

## RECHERCHE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PAR LE TEST D'OUCHTERLONY

Fiche sujet - candidat

La spécificité d'un anticorps est liée à sa capacité de liaison avec un antigène. 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, un bécher, une éprouvette graduée ou une pipette + propipette pour mesurer 10 mL
- une coupelle, une pince en bois, un flacon d'agar, un flacon d'eau distillée, une spatule, du papier absorbant, gants, lunettes
- une boîte de Pétri (6 cm de diamètre) ; un tube emporte-pièce et un cure-dent ou une aiguille lancéolée
- un marqueur (pour marquer la boîte de Pétri), un gabarit de perçage, un récipient poubelle
- sérum de lapin (= S) contenant des anticorps anti BSA (Albumine de Sérum de Bœuf)
- eau distillée (= E) et 4 solutions d'albumine extraites de : chèvre = O      lait de vache = L      sérum de bœuf = B      sérum de cheval = C
- une micro-pipette avec embouts ou un compte-goutte pour chaque produit, un chronomètre ; une lampe de bureau et une petite feuille de papier noir

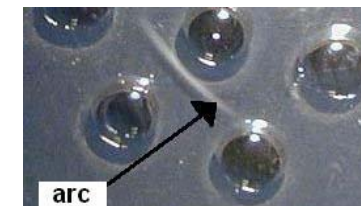
Activités et conditions des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1- <b>Réaliser</b> la partie I du protocole de la fiche protocole-candidat. <b>Appeler l'examineur pour vérifier la qualité de la boîte de gel et obtenir éventuellement une nouvelle boîte vide pour recommencer, ou une boîte de secours</b>	<b>Réaliser une manipulation d'après un protocole</b>	3
2- Pendant les 5 minutes de refroidissement, après lecture du protocole de la fiche protocole-candidat (partie II et III), <b>choisir</b> la disposition des produits dans la boîte de Pétri et <b>l'indiquer</b> sur le schéma de la fiche réponse candidat. <b>Justifier</b> ce choix par écrit. <b>Appeler l'examineur pour vérifier et obtenir éventuellement un document de secours</b>	<b>Comprendre la manipulation</b>	3
3- <b>Réaliser</b> les parties II puis III du protocole de la fiche protocole-candidat. <b>Appeler l'examineur pour réaliser la partie III puis obtenir les résultats</b>	<b>Réaliser une manipulation d'après un protocole</b> respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse	5
4- <b>Représenter</b> sur la fiche réponse-candidat le résultat fourni. <b>Réaliser</b> , en utilisant le modèle de la fiche réponse et d'autres symboles à votre convenance, deux schémas qui expliquent au niveau moléculaire la présence ou l'absence d'un arc de précipitation.	<b>Traduire des informations par un schéma</b>	6
5- <b>Déduire</b> des résultats fournis, si les anticorps ont une spécificité stricte vis à vis de la BSA.	<b>Adopter une démarche explicative</b>	2
6- <b>Ranger</b> le poste de travail.	<b>Gérer et organiser le poste de travail</b> , respecter les consignes de sécurité	1

## RECHERCHE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PAR LE TEST D'OUCHTERLONY

Fiche protocole - candidat

**Principe de la méthode d'Ouchterlony**

C'est une méthode d'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 de complexes immuns. Le temps de réaction est de l'ordre de 24h (c'est la raison pour laquelle, après avoir réalisé le protocole, vous disposerez, pour lire les résultats, d'une boîte préparée à l'avance).



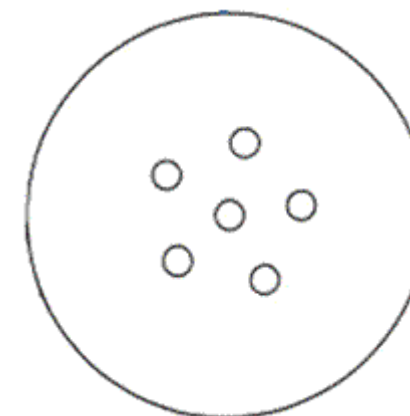
arc de précipitation

**PROTOCOLE :**

A chaque étape en cas d'erreur vous pouvez utiliser des boîtes de secours pour reprendre votre manipulation là où vous avez fait l'erreur.

**I- Préparation d'un gel d'agar (= gélose) à couler dans une boîte de Pétri pour test d'Ouchterlony**

1. **organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement et en suivant les consignes de sécurité ;
2. **peser** dans la coupelle 0,2g d'agar prélevés à l'aide de la spatule ;
3. **verser** 14 mL d'eau distillée puis l'agar dans le bécher et **mélanger** soigneusement l'agar avec la spatule ;
4. **chauffer** le mélange en remuant à la spatule jusqu'à ce qu'il devienne limpide et **arrêter 20 à 30 s après le début de l'ébullition** ;
5. **retirer** à l'aide de la pince en bois, attendre quelques secondes que le bécher refroidisse afin de pouvoir le saisir sans se brûler ;
6. **Utiliser** le bécher pour verser 1/3 de l'agar chaud dans la boîte de Pétri, soit une hauteur d'un ½ cm ;
7. **égaliser** le niveau et **supprimer** rapidement les bulles ;
8. **laisser** la boîte refroidir sans mettre le couvercle ;
9. ne pas remuer la boîte avant prise du gel d'agar : au moins 5 mn.



Gabarit de perçage dans le gel d'agar

**II- Préparation du test**

1. **utiliser** le gabarit de perçage ci-contre (ou celui qui vous est fourni) pour **creuser** à l'aide du tube emporte pièce les puits nécessaires dans le gel d'agar ;
2. **éliminer** les disques de gel avec le cure-dent si nécessaire.

**III- Réalisation des dépôts**

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 (utiliser le même ordre que celui que vous avez proposé à la question 2) ;
2. **remplir** les différents puits **sans déborder** : chaque produit devra être prélevé avec un compte goutte propre ou une micropipette à embout propre, puis être déposé dans les puits sans débordement ni bulles et sans endommager le gel d'agar ;
3. **fermer** la boîte ;
4. **observer** les résultats fournis sur fond noir et en éclairage rasant.