

Reconnaissance d'un antigène par un anticorps – Méthode d'Ouchterlony

Immunologie - Fiche technique - TP 4

Les anticorps anti BSA (anti sérum albumine bovine) sont obtenus à partir du sérum d'un animal auquel on a injecté de l'albumine bovine (BSA). Ces anticorps sont mis en contact, après diffusion en milieu gélosé, avec plusieurs sérums dans lesquels on recherche la présence de l'antigène BSA.

A. Principe

La méthode Ouchterlony est basée sur la diffusion de molécules (antigènes et anticorps) disposées dans des puits creusés dans une boîte de pétri remplie de milieu gélosé. La vitesse de diffusion dépend de la taille des molécules. La reconnaissance spécifique de l'anticorps avec l'antigène conduit à la formation d'un complexe antigène - anticorps (complexe immun) qui bloque alors la migration et conduit à la formation d'un arc de précipitation. Le temps de réaction est de l'ordre de 24 h au minimum.

B. Précaution expérimentale

Pour éviter toute contamination du milieu gélosé :

- Ne pas toucher ou souffler sur les géloses,
- Éviter les contacts des doigts avec les outils (emporte-pièce, pipette, embouts de micropipette).

C. Protocole expérimental

Matériel à disposition par binôme

- Une plaque chauffante et une balance électronique, un bécher, une éprouvette graduée ou équivalent 20 mL, une coupelle ou un verre de montre, une pince en bois, un flacon d'Agar, un flacon d'eau distillée, une spatule.
- Une petite boîte de Pétri (6 cm de diamètre), une pipette 10 mL et son pipeteur, un tube emporte-pièce et un cure-dent.
- Un marqueur (pour marquer la boîte de Pétri), un gabarit de perçage, un récipient poubelle.
- Les produits décrits sous la rubrique dépôt des solutions.
- Une pipette ElKay pour chaque produit, des gants.
- Une lampe et une petite feuille de papier noir.

Remarque : pour gagner du temps et ne pas attendre le refroidissement du gel d'Agar, une boîte de Pétri déjà prête est à votre disposition sur la table. Vous pourrez donc mener en parallèle la préparation du gel (1) et la suite du protocole (2 et 3).

1. Préparation d'un gel d'Agar et remplissage des boîtes de Pétri.

1. Organiser votre plan de travail pour manipuler proprement en suivant les consignes de sécurité.
2. Peser dans la coupelle ou le verre de montre 0,2g d'Agar prélevés à l'aide de la spatule.
3. Verser 14 mL d'eau distillée puis l'Agar dans le bécher, dissoudre 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 au début de l'ébullition.
5. Retirer le bécher à l'aide de la pince en bois, attendre quelques secondes que le bécher refroidisse afin pouvoir saisir le flacon sans se brûler.
6. Pipeter 5 mL de gel d'Agar chaud et fluide et le verser dans une boîte de Pétri.
7. Égaliser le niveau et supprimer rapidement les bulles.
8. Laisser la boîte refroidir sans mettre le couvercle.
9. Ne pas remuer les boîtes avant prise du gel d'Agar : au minimum 5 mn.
10. Fermer la boîte à l'aide du couvercle lorsque le gel est froid (*les boîtes ainsi préparées serviront aux groupes suivants*).
11. Conserver la boîte de Pétri retournée pour que la condensation ne retombe pas sur le gel.

2. Perforation des puits (creuser un puits central et cinq puits périphériques)

- Ouvrir la boîte de Pétri contenant le gel d'Agar, la retourner ensuite. Essuyer les gouttes de condensation qui auraient pu se former dans le couvercle retourné.
- Placer la boîte de Pétri sur le gabarit (page 2) et perforer la gélose à l'aide de l'emporte-pièce, retirer l'emporte-pièce, puis éjecter la gélose à l'aide de la poire. Il faut retirer complètement la gélose de chaque puits (*on peut s'aider d'un cure-dent*).

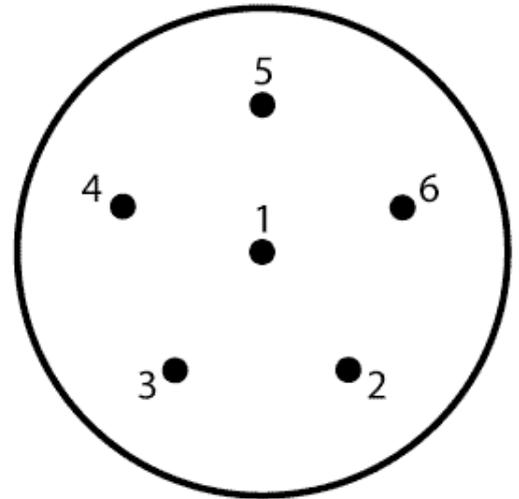
Une moitié de la classe réalisera la manipulation avec des produits réels (numérotés 1 à 6) et l'autre moitié avec des produits de remplacement (numérotés A à F). L'intérêt d'utiliser des produits de remplacement est de pouvoir observer le résultat après 40 minutes.

3. Identification des puits et dépôt des solutions

À l'aide d'un feutre ou d'un crayon gras rouge identifier chacun des puits sous la boîte de Pétri en numérotant de 1 à 6 (ou A à F) comme indiqué sur le schéma ci-contre.

Déposer la solution contenant les anticorps anti-BSA dans le puits central et les solutions contenant les antigènes dans les puits périphériques à raison d'une goutte à l'aide de pipettes Elkay.

-
- 1 (A) : Solution d'anticorps anti-BSA
 - 2 (B) : Témoin positif
 - 3 (C) : Témoin négatif
 - 4 (D) : Sérum complet de bovin
 - 5 (E) : Sérum complet de lapin
 - 6 (F) : Sérum complet d'âne.
-



Attention ! Ne jamais faire déborder les puits et éviter tout contact entre les solutions. Il est donc indispensable d'utiliser une pipette par solution.

À partir de cette étape, proscrire tout retournement de boîte.

Fermer la boîte de Pétri et l'entourer d'un film plastique alimentaire pour éviter la déshydratation du milieu

4. La migration

1. **Avec les produits de remplacement** qui miment les réactions réelles, la migration se fait en 40 minutes. L'observation peut alors se faire directement sur un fond noir en éclairage latéral avant la fin de la séance de T.P.
2. **Avec les produits réels**, la migration se fait en 24 à 48 h à 30°C (à l'incubateur si la salle est climatisée). Une fois l'arc de précipitation formé, les boîtes sont placées au réfrigérateur jusqu'à la prochaine séance.
 - L'observation peut alors se faire directement sur un fond noir en éclairage latéral.
 - On peut également réaliser une coloration du complexe immunitaire formé à l'aide du bleu de Coomassie.
 - o La coloration et le rinçage s'effectuent avec 5 ml de solution (le gel d'Agar doit être complètement recouvert).
 - o Recouvrir le gel de colorant pendant 10 à 15 minutes. Vider le colorant, puis rincer en recouvrant la gélose de la solution de décoloration pendant une quinzaine de minutes. Renouveler l'opération au moins deux fois.