

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

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 Petri (6cm 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 des anticorps dirigés contre l'antigène inconnu injecté
- eau distillée (= E) et 4 solutions d'antigènes protéiques : pancréatine= P ; caséine= C ; hémoglobine= H ; albumine de sérum de bœuf (BSA)=B
- 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.

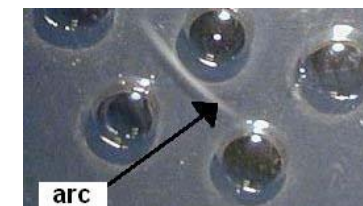
Activités et conditions des activités	Capacités et principaux critères d'évaluation	Barème
1. Réaliser la partie I du protocole de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour vérifier la qualité de la boîte et obtenir éventuellement une boîte vide pour recommencer ou une boîte de secours	Réaliser 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>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	Comprendre la manipulation	3
3. Réaliser les parties II et III du protocole de la fiche protocole-candidat. Appeler l'examineur pour obtenir les résultats	Réaliser une manipulation d'après un protocole	5
4. Indiquer sur le schéma de la fiche réponse-candidat 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. Pour cela, utiliser le symbole proposé dans la fiche réponse-candidat et d'autres à votre convenance.	Appliquer une démarche explicative	2
6. Déduire des résultats fournis, quel antigène a été injecté au lapin.	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

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).

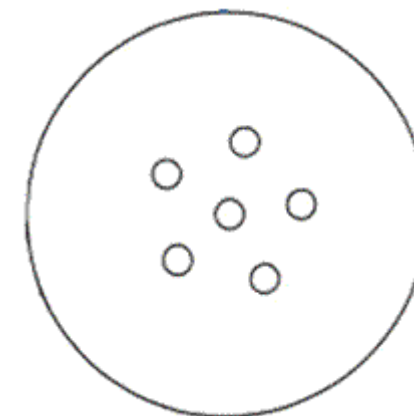


arc de précipitation

PROTOCOLE : 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** le bécher à l'aide de la pince en bois et attendre quelques secondes que le bécher refroidisse afin de pouvoir le saisir sans se brûler ;
6. **utiliser** le bécher pour verser 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 la 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 : 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 bulle et sans endommager le gel d'agar ;
3. **fermer** la boîte ;
4. **observer** les résultats fournis sur fond noir et en éclairage rasant.