

**LE TEST D'IMMUNODIFFUSION OU TEST D'OUCHTERLONY : RECHERCHE D'UN ANTIGÈNE
VERSION « PRODUITS DE SUBSTITUTION »**

Fiche sujet - candidat

A des fins expérimentales, des lapins reçoivent par injection un antigène. Ils produisent alors des anticorps spécifiques contenus dans leur sérum dont la présence peut être mise en évidence par la méthode d'Ouchterlony. **On cherche à identifier l'antigène injecté à un lapin.**

Matériel

- une plaque chauffante et une balance électronique, un bécher, une éprouvette graduée ou une pipette + propipette permettant de 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 petite 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 du lapin (= S) contenant un produit de substitution correspondant à des anticorps dirigés contre l'antigène inconnu que l'on cherche à identifier
- eau distillée (= E) et 4 produits de substitution correspondant aux antigènes protéiques : pancréatine= P ; caséine= C ; hémoglobine= H ; albumine de sérum de bœuf (BSA)=B
- une micro-pipette avec embouts, un compte-goutte pour chaque produit, un chronomètre, une lampe de bureau et une petite feuille de papier noir.

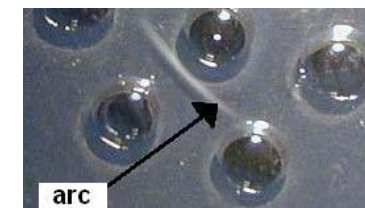
| Activités et conditions des activités | Capacités et principaux critères d'évaluation | Barème |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Réaliser la partie I du protocole de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour vérifier la qualité de la boîte et obtenir éventuellement une boîte vide pour recommencer ou une boîte de secours | Réaliser une manipulation d'après un protocole - respect des étapes du protocole - utilisation maîtrisée du matériel - organisation de la paillasse | 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. Appeler l'examineur pour vérifier et obtenir éventuellement une boîte ou un document de secours | Comprendre la manipulation | 3 |
| 3. Réaliser les parties II et III du protocole de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour vérifier et obtenir éventuellement les résultats | Réaliser une manipulation d'après un protocole - respect des étapes du protocole - utilisation maîtrisée du matériel - organisation de la paillasse | 5 |
| 4. Indiquer sur le schéma de la fiche réponse le résultat du test. | Traduire des informations par un schéma | 6 |
| 5. Dans chaque cas (formation de l'arc de précipitation, ou absence d'arc), réaliser un schéma d'interprétation à l'échelle moléculaire, en utilisant le symbole proposé dans la fiche réponse-candidat et d'autres à votre convenance. | Appliquer une démarche explicative | 2 |
| 6. A partir des résultats fournis, déterminer quel est l'antigène injecté au lapin. Justifier votre réponse. | Gérer et organiser le poste de travail comprenant le suivi des règles de sécurité | 1 |
| 7. Ranger le poste de travail. | | |

LE TEST D'IMMUNODIFFUSION OU TEST D'OUCHTERLONY : RECHERCHE D'UN ANTIGÈNE 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).

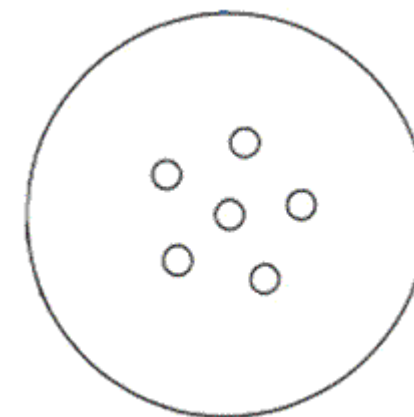


de précipitation

PROTOCOLE : à 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 0,2 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 qu'il devienne limpide (à ébullition)
5. **20 à 30 s après le début de l'ébullition, 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 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 : environ 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 (en cas de besoin, demander une boîte de résultats).