

DÉTECTION D'ANTICORPS DANS LE SERUM DE LAPIN PAR ELECTROPHORESE

Fiche sujet - candidat

L'injection d'un antigène à un lapin déclenche des réactions immunitaires. Elles aboutissent à la synthèse d'anticorps présents dans le sérum et détectables par électrophorèse. Chez certains lapins, un déficit immunitaire empêche la production d'anticorps.

On cherche à déterminer si un lapin ayant reçu une injection d'antigène présente ou non un déficit immunitaire.

Matériel

- cuve à électrophorèse avec système de fixation
- 100ml de tampon d'électrophorèse à pH 9,2 et une éprouvette de 100ml
- trois bandes d'acétate de cellulose immergées dans du tampon véronal repérées par une, deux et trois coches (+ une bande de secours)
- applicateurs de sérum : lames à étalement en verre (environ 1,7 cm d'empreinte) ou équivalent, à identifier sur la paillasse
- trois flacons contenant les sérums de lapin mis en contact avec un antigène inoffensif (ou des produits de substitution) : L1 : lapin non immuno-déficient ; L2 : lapin immuno-déficient ; L : lapin à tester
- trois verres de montre ou boîtes de Pétri permettant de prélever les sérums afin de faire les dépôts, à identifier sur la paillasse
- papier filtre, pinces, gants, chronomètre, feutre
- bain de coloration avec rouge ponceau, trois bains de décoloration avec acide acétique à 5%, trois bandes « résultats » ayant subi l'électrophorèse, à colorer, trois supports de séchage.

Activités et déroulement des activités	Capacités et critères d'évaluation	Barème
1. Justifier l'intérêt de l'électrophorèse des trois sérums.	Comprendre la manipulation	3
2. Mettre en œuvre le protocole en suivant les indications de la fiche technique. Appeler l'examineur à chaque fois qu'il est indiqué dans le protocole	Réaliser une manipulation en suivant un protocole respect des étapes du protocole utilisation maîtrisée du matériel organisation de la paillasse	9
3. Réaliser la coloration des bandes d'électrophorèse « résultats » fournies.		
4. Représenter par un schéma les résultats de l'immuno-électrophorèse.	Traduire une observation par un schéma	5
5. Déduire de ces résultats si le lapin L présente un déficit immunitaire.	Appliquer une démarche explicative	2
6. Gérer le poste de travail, le ranger en fin d'épreuve.	Gérer et organiser le poste de travail et respecter les consignes de sécurité	1

DÉTECTION D'ANTICORPS DANS LE SERUM DE LAPIN PAR ELECTROPHORESE

Fiche protocole – candidat 1/2

Principe : en milieu basique, les protéines sont chargées négativement. Lorsqu'un mélange de protéines est soumis à un champ électrique, les protéines migrent à une distance caractéristique par rapport à la ligne de dépôt, en fonction de leur taille et de leur charge.

Les anticorps sont des protéines gamma-globulines.

Remarques : la migration nécessitant une durée d'une heure, des bandes d'acétate « résultats » ayant subi l'électrophorèse, seront distribuées pour coloration. Le rouge Ponceau est un colorant spécifique des protéines, ayant une grande affinité pour elles. Pour distinguer les bandes lors de la coloration, on leur attribue des repères : L → une coche, L1 → deux coches et L2 → 3 coches

**PROTOCOLE D'UTILISATION DU MATERIEL**

(NB : l'évaluation porte sur le suivi soigneux d'un protocole. Même si vous n'avez jamais réalisé seul une électrophorèse, cette manipulation est à votre portée).

MISE EN PLACE DES BANDES D'ACETATE DE CELLULOSE DANS LA CUVE :

1. **organiser** le poste de travail pour manipuler proprement et en respectant les règles de sécurité d'usage (port de la blouse et des gants) ;

Ne jamais toucher les bandes d'acétate de cellulose avec les doigts, sinon des traces apparaîtront à la coloration.

2. **sortir** les bandes du tampon véronal, dans lequel elles sont immergées, à l'aide d'une pince, les placer entre 2 feuilles de papier filtre;

3. **fixer** les trois bandes d'acétate de cellulose sur le portoir de la cuve, tendues autant que possible (sans les déchirer), de façon à ce que la face mate qui est absorbante soit sur le dessus. Les bandes doivent être parallèles entre elles et disposées dans l'ordre (de la gauche vers la droite) : une coche, deux coches et trois coches ;

4. **poser** le portoir dans la cuve et **verser** dans la cuve la quantité suffisante de tampon d'électrophorèse pour que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon d'électrophorèse ;

5. sachant que les protéines migrent du pôle négatif vers le pôle positif, **repérer** au feutre sur la paillasse le côté où se fera le dépôt.

DÉTECTION D'ANTICORPS DANS LE SERUM DE LAPIN PAR ELECTROPHORESE

Fiche protocole – candidat 2/2

DÉPOT DES SERUMS (ou de produits de substitution, le résultat de votre électrophorèse n'étant pas exploité en raison de la durée de la migration) :

1. **verser** les sérums dans les récipients permettant de faire les prélèvements avec les applicateurs ;

Appeler l'examineur pour qu'il vérifie le montage et qu'il soit présent au moment des dépôts

2. **tremper** l'applicateur dans le sérum du lapin L, **déposer** délicatement l'applicateur à environ 0,5 cm du bord, vers le pôle négatif (cathode), perpendiculairement au grand axe de la première bande (à gauche) d'acétate de cellulose (faire une application bien nette) **renouveler** l'opération avec les autres bandes pour les sérums L1 et L2.

MISE EN ROUTE DE L'ELECTROPHORÈSE :

1. **fermer** la cuve avec le couvercle ;
2. **vérifier** le raccordement de la cuve au générateur. **Respecter** la correspondance des couleurs des fils et des douilles ;
3. **régler** la tension du générateur sur 160V et vérifier son branchement ;

Appeler l'examineur pour vérifier juste avant de mettre sous tension

4. **mettre** le générateur en route.

La migration démarre et durera une heure.

Appeler l'examineur pour obtenir trois bandes d'électrophorèse prête(s) à la coloration

COLORATION DES BANDES « RESULTATS » :

1. **immerger** les trois bandes en même temps 3 minutes dans le Rouge Ponceau ;
2. **transférer** chaque bande dans 3 bains successifs d'acide acétique à 5% : 1 minute, 30 sec et 30 sec;
3. les **déposer** chacune sur un support de séchage, **laisser sécher**.