

RECHERCHE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PAR LE TEST D'OUCHTERLONY
VERSION « PRODUITS DE SUBSTITUTION »

La spécificité d'un anticorps est liée à sa capacité de liaison avec une molécule donnée présentant des propriétés antigéniques. Le test d'immunodiffusion, ou test d'Ouchterlony, permet la mise en évidence de cette liaison antigène-anticorps.

On cherche à savoir si les anticorps contre l'albumine de sérum de bœuf (BSA) ont une spécificité stricte vis à vis de la BSA.

Matériel :

- une plaque chauffante et une balance électronique sur paillasse professeur, (utilisables par plusieurs groupes si nécessaire) ;
- un bécher, une éprouvette graduée ou équivalent 10mL, une coupelle, une pince en bois, un flacon d'Agar ;
- un flacon d'eau distillée, une spatule, pipette 10 mL et pipeteur, deux petites boîtes de Pétri; éventuellement un gabarit de perçage ;
- un tube emporte-pièce, un cure-dents, une aiguille lancéolée, un marqueur, un compte-gouttes par produit, des gants ;
- sérum de lapin (= S) contenant des anticorps anti BSA (Albumine de Sérum de Bœuf) remplacé par un produit de substitution ;
- eau distillée (= E) et 4 solutions d'albumine d'espèces différentes remplacées par des produits de substitution mimant les albumines extraites de : œuf de poule = O lait de vache = L sérum de bœuf = B sérum de cheval = C
- si besoin une lampe de bureau et une petite feuille de papier noir pour observer les résultats.

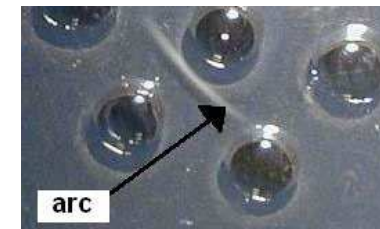
Activités et conditions des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1- Réaliser la partie I du protocole de la fiche technique candidat. Appeler l'examineur pour vérifier la qualité des boîtes de gel et obtenir éventuellement une boîte de secours	Réaliser une manipulation d'après un protocole Respect des étapes du protocole Utilisation maîtrisée du matériel	4
2- Après lecture du protocole de la fiche technique candidat (<u>partie II et III</u>), choisir la disposition des produits dans la boîte de Pétri et l'indiquer sur le schéma de la fiche réponse candidat. Justifier ce choix. Appeler l'examineur pour vérifier et obtenir éventuellement un document de secours	Adopter une démarche explicative	3
3- Réaliser les parties II et III du protocole de la fiche technique candidat. Appeler l'examineur pour obtenir les résultats	Réaliser une manipulation d'après un protocole Respect des étapes du protocole Utilisation maîtrisée du matériel	6
4- Représenter sur la fiche réponse le résultat fourni. Réaliser deux schémas qui représentent au niveau moléculaire : <ul style="list-style-type: none"> - la formation de l'arc de précipitation, - l'absence d'arc. Pour la représentation des anticorps, utiliser le modèle de la fiche réponse.	Traduire des informations par des schémas	5
5- Déterminer , à l'aide des résultats fournis, si les anticorps ont une spécificité stricte vis à vis de la BSA.	Adopter une démarche explicative	2

RECHERCHE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PAR LE TEST D'OUCHTERLONY VERSION « PRODUITS DE SUBSTITUTION »

Principe de la méthode d'Ouchterlony

C'est l'immunodiffusion sur gel : les solutions déposées dans les puits creusés dans le gel diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Deux auréoles de diffusion peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé. Cette zone de contact reste invisible s'il n'y a pas de réaction entre les deux solutions. Quand il y a réaction entre les solutions, il se forme un arc de précipitation visible à l'œil nu. Celui-ci est dû à l'interaction entre de nombreux anticorps et les antigènes spécifiques, entraînant la formation d'un complexe immun.

NB : le temps de réaction avec les produits véritables est de l'ordre de 24h ; vous manipulez ici sur des produits de substitution mimant les réactions réelles mais permettant une lecture des résultats au bout de 40 min, permettant l'évaluation de votre manipulation. Cependant, après avoir réalisé le protocole, vous disposerez, pour lire les résultats, d'une boîte préparée à l'avance.



PROTOCOLE

I - Préparation d'un gel d'Agar à couler dans deux boîtes de Pétri pour test d'Ouchterlony (une boîte pour s'exercer)

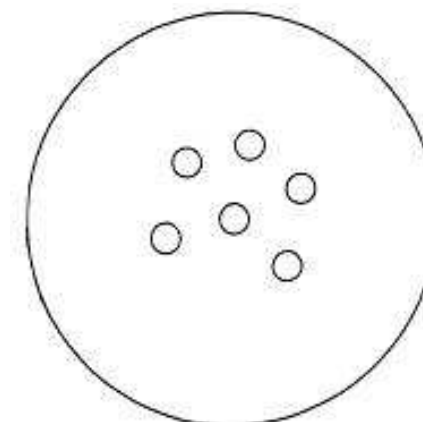
1. **Peser** dans la coupelle 0,2g d'Agar prélevés à l'aide de la spatule.
2. **Verser** 14 mL de tampon puis l'Agar dans le Bécher et **dissoudre** soigneusement l'Agar avec la spatule.
3. **Chauffer** le mélange en remuant à la spatule jusqu'à ce que le mélange devienne limpide et arrêter au tout début de l'ébullition.
4. **Retirer** à l'aide de la pince en bois **et attendre** une minute pour manipuler le Bécher sans se brûler.
5. **Pipeter** 5 mL de gel d'Agar chaud et fluide et le verser dans une boîte de Pétri.
6. **Egaliser** le niveau et **supprimer** rapidement les bulles.
7. **Recommencer** pour la deuxième boîte de Pétri (boîte pour s'exercer).
8. **Ne pas remuer les boîtes avant prise du gel d'Agar : environ 5 min.**

II- Préparation du test :

1. **Creuser** les puits nécessaires dans le gel d'Agar d'une boîte de Pétri.
2. **Utiliser** le gabarit ci-contre (ou celui fourni) pour répartir les puits nécessaires.
S'exercer avec la deuxième boîte pour creuser les puits avec l'emporte-pièce.
3. **Utiliser** le cure-dent pour éliminer les disques de gélose si nécessaire.

III- Réalisation du test :

1. **Marquer** sur la boîte de Pétri la disposition des produits à déposer dans les puits permettant de révéler la réaction de l'anticorps étudié avec les différents antigènes proposés.
2. **Remplir** les puits : le produit, prélevé dans un tube avec un compte goutte propre, doit être déposé dans le puits approprié sans débordement ni bulles et sans endommager le gel d'agar.
S'exercer avec la boîte d'apprentissage et de l'eau distillée.
3. **Observer** les résultats fournis sur fond noir et en éclairage rasant.



Gabarit de perçage

Dans le gel d'Agar