjugué antiIgG/peroxydase dans tous les puits.
- 10- Incuber à 37 ° pendant 15 minutes.

A ce stade il faut préparer le substrat qui va être utilisé dans l'étape 13. En effet le substrat doit être préparé juste avant utilisation. L'enseignant préparera cette solution pendant le temps d'incubation de l'étape 10.

- 11- Retirer le liquide de chaque puits en prenant toutes les précautions indiquées dans le chapitre précédent.
- 12- Rincer chaque puits une fois avec tu tampon TPS (comme indiqué dans le chapitre précédent).
- 13- Ajouter 100 μ L de substrat dans chaque puits.
- 14- Incuber à 37 °C pendant 5 minutes.
- 15- Sortir la plaque à microtitration pour observation.
- 16- Si la couleur n'est pas suffisamment apparue après 5 minutes, remettre à l'incuber à 37 °C pendant un temps plus long.

9. Remarque à destination de l'enseignant :

La préparation de des réactifs et du matériel avant la séance de TP prend approximativement entre 1 heure et 1 heure et demi.

La séance de TP pour l'élève dure environ 1 heure.

10. Préparation de l'expérience :

Préparation avant le TP

Préparation des plaques à microtitration :

- Comme indiqué dans le schéma ci-après, orienter la plaque de telle sorte que les numéros 1 à 12 soient en haut et les lettres A à F à la gauche de la plaque.
- Découper la plaque selon les lignes en pointillés figurant sur le schéma, chaque plaque découpée devra comporter 4 rangées de 3 puits. Chaque groupe recevra une plaque découpée.

Distribution des solutions A à D:

- Distribuer les solutions A à D en utilisant à chaque changement de solution une pipette neuve de 1 mL (fournie) en les prélevant directement dans les tubes contenant ces composés. Identifier les microtubes à couvercles et les distribuer à chaque groupe.

11. Préparation le jour du TP

Préparation du tampon phosphate salin

- 1 Ajouter tout le tampon phosphate salin concentré (solution H) à 270 mL d'eau distillée et mélanger.
- Identifier le flacon contenant cette solution comme « TPS ».
- Verser 25 mL de solution dans des petits bécher et les distribuer à chacun des 10 groupes.

Préparation du conjugué anti IgG- Peroxydase (anticorps secondaire)

- Ajouter 0,3 mL de tampon phosphate salin dilué (TPS) dans la solution concentré de conjugué anti IgG-peroxydase (solution E). Mélanger soigneusement en tapotant et retournant le tube.
- Transférer 15 mL de TPS dans le tube de 50 mL fourni.
- Transférer la totalité du contenu du tube E dans le tube de 50 mL contenant les 15 mL de TPS. Identifier le tube « AC 2^{ndaire} »
- Distribuer 1,4 mL de cette solution à chaque groupe.

12. Préparation pendant le TP

A préparer 15-30 minutes avant la dernière incubation.

- Verser 13,5 mL de TPS dans le second tube de 50 mL fourni.
- Ajouter l'acide aminosalicylique aux 13,5 mL de TPS. Fermer le tube et mélanger soigneusement en agitant. Il peut ya avoir du produit insoluble dans le fond du tube.

- Ajouter 1,5 mL de peroxyde d'hydrogène. Boucher le tube et mélanger.
- Distribuer 1,4 mL de solution (substrat) à chaque groupe.

13. Tableaux récapitulatifs :

Solution	Nom	Identification	Distribuer à chaque groupe
A*	Antigène HIV	VIH	1,4 mL
B*	Contrôle positif	(+)	0,4 mL
C*	Sérum du donneur 1	DS 1	0,4 mL
D*	Sérum du donneur 2	DS 2	0,4 mL
E+TPS	Conjugué anti IgG - peroxydase	AC 2 ^{ndaire}	1,4 mL
TPS+F+G	Substrat pour l'enzyme proxydase	Substrat	1,4 mL
H + eau	Tampon phosphate salin	TPS	25 mL

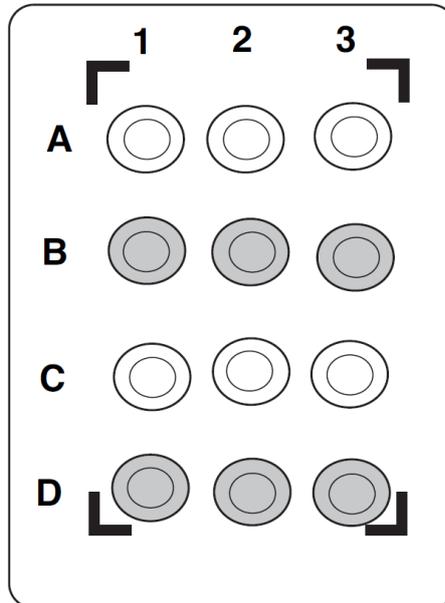
* Les solutions A à D peuvent être préparées quelques jours avant le jour du TP et stockées au réfrigérateur. Si elles sont préparées le jour du TP elles peuvent être alors stockées à température ambiante.

Matériel dont doit disposer chaque groupe

Plaque à microtitration découpée	1
Tube identifié VIH	1
Tube identifié (+)	1
Tube identifié DS 1	1
Tube identifié DS 2	1
Tube identifié AC 2 ^{ndaire}	1
Pipette de 1mL (ou micropipette automatique avec pointes)	1
Poire à pipeter	1
Pipette de transfert	5
Bécher contenant 16 ml de TPS	1
Bécher contenant 100 ml d'eau déminéralisée	1
Bécher vide identifié « poubelle »	1
Tube identifié « Substrat »	1

14. Résultats attendus :

Le donneur N° 2 doit être positif. L'aspect des puits de la rangée correspondant au donneur N° 2 doit avoir le même aspect que ceux du contrôle positif.



15. Erreurs à éviter :

- 1- Informer les élèves d'être très soigneux lors des opérations de transfert des solutions dans les puits et lors des opérations de lavage des puits.
- 2- N'utiliser que les pipettes correspondant aux solutions prélevées et éviter les contaminations des puits avoisinants.
- 3- Ne pas tenter de vider les puits en les secouant. Cela n'a pour effet que de contaminer les puits avoisinant.
- 4- Laver les puits lentement soigneusement sans précipitation.

16. Nous contacter :

Ce matériel est garanti 2 ans. Pour toutes questions, veuillez contacter :

sav@sciencethic.com

www.sciencethic.com