

Kit Ouchterlony de substitution

Méthode de double diffusion

Réf. IMSUB

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
Garder les produits et le matériel à température ambiante
- Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

COMPOSITION DU COLIS :

Pour 30 binômes:

- 2 sachets contenant chacun 15 boîtes de pétri stériles de diamètre 55 mm
- 1 sachet à stocker à **température ambiante** contenant :
 - o 10 emporte-pièces en verre de 4 mm de diamètre
 - o 10 poires de 1 mL à goutte calibrée à 20 µL pour les dépôts des sérums
 - o 1 flacon en plastique vide de 250 mL
 - o 1 sachet noté « agar » contenant 3g d'agar
 - o 2 microtubes à bouchon rouge contenant 1 mL de solution mimant le sérum de lapin immunisé contre la BSA (NaOH)
 - o 2 microtubes à bouchon noir contenant 1 mL de solution mimant la BSA (ZnSO₄)
- 1 notice

MATERIEL NECESSAIRE :

- Pipette de 5 mL
- Poire à pipeter
- Epruvette de 250 mL
- Flacon en verre de 250 mL si vous n'avez pas de micro-ondes
- Boîte et papier absorbant pour constituer une enceinte humide
- Eau distillée
- Gant anti-chaleur ou manique de préhension
- Feutres permanents
- Micro-ondess ou éventuellement bain-marie
- Microtubes

MATERIEL CONSEILLE :

Portoir à microtubes

FICHE PREPARATEUR

1) Préparation de la gélose : dissoudre l'agar dans de l'eau distillée
(il est possible de réaliser cette étape quelques jours avant le TP et de conserver la gélose à 4°C)

a. Transvaser la poudre

Transvaser, dans un flacon de 250 mL, le contenu du sachet noté « agar »

☐NB☐ : Si vous disposez d'un micro-ondes, utilisez le flacon en plastique de 250 mL fourni pour faire la dilution. Si vous n'avez qu'un bain-marie, utilisez un flacon en verre de 250 mL

b. Dissoudre les poudres

Ajouter 220 mL d'eau distillée

c. Solubiliser les poudres

Mélanger

- Avec un micro-onde :

Utiliser le micro-onde pour faire chauffer le flacon de plastique contenant le mélange poudre-eau sans son bouchon. Surveiller régulièrement et remuer.

Arrêter de chauffer quand le mélange devient parfaitement translucide sans aucune suspension (à peu près quand l'ébullition commence).

👁👁 ATTENTION 👁👁 : le mélange obtenu est très chaud, utilisez des gants anti chaleur ou des maniques.

- Avec un bain-marie (prévoir quelques heures par sécurité) :

Mettre au bain-marie le flacon de verre contenant le mélange poudre-eau avec le bouchon dévissé. Surveiller régulièrement et remuer.

Arrêter de chauffer quand le mélange devient parfaitement translucide sans aucune suspension (à peu près 20 minutes si le bain-marie est proche de l'ébullition ou plus longtemps si le bain-marie est à une température inférieure).

👁👁 ATTENTION 👁👁 : le mélange obtenu est très chaud, utilisez des gants anti-chaleur ou des maniques.

☐NB☐ : Les volumes tiennent compte de l'évaporation et sont prévus de manière à avoir bien assez de gélose pour couler les boîtes.

2) Coulage des boîtes avec la gélose chaude :

(il est possible de réaliser cette étape quelques jours avant le TP et de conserver les boîtes coulées à 4°C dans une enceinte humide pendant 2 à 3 jours)

Prélever la gélose chaude (environ 55-60°C) avec une pipette de 5 mL.

Couler entre 4 et 5 mL dans chaque boîte.

👁👁 ATTENTION 👁👁 : la gélose se solidifie vers 40-45°C. Il ne faut pas trop attendre avant de la couler. Si elle n'est plus assez liquide, on peut la refondre de la même façon que précédemment (chauffer jusqu'à ce qu'elle soit translucide)

☐NB☐ : il est possible de couler plus de 30 boîtes avec la quantité de gélose disponible

Agiter la boîte pour répartir la gélose et mettre le couvercle sur la boîte encore chaude

Laisser refroidir sur une paille plane pendant 30 minutes

Les boîtes sont utilisables aussitôt mais elles se conservent à 4°C pendant 2 à 3 jours dans une enceinte humide car la gélose est très fine (1,2 mm) et se déshydrate très vite.

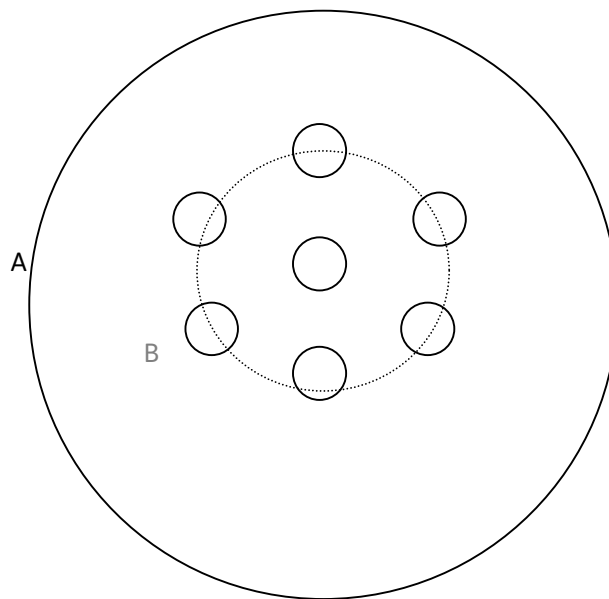
3) Préparation des sérums de substitution :

Le microtube à bouchon rouge contient une solution mimant le sérum de lapin immunisé contre la BSA.
Le microtube à bouchon noir contient une solution mimant la BSA.
Ces deux solutions sont prêtes à l'emploi.

Préparer 4 microtubes supplémentaires contenant de l'eau distillée afin de simuler des sérums ne contenant pas d'anticorps anti-BSA. Annoter ces microtubes avec des feutres permanents de manière à les identifier facilement.

5) Préparation de la salle

Dessiner un modèle de réalisation des puits dans les boîtes de gélose en suivant les instructions suivantes :



Tracer un cercle A de 5,5 cm de diamètre (2,25 cm de rayon)

Tracer un cercle de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) au centre du cercle A

Tracer au crayon un cercle B de 2 cm de diamètre (1 cm de rayon) au centre du cercle A

Tracer un cercle C de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) dont le centre est situé sur le cercle B

Tracer un cercle de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) dont le centre est situé sur le cercle B et à 1 cm du centre du cercle C

Tracer 4 autres cercles de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) dont le centre est situé sur le cercle B et à 1 cm du centre précédemment tracé

👁️👁️ **ATTENTION** 👁️👁️ : respecter ces consignes pour tracer le modèle de réalisation des puits car les distances sont étudiées pour fournir de bons résultats.

Disposer pour chaque binôme :

- une boîte de gélose
- un emporte-pièce passé à l'alcool afin de percer les puits
- un modèle (photocopie du modèle original) de réalisation des puits

Préparer les poires de dépôt : il faut une poire par microtubes de sérums. Il faut veiller à ce que les poires ne soient pas mélangées par les élèves.

⇨ Conseil ⇨ : coller sur les poires des gommettes de couleur correspondante au bouchon des tubes.

6) Après la manipulation des élèves

Laisser les boîtes 40 minutes à température ambiante.

Des arcs blancs apparaissent entre les puits contenant le sérum anti BSA et le sérum BSA.

Les arcs restent observables environ 48 heures lorsque les boîtes sont conservées à 4°C dans une atmosphère humide. Veillez à ne jamais laisser les boîtes de gélose près d'une source de chaleur ou au soleil (la gélose se dessèche assez rapidement).

PRINCIPE ET INTERET PEDAGOGIQUE:

Le but de ce kit est de simuler la mise en évidence de la spécificité de la réponse immunitaire.

Principe du kit Ouchterlony avec produits non simulés :

Il a été injecté à un lapin de l'albumine bovine (BSA). Trois semaines plus tard, son sérum est prélevé. Sa potentialité à posséder les anticorps anti-albumine bovine et la spécificité de ceux-ci sont testés par la méthode de double diffusion d'OUTCHTERLONY (ODD).

Ce test est basé sur 2 principes :

-la diffusion des molécules dans la gélose à partir de chacun des puits.

La vitesse de diffusion dépend de la taille des molécules et de leur diversité dans chaque puit. Ce test requière une double diffusion : la diffusion de l'anticorps et la diffusion de l'antigène

-la reconnaissance spécifique anticorps antigène et la formation d' un complexe visible à l'œil nu

FICHE DE MANIPULATION PAR LES BINOMES :

Chaque binôme dispose d'une boîte de gélose, d'un modèle de réalisation des puits et d'un emporte-pièce passé à l'alcool.

1) Réalisation des puits dans la boîte de gélose.

Poser le modèle sous la boîte de gélose pour faire les puits (couvercle vers le haut).

Ouvrir la boîte et faire un trou en perçant la gélose de part en part à l'aide de l'emporte-pièce en respectant le modèle. Commencer par le puits central de la boîte puis percer les 6 puits autour du puits central en suivant le modèle visible sous la boîte.

Absorber l'excédent de liquide dans les puits ainsi formés à l'aide de papier absorbant.

👁👁 ATTENTION 👁👁 : bien respecter le modèle fourni : les distances choisies optimisent les résultats.

↔ Conseils ↔: Le disque de gélose formé par l'emporte-pièce est enlevé soit en restant dans le tube (collé au disque précédent, le plus dur étant de faire rentrer le premier), soit en se servant du tube comme d'une pelle pour pousser le disque hors du trou sur les côtés de la boîte.

👁👁 ATTENTION 👁👁 à ne pas fendre la gélose. La classe dispose de quelques boîtes supplémentaires pour l'entraînement ou pour remplacer les géloses fendues

2) Dépôts des sérums

Déposer dans le puits central 20 µL (une goutte de la poire calibrée) d'anticorps contenu dans le microtube à bouchon rouge, sans faire de bulles.

Déposer 20 µL (une goutte de la poire calibrée) des 5 sérums antigènes préparés précédemment dans les puits périphériques, sans faire de bulles.

Donner une orientation à la boîte en faisant un trait au stylo permanent sur la boîte au niveau d'un puits.

Repérer sur un dessin le plan des dépôts de sérums.

👁️ **ATTENTION** 👁️ : ne pas mélanger les poires pour prélever les sérums ; chaque microtube possède sa poire attirée.

⇌ Conseil ⇌ : définir en classe entier les dépôts que chaque binôme réalise pour avoir tous les cas de figure possibles

3) Obtention des résultats

Placer les boîtes à température ambiante pendant 40 minutes, éloignées de toute source de chaleur ou au soleil.

4) Lecture des résultats

Au bout de 40 minutes, un arc blanc apparaît entre certains puits. Veillez à ne pas laisser les boîtes près d'une source de chaleur ou bien au soleil : la gélose se dessèche rapidement du fait de sa finesse.

Les arcs restent visibles environ 48 heures lorsque les boîtes de résultats sont conservées à 4°C dans une atmosphère humide.




Pour bien une meilleure observation, regarder à travers la boîte, sur fond noir et avec une illumination oblique.

INTERPRETATIONS ET CONCLUSIONS

Un arc blanc apparaît entre le puits central contenant la simulation de sérum de lapin anti BSA et un puits périphérique contenant la simulation de BSA ou de sérum de bœuf.

Lorsqu'on injecte de la BSA au lapin, celui-ci produit bien des anticorps pour se défendre. Ces anticorps contenus dans le sérum sont spécifiques de la BSA et seulement de celle-ci. Ils ne forment pas de complexe avec l'albumine des autres animaux. Par contre, un arc de précipitation apparaît entre les anticorps contenu dans le sérum de lapin immunisé et l'albumine bovine (BSA) contenue dans le sérum de bœuf.

FICHE SECURITE

Produit	Pictogramme et risques normalisés	Actions à mener en cas			
		de contact avec la peau	d'inhalation	De projection dans les yeux	d'ingestion
NaOH 0.5M	 Corrosif	Laver immédiatement la peau avec une grande quantité d'eau pendant au moins 15 minutes. Laver les vêtements contaminés avant de les utiliser.	Donner de l'air frais.	Rincer immédiatement les yeux à grande eau pendant au moins 15 minutes en séparant les paupières.	Rincer immédiatement la bouche avec de l'eau puis lui faire boire une grande quantité d'eau. Tenter de faire vomir. Voir un médecin
ZnSO ₄ 0.5M	 Irritant  Dangereux pour l'environnement	Laver immédiatement la peau avec une grande quantité d'eau pendant au moins 15 minutes. Laver les vêtements contaminés avant de les utiliser.	Donner de l'air frais.	Rincer immédiatement les yeux à grande eau pendant au moins 15 minutes en séparant les paupières.	Rincer immédiatement la bouche avec de l'eau puis lui faire boire une grande quantité d'eau. Tenter de faire vomir. Voir un médecin

Les solutions mimant les sérums sont à manipuler avec précaution : avec gants, lunettes et blouses. En cas de projection dans les yeux ou sur la peau, rincer immédiatement et abondamment (sulfate de zinc et soude peu concentrés).

La gélose chaude peut provoquer des brûlures. Bien manipuler avec une protection des mains contre la chaleur et veiller à ne pas en renverser sur soi.

FICHE CONSERVATION

Le sachet A est conservé à **température ambiante**. Il contient du matériel et un sachet noté « agar » ainsi que deux microtubes :

- petit sachet noté « Agar » contenant 3g d'agar **température ambiante**
- microtube à bouchon rouge contenant 1 mL de solution mimant le sérum de lapin immunisé contre la BSA (soude) **température ambiante**
- 1 microtube à bouchon noir contenant 1 mL de solution mimant la BSA (sulfate de zinc) **température ambiante**

L'agar dissous dans l'eau distillée ne se conserve pas : il faut couler cet agar assez rapidement dans les boîtes de pétri.

Les boîtes de pétri contenant la gélose se conservent à 4°C dans une atmosphère légèrement humide pendant quelques jours.

Les microtubes et l'agar peuvent se conserver quelques mois (jusqu'à 6 mois)

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les sérums peuvent être jetés dans l'évier en faisant couler de l'eau.

La gélose des boîtes doit être décontaminée des éventuelles bactéries avec de la javel ou de l'eau oxygénée puis jetée à la poubelle.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).

Les boîtes de pétri ayant contenu la gélose sont éventuellement réutilisables ainsi que les emporte-pièces.