

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

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 un produit de substitution correspondant aux anticorps anti BSA
- eau distillée (= E) et 4 solutions de produits de substitution correspondant aux albumines 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	Barème
1. Réaliser la partie I du protocole de la fiche protocole - candidat. 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	Réaliser une manipulation d'après un protocole	3
2. Après lecture du protocole de la fiche protocole - candidat (<u>parties 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 par écrit. Appeler l'examineur pour vérifier et obtenir éventuellement un document de secours	Comprendre la manipulation	3
3. Réaliser les parties II puis III du protocole de la fiche protocole - candidat. Appeler l'examineur pour réaliser la partie III puis obtenir éventuellement les résultats	Réaliser une manipulation d'après un protocole	5
4. Représenter sur la fiche réponse-candidat le résultat fourni. Réaliser ensuite, 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.	Traduire des informations par un schéma	6
5. Déduire des résultats fournis, si les anticorps ont une spécificité stricte vis à vis de la BSA.	Adopter une démarche explicative	2
6. Ranger le poste de travail.	Gérer et organiser le poste de travail	1

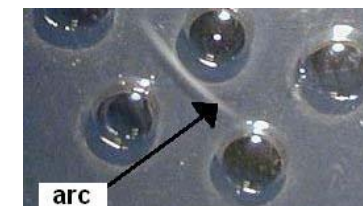
RECHERCHE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PAR LE TEST D'OUCHTERLONY

VERSION « PRODUITS DE SUBSTITUTION »

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 avec produits réels. Il est de quelques minutes avec les produits de substitution utilisés ici. Cependant, en cas d'absence de résultats lisibles en temps utile, vous disposerez, sans pénalité si votre manipulation est correcte, d'une boîte de résultats préparée à l'avance.



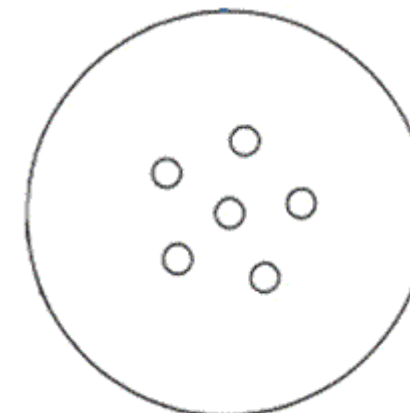
arc de précipitation

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.

Protocole

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 0,2 g 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 que le mélange devienne limpide et **arrêter 20 à 30s 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 vider environ 1/3 d'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.

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

VERSION « PRODUITS DE SUBSTITUTION »

Fiche laboratoire et évaluateurs 2/2

Préparation des boîtes de secours

Les boîtes peuvent être coulées quelques jours avant l'évaluation.

- Dissoudre 1g d'agar pour 100 mL d'eau distillée. Porter à ébullition en remuant constamment puis arrêter le chauffage.
- Lorsque le flacon peut être saisi dans la main sans se brûler (environ 60 °C), couler le gel d'agar obtenu, dans les boîtes de Pétri, sur une épaisseur d'environ 0,5 cm, ce qui représente environ 4,5 mL par boîte.
- Laisser refroidir sur une surface horizontale.

Conserver les boîtes au réfrigérateur, dans une boîte fermée hermétiquement et tapissée de papier absorbant humide pour réaliser une atmosphère saturée d'humidité.

Préparation des boîtes de résultats

- Préparer selon le protocole indiqué des boîtes de résultats à donner au candidat à l'issue du point 3. En cas d'impossibilité, utiliser [Ouch_ac_result_v2](#)

REMARQUES A L'ATTENTION DE L'EXAMINATEUR

Le candidat étudie un résultat fourni, mais la lecture a posteriori des résultats obtenus par lui intervient dans l'évaluation de la manipulation.

Evaluation de la question 2

L'examineur doit être présent auprès du candidat au moment où celui-ci distribue les produits (point 3 du protocole) dans les puits de manière à noter au plus juste le point 2 de la grille d'évaluation.

Evaluation de la question 4

On n'attend pas que l'élève justifie la formation d'un réseau mais illustre la complémentarité ou non de l'antigène et de l'anticorps.

Rôle des boîtes de secours et des boîtes de résultats

- Si une boîte de secours est fournie, le candidat n'obtient pas les points correspondants à l'étape non réussie mais peut continuer l'épreuve et obtenir tous les autres points. Si la manipulation a été correcte mais que les résultats ne sont pas ou peu lisibles dans le temps de l'épreuve, on donne sans pénalité une boîte de résultats ou la fiche [Ouch_ac_result_v2](#).

Rôle du document de secours

- Le document de secours n'est fourni que si le candidat n'a pas placé l'anticorps dans le puits central ; on admet toute disposition pour les puits périphériques.

- Si le document de secours est fourni, le candidat n'obtient pas les points correspondants à la question 2 mais peut continuer l'épreuve

Le document de secours et le document résultats peuvent être imprimés (impression couleur de bonne qualité) ou affichés à l'écran : utiliser alors les documents affichables (disponibles dans le dossier du sujet) : [oucht_ac_secours](#) et [ouch_ac_result_v2](#)

Prescriptions			Autorisations	
Blouse	Gants	Lunettes	Calculatrice	Papier brouillon
Oui, non fournie	Oui, fournis	Oui, fournies	non	Fourni par l'établissement